



PROGRAMA DE DOCTORADO EN NUTRICIÓN Y CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Evaluación Nutricional de Alimentos y/o Nutrientes Funcionales

Directores de la Tesis Doctoral:

Jesús Rodríguez Huertas

María Dolores Mesa García

Alumna:

Avilene Rodríguez Lara

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Avilene Rodríguez Lara
ISBN: 978-84-1117-473-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/76805>

Tesis Doctoral

EVALUACIÓN NUTRICIONAL DE ALIMENTOS Y/O NUTRIENTES FUNCIONALES

NUTRITIONAL ASSESSMENT OF FUNCTIONAL FOODS AND/OR NUTRIENTS



PROGRAMA DE DOCTORADO DE NUTRICIÓN Y CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS “JOSÉ
MATAIX VERDÚ”

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Directores de la Tesis Doctoral:

Jesús Rodríguez Huertas

María Dolores Mesa García

AVILENE RODRÍGUEZ LARA

2022

Este estudio ha sido financiado por el Grupo de investigación CTS-454 Impacto del estrés oxidativo, deporte, actividad física y salud a través de varios proyectos de investigación gestionados por la Fundación General UGR-Empresa:

- P3650-00 Aprovechamiento biotecnológico de los subproductos del olivar de Andalucía dirigido al sector alimentario y agrícola. Utilización del ácido maslínico y su derivado feniletilamina procedente de la aceituna en el tratamiento y prevención del síndrome metabólico. Financiado por Biomaslinic SL

- P4177-00. Estudio nacional, multicéntrico, prospectivo, doble ciego, en grupos paralelos y de asignación aleatoria de Producto MM para disminuir la masa grasa y mejorar la forma física secundaria a la hipertrofia muscular en humanos. Financiado por León Research, S.L.

- PC-3960-0. Desarrollo de productos nutracéuticos en matriz gel destinados a necesidades especiales. Financiado por Moreno Ruiz Hermanos, S.L.

- PC-3129-00. Diseño de menús saludables (acompañados de ficha técnica nutricional y receta de elaboración de cada plato) y determinación de componentes nutricionales de alimentos y muestras humanas. Financiado por Biogolden, S.L.U

- P4162-00. "Evaluación de 10 productos específicos". Financiado por grupo SAU



“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”

Isaac Newton

A todas las personas que me ayudan a mejorar cada día, gracias por toda la paciencia, amor y
apoyo que me han brindado

Tabla de contenido

Resumen	9
Introducción	13
Alimentos funcionales	15
Desarrollo y tendencias	16
Dieta Mediterránea	18
Hidroxitirosol.....	25
Ácido ursólico (cáscara de manzana como fuente de ácido ursólico)	29
Chía (Salvia hispánica)	35
La leche y los productos lácteos (Calcio y vitamina D) en el desarrollo de alimentos funcionales ..	44
Justificación	48
Objetivos	48
Metodología	49
Resultados	51
Sección I. Estudio Experimental: Beneficios de la Dieta Mediterránea sobre los factores de riesgo cardiovascular	53
Objetivos específicos	53
Material y métodos.....	53
Resultados	61
Discusión	65
Conclusión.....	69
Sección II. Toxicidad oral aguda/subaguda y subcrónica de un extracto de aceite de oliva virgen rico en hidroxitirosol	71
Objetivos específicos	71
Material y Métodos	71
Resultados	75
Discusión	83
Sección III. Efecto del consumo de Ácido Ursólico en la reducción de la grasa y la hipertrofia muscular en Humanos. Estudio Prospectivo, Doble Ciego.	87
Objetivos específicos	87
Material y Métodos	87
Resultados	92
Discusión	93
Conclusión.....	96
Sección IV. Evaluación de la composición fitoquímica y nutricional de la semilla de chía oscura (Salvia Hispánica L.)	99

Objetivos específicos	99
Material y Métodos	99
Resultados.....	103
Discusión	111
Conclusión	115
<i>Sección V. Leche y productos lácteos como vehículos de calcio y vitamina D: papel de las leches enriquecidas</i>	117
Objetivos específicos	117
Introducción	117
Consumo de leche y derivados lácteos. Situación actual respecto a los requerimientos en España	118
Requerimientos nutricionales de calcio y vitamina a lo largo del ciclo de la vida	120
Importancia de los nutrientes procedentes de productos lácteos en el funcionamiento del organismo	121
Efecto de la leche y de los productos lácteos sobre el crecimiento en la infancia	124
Biodisponibilidad del calcio en la leche y otros alimentos.....	124
Composición de bebidas sustitutivas de leche	128
Leches enriquecidas con calcio	128
Alteraciones ocasionadas por la ingesta de leche. Mitos y realidades	133
Conclusión	135
<i>Conclusiones</i>	137
Sección I. Estudio Experimental: Beneficios de la Dieta Mediterránea sobre los factores de riesgo cardiovascular	137
Sección II. Toxicidad oral aguda/subaguda y subcrónica de un extracto de aceite de oliva virgen rico en hidroxitirosol.....	137
Sección III. Efecto del consumo de Ácido ursólico en la reducción de la grasa y la hipertrofia muscular en humanos	137
Sección IV. Evaluación de la composición fitoquímica y nutricional de la semilla de chía oscura (<i>Salvia Hispánica</i>).....	138
Sección V. Leche y productos lácteos como vehículos de calcio y vitamina D: papel de las leches enriquecidas.....	138
CONCLUSIÓN GENERAL.....	138
<i>Agradecimientos</i>	141
<i>Referencias</i>	144
<i>Anexos</i>	167
Indicios de calidad de las publicaciones derivadas de la tesis doctoral.....	167
Índice de figuras	170
Índice de tablas.....	171
Cuestionario IPAQ.....	173

RESUMEN

ABSTRACT

RESUMEN
ABSTRACT

Resumen

La presente Tesis Doctoral recoge una serie de trabajos de investigación en los que se evalúa el consumo de potenciales nutraceuticos y alimentos funcionales relacionados con la dieta y la mejora de la salud. Las poblaciones de estudio incluyen modelos murinos y adultos españoles con edades comprendidas entre los 18-60 años. El objetivo de la presente tesis ha sido comprobar a través de distintos modelos experimentales el posible efecto beneficioso de dos antioxidantes ampliamente consumidos por la población mediterránea (ácido ursólico y concentrado de vegetales deshidratados) y de un alimento precolombino como es la chía.

Los resultados del estudio de Dieta Mediterránea muestran que su ingesta durante 6 semanas, suplementada o no con antioxidantes característicos de esta dieta, y sin modificación de cambios en los estilos de vida no provoca efectos positivos sobre la prevención de las enfermedades cardiovasculares. No obstante, observamos cierta tendencia en la mejora de parámetros claves como índice de masa corporal y presión arterial cuando se normaliza la dieta lo que no se constata con la suplementación de antioxidantes, evidenciando que la normalización de la dieta es la mejor opción.

La administración oral de un extracto de aceite de oliva virgen que contiene un 15% de hidroxitirosol no indujo efectos que puedan considerarse de relevancia toxicológica en ensayo agudo, subagudo y subcrónico en un modelo murino.

La suplementación durante 12 semanas, con 35 mg/d de ácido ursólico procedente de un extracto de piel de manzana y vehiculizado en un fiambre de pechuga de pollo, acompañada de actividad física dos veces a la semana, no ejerce ningún efecto sobre el peso y la composición corporal, ni en la fuerza y resistencia muscular, en humanos sanos.

Nuestros hallazgos indican que las semillas de chía son ricas en fibra dietética y oligosacáridos, ácidos linolénicos poliinsaturados omega-3, proteínas de alta calidad que contienen L-fenilalanina y L-triptófano. También son una buena fuente de antioxidantes, en particular polifenoles. Además, la variedad específica de chía oscura de Jalisco contiene también nucleósidos: adenosina, guanosina y uridina, mejorando su valor nutricional. Por tanto, es el conjunto de sus nutrientes y compuestos bioactivos el que determina su estatus como alimento funcional.

La leche y sus derivados son alimentos insustituibles en una dieta equilibrada, ya que aportan micronutrientes, como el calcio y la vitamina D, que no están presentes en otros alimentos en las cantidades y con la biodisponibilidad necesarias para satisfacer las necesidades nutricionales de una dieta equilibrada. Los productos lácteos enriquecidos permiten aumentar la ingesta de estos micronutrientes con una alta biodisponibilidad, sin necesidad de modificar la dieta, lo que es beneficioso para mantener la salud.

En resumen, los resultados de la presente tesis confirman que la dieta equilibrada y variada en alimentos es la estrategia más eficiente para normalizar alteraciones cardiometabólicas

Palabras clave:

Dieta mediterránea; Alimentos funcionales; Hidroxitirosol; Polifenoles; Chía; Ácido ursólico; Leche.

Abstract

This Doctoral Thesis is a series of research papers evaluating the consumption of potential nutraceuticals and functional foods related to diet and health improvement. The study populations include murine models and Spanish adults aged 18-60 years. The aim of this thesis has been to test through different experimental models the possible beneficial effect of two antioxidants widely consumed by the Mediterranean population (ursolic acid and deshydrated vegetable concentrate) and of a pre-Columbian food such as chia.

The results of the Mediterranean Diet study show that its intake for 6 weeks, whether or not supplemented with antioxidants characteristic of this diet, and without modification of lifestyle changes, does not have a positive effect on the prevention of cardiovascular disease. However, we observed a certain trend in the improvement of key parameters such as body mass index and blood pressure when the diet is normalized, which is not observed with antioxidant supplementation, showing that normalization of the diet is the best option.

Oral administration of a virgin olive oil extract containing 15% hydroxytyrosol did not induce effects that could be considered toxicologically relevant in acute, sub-acute and sub-chronic tests in a murine model.

Supplementation for 12 weeks with 35 mg/d of ursolic acid from an apple peel extract in chicken breast meat, accompanied by physical activity twice a week, exerted no effect on body weight and composition, muscle strength and endurance in healthy humans.

Our findings indicate that chia seeds are rich in dietary fiber and oligosaccharides, omega-3 polyunsaturated linolenic acids, high-quality proteins containing L-phenylalanine and L-tryptophan. They are also a good source of antioxidants, in particular polyphenols. In addition, the specific variety of dark chia from Jalisco also contains nucleosides: adenosine, guanosine and uridine, enhancing its nutritional value. Therefore, it is the set of its nutrients and bioactive compounds that determines its status as a functional food.

Milk and its derivatives are irreplaceable foods in a balanced diet, as they provide micronutrients, such as calcium and vitamin D, which are not present in other foods in the quantities and with the bioavailability necessary to meet the nutritional needs of a balanced diet. Fortified dairy products make it possible to increase the intake of these micronutrients with high bioavailability, without the need for dietary modification, which is beneficial for maintaining health. In summary, the results of the present thesis confirm that a balanced and varied diet is the most efficient strategy to normalize cardiometabolic alterations.

Keywords: Mediterranean diet; Functional foods; Hydroxytyrosol; Polyphenols; Chia; Ursolic acid; Milk.

INTRODUCCIÓN

Introducción

La evidencia científica ha demostrado que la dieta juega un papel importante en la salud humana. Estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que los alimentos consumidos, su composición y la cantidad ingerida puede estar estrechamente relacionada con la promoción y/o mantenimiento de un estado saludable. En este sentido, los alimentos ya no sólo son considerados por su valor nutritivo, sino también por sus posibles efectos beneficiosos para la prevención o protección frente a enfermedades crónicas graves, especialmente aquellas asociadas al estilo de vida, como son las enfermedades cardiovasculares, diabetes, síndrome metabólico, enfermedades neoplásicas y neurodegenerativas, así como procesos inflamatorios asociados con el envejecimiento. Con respecto a ciertos tipos de cáncer, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que su incidencia podría reducirse en al menos un 30% al aumentar adecuadamente la ingesta dietética de frutas y verduras, de ahí la importancia de incluir alimentos funcionales en la dieta (Clinton *et al.*, 2020).

Actualmente, el estudio de los alimentos funcionales ha adquirido un gran interés en diversas disciplinas debido a la contribución que tienen sobre la salud y la prevención de enfermedades. El interés del consumidor por su salud ha impulsado el desarrollo de alimentos que ofrecen efectos beneficiosos específicos (Cortés, 2005). Los alimentos funcionales son aquellos que proporcionan un efecto beneficioso para la salud más allá de su valor nutricional básico. No constituyen un grupo de alimentos como tal, y suelen resultar de la adición, sustitución o eliminación de ciertos componentes de los alimentos habituales. En un concepto amplio de alimento, se incluyen no sólo los productos manufacturados, sino también ciertos alimentos tradicionales (aceite de oliva, tomate, legumbres, etc.) que contienen componentes que han demostrado con un elevado grado de evidencia científica propiedades beneficiosas para la salud (Mataix, 2002).

En 2004, la American Dietetic Association (ADA) describió que un alimento funcional se refiere a todo aquel alimento que proporciona un “efecto beneficioso sobre la salud cuando se consume como parte de una dieta variada de forma regular a niveles efectivos”, asimismo, ha clasificado los alimentos funcionales en cuatro grupos: alimentos convencionales, alimentos modificados, alimentos médicos y alimentos para uso dietético especial, y especifica que se necesitan más investigaciones sobre los posibles beneficios para la salud de estos alimentos (ADA, 1995). El Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI Europa), define los alimentos funcionales como “cualquier alimento o ingrediente alimentario que pueda proporcionar un beneficio para la salud más allá de los nutrientes tradicionales que contiene” (Eur-Parliam, 2006). De acuerdo con esta definición, se incluyen alimentos simples, productos alimenticios tratados tecnológicamente y sus componentes activos que se pueden usar para preparar alimentos enriquecidos, y que hayan demostrado una actividad beneficiosa. Posteriormente, en 2011, la European Food Safety Authority (EFSA) publicó una lista de alimentos e ingredientes que incluyen nutrientes

esenciales y no esenciales, componentes vegetales, alimentos integrales, microorganismos, entre otros, que han demostrado un efecto beneficioso y pueden ser incluidos en la dieta por su efecto funcional (FDA, 2011).

La Dieta Mediterránea es una fuente indiscutible de alimentos funcionales, es más, ella misma se podría definir como tal, ya que ha demostrado múltiples efectos beneficiosos para la salud, más allá de su papel puramente nutricional (Bakaloudi *et al.*, 2021). Un metaanálisis realizado por Tang *et al.* (2021) donde evalúan la asociación de la distrofia muscular en relación con la mortalidad en personas con antecedentes de ECV con un total de 37 879 participantes, han puesto de manifiesto que la adherencia a la Dieta Mediterránea mejoró la supervivencia en personas con antecedentes de ECV. Del mismo modo, otro metaanálisis que evaluó cualitativamente y cuantitativamente las asociaciones de los patrones dietéticos y el pronóstico de cáncer a partir de estudios prospectivos de cohortes publicados, así como el efecto de las intervenciones dietéticas mediante ensayos controlados aleatorios, concluyó que las intervenciones dietéticas combinadas con actividad física mejoran la calidad de vida, no obstante y a pesar de que los estudios fueron en supervivientes de cáncer de mama, se necesitan más estudios de cohorte e intervención en otros cánceres para hacer recomendaciones más específicas (Castro-Espin *et al.*, 2022). Koelman *et al.*, 2022, llevaron a cabo una revisión sistemática y un metanálisis de ensayos controlados aleatorios (ECA) para resumir la evidencia reciente sobre los efectos de los patrones dietéticos en los biomarcadores inflamatorios y relacionados con el sistema inmunitario en humanos, los autores describieron que no se observaron efectos sustanciales para los patrones dietéticos adicionales estudiados en la investigación de intervención, incluida la dieta de adherencia dietética para detener la hipertensión y las dietas vegetarianas o veganas, asimismo, sugieren que se justifica que los futuros estudios de intervención a gran escala permitan la comparación directa de varios patrones dietéticos en relación con una serie de biomarcadores que reflejan múltiples vías inflamatorias y relacionadas con el sistema inmunitario. En consecuencia de los diversos estudios realizados, se describe que la adherencia a la dieta mediterránea se asocia inversamente con el riesgo de sobrepeso y/u obesidad, así como con el aumento de peso de 5 años y, por lo tanto, tiene importancia práctica para la salud pública, sin embargo, la mayoría de los resultados necesitan ser comprobados para poder llegar a conclusiones con un elevado grado de evidencia científica (Lofti *et al.*, 2022).

Las investigaciones se han centrado principalmente en estudiar su uso para la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas, la salud del cerebro, la inflamación, la salud ocular y el envejecimiento, entre otros (Ashwell, 2002). Algunos autores discuten los métodos actuales y el desarrollo de nuevas técnicas para aislar y caracterizar diversos ingredientes alimentarios y especies moleculares. Estas técnicas son importantes no solo para la industria alimentaria, que necesita evaluar o confirmar las concentraciones de los componentes bioactivos presentes, sino también para los investigadores que desean probar los mecanismos de acción o la eficacia de dichos componentes, ya sea *in vitro* o *in vivo* (Serrano *et al.*, 2006; Solorzano-Santos *et al.*, 2014; Cicerale *et al.*, 2015).

Dado que la era del estudio de los alimentos funcionales acaba de empezar, los principales objetivos de esta Tesis Doctoral son evaluar el efecto beneficioso del consumo de distintos tipos de alimentos funcionales incluidos en el patrón de Dieta Mediterránea, mediante la realización de revisiones bibliográficas, estudios experimentales en ratas y ensayos clínicos en humanos, centrándonos en el hidroxitirosol, presente en el aceite de oliva virgen extra (AOVE), el ácido ursólico, presente en la cáscara de la manzana, la chía, fuente de fibra y ácidos grasos omega-3, y la leche, fuente de micronutrientes esenciales como el calcio y la vitamina D.

Alimentos funcionales

Es ampliamente conocido que los alimentos son fuentes de vitaminas y minerales que favorecen las funciones corporales y la salud, como la respiración, la producción de energía y la respuesta inmunitaria. Los nutrientes se consumen principalmente como sustratos energéticos celulares; algunos también son capaces de modular la diferenciación y proliferación celular y activar las barreras químicas frente a la oxidación celular (Ye *et al.*, 2018). Por este motivo, recientemente los alimentos se han clasificado en dos categorías: por un lado, los alimentos con fines dietéticos específicos, y por otro los alimentos funcionales que contribuyen a favorecer condiciones óptimas de salud y pueden disminuir riesgos de contraer enfermedades crónicas no transmisibles, como las enfermedades cardiovasculares (ECV), accidentes cerebrovasculares, dislipidemias, diabetes, y el cáncer, entre otros.

El término “alimentos funcionales” se utilizó por primera vez en Japón en la década de 1980. Sin embargo, tras varias definiciones realizadas por distintas instituciones oficiales, recientemente se ha definido que los alimentos funcionales, a aquellos alimentos, procesados industrialmente o naturales, que cuando se consumen regularmente dentro de una dieta variada en cantidades adecuadas, tienen efectos beneficiosos sobre la salud, más allá de sus efectos nutricionales básicos (Granato *et al.*, 2017). Esta definición acota el uso generalizado del término funcional de manera que, sin un ensayo clínico adecuado que aporte pruebas de funcionalidad además de estudios toxicológicos experimentales, ningún alimento fresco o procesado puede considerarse funcional. Por lo tanto, antes de hacer afirmaciones sobre el efecto saludable de ciertos alimentos, es necesario realizar ensayos clínicos aleatorios, doble ciego y controlados con placebo (Assmann *et al.*, 2014), que cumplan con la regulación establecida por organismos reguladores en cada país, por ejemplo, la EFSA en la Unión Europea, la Food and Drug Administration (FDA) en los Estados Unidos (EFSA, 2010; FDA, 2011), y que permitan establecer su eficacia funcional.

Según la definición de alimentos funcionales, los principales criterios de inclusión para una determinada declaración de salud de un ingrediente o alimento en una etiqueta alimentaria son la seguridad del alimento, el libre acceso sin necesidad de prescripción médica (o consejo médico), y la evidencia de sus beneficios para la salud cuando se consume regularmente en una dieta equilibrada (Eur. Parliam, 2006, Lenssen *et al.*, 2018).

Es importante señalar que los alimentos funcionales no son medicamentos, y que, si bien pueden coadyuvar en la prevención y tratamiento de enfermedades, hace falta abordar este fenómeno de manera multidisciplinar y seguir utilizando protocolos que demuestren la eficacia de los mismos en situaciones fisiológicas y patológicas específicas (Rana *et al.*, 2015; Gouw *et al.*, 2017; Fedacko *et al.*, 2019). Las normas establecidas por la medicina basada en la evidencia requieren que se proporcione evidencia científica de alto nivel, antes de poder formular recomendaciones nutricionales para el público en general. La evidencia científica requerida es proporcionada por ensayos clínicos aleatorizados, controlados, doble ciego (evidencia de nivel I) y, en cierta medida, por grandes estudios de cohortes (evidencia de nivel II). De esta manera, y después de hacer una amplia revisión de todos aquellos estudios que proporcionan evidencia científica de alta calidad (validez externa e interna, homogeneidad de la muestra y poder estadístico), las autoridades sanitarias, como la EFSA, emiten recomendaciones nutricionales basadas en dicha evidencia (EFSA, 2010). A pesar de que la definición y los criterios básicos son comprensibles y exhaustivos, todavía existe cierta controversia para el establecimiento de las propiedades funcionales. Se ha descrito que los alimentos o ingredientes son funcionales cuando se fabrican utilizando moléculas potencialmente funcionales, recuperadas de subproductos industriales (Dalle-Zotte y Szendro, 2011; Tahergorabi *et al.*, 2015) o mediante la utilización de determinados procesos tecnológicos (Gutiérrez, 2018), mientras que algunas investigaciones proporcionan una declaración de alimento funcional únicamente basada en el enriquecimiento con un nutriente esencial (Adadi *et al.*, 2019). Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen diversos factores intrínsecos y extrínsecos del alimento que pueden modificar la eficacia de un alimento funcional, tales como, factores genéticos, inactividad física, densidad y variedad calórica, hormonas, y la edad de los sujetos, entre otros (Chibisov *et al.*, 2019; Rao *et al.*, 2019).

Desarrollo y tendencias

El mercado de los alimentos funcionales es un nicho lucrativo de producción de alimentos, y se prevé que siga creciendo dado su gran interés (Bogue *et al.*, 2017). La evidencia científica indica que los alimentos e ingredientes funcionales más estudiados, son los prebióticos, los probióticos, antioxidantes y polifenoles (Yeung *et al.*, 2018). Los productos alimenticios funcionales más estudiados incluyen el yogur (que mejorar la salud digestiva), aceite de oliva (que mejorar las enfermedades cardiovasculares), y semillas vegetales, como chía, lino, amaranto (que mejorar la salud digestiva y supone un gran aporte de proteína vegetal) (Bogue *et al.*, 2017).

El desarrollo de alimentos funcionales es esencial para la industria alimentaria, e incluye el diseño, la optimización y el desarrollo de diferentes formulaciones, así como las técnicas de procesamiento que se aplican a los productos alimentarios antes de que lleguen al mercado. Por ejemplo, el uso del procesamiento térmico tiene una influencia decisiva en la biodisponibilidad de los nutrientes y los compuestos bioactivos presentes en los alimentos (Koubaa *et al.*, 2018). En las últimas dos décadas, han surgido tecnologías de

procesamiento innovadoras (por ejemplo, alta presión hidrostática, campos eléctricos pulsados, ultrasonidos, microondas) como alternativas adecuadas para el procesamiento de alimentos (Kovačević *et al.*, 2018). Estas tecnologías sostenibles proporcionan una mejor conservación de los nutrientes nativos de las frutas y hortalizas, evitan el crecimiento microbiano, utilizan menos energía, y pueden aplicarse a la explotación de subproductos ecológicos (Putnik *et al.*, 2017). Por lo tanto, tienen impactos positivos desde el punto de vista funcional, así como en el desarrollo de nuevos productos funcionales.

Por otro lado, el uso de compuestos bioactivos para el desarrollo de alimentos funcionales está condicionado, en la mayoría de los casos, por la baja solubilidad y la reducida estabilidad y biodisponibilidad. Para superar estos problemas, el uso de sistemas de administración oral basados en nanopartículas o micropartículas de compuestos bioactivos o minerales esenciales pueden ser una solución efectiva (Tapia-Hernández *et al.*, 2019). De hecho, estos sistemas pueden desarrollarse en formas líquidas, como geles y pastas, o en formas sólidas. Diversos autores han descrito los sistemas de vehiculización más actuales adaptados a los ingredientes bioactivos en los sistemas alimentarios, ejemplo de ello, son las microemulsiones, las nanoemulsiones, las emulsiones, las nanopartículas de lípidos sólidos, los liposomas y los biopolímeros en forma de microgel. Actualmente, se utiliza la técnica de electrospinning basada en un conjunto de conceptos electromagnéticos para la encapsulación de compuestos bioactivos, tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. Estas técnicas modernas, nos dan un nuevo enfoque para solucionar problemas como condiciones severas de temperatura, presión o tratamiento de sustancias (Bonat-Celli y Abbaspourrad, 2018; McClements, 2020). Si bien es cierto que se han desarrollado sistemas estables que aumentan la solubilidad, la estabilidad y la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos, uno de los mayores retos de la industria es la dificultad de escalar los resultados del laboratorio a nivel industrial. A menudo surgen problemas, porque los ingredientes o los sistemas de elaboración no son prácticos desde el punto de vista comercial. Asimismo, existe el inconveniente de que, tras la adición del compuesto funcional, las matrices que incorporan compuestos bioactivos pueden modificar sabor, textura, aspecto y estabilidad.

Por estos motivos, tras el desarrollo del alimento es necesario comprobar su actividad funcional mediante evaluaciones rigurosas en humanos y animales para determinar con precisión su biodisponibilidad, sus efectos, y su potencial toxicidad (Nikmaram *et al.*, 2017).

Dieta Mediterránea

En la actualidad, las ECV son la principal causa de muerte prematura en la mayoría de las poblaciones y contribuyen al aumento de los costes sanitarios. La evidencia científica indica que las ECV pueden prevenirse en gran medida si se abordan sus factores de riesgo conocidos, como el aumento de la presión arterial y las concentraciones de colesterol plasmático, el control de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), la obesidad y el estilo de vida poco saludable (Joseph *et al.*, 2017). En este sentido, algunos investigadores, a través de ensayos clínicos epidemiológicos y aleatorizados, han demostrado que para la prevención de las ECV deben promoverse cambios en el estilo de vida, incluido un patrón dietético saludable (Bowen *et al.*, 2018). Uno de los patrones dietéticos más saludables debido a sus beneficios ampliamente demostrados es la Dieta Mediterránea, que se refiere al patrón dietético tradicional característico de las poblaciones que bordean el Mar Mediterráneo. Este término fue definido inicialmente por Ancel Keys, en un estudio pionero donde se compararon los hábitos dietéticos de 7 países (Estados Unidos, Japón, Finlandia, Países Bajos, la antigua Yugoslavia, Grecia e Italia) en relación con los riesgos de ECV (Keys *et al.*, 1980). Los resultados mostraron una menor tasa de mortalidad por cardiopatía isquémica en los países mediterráneos (Keys *et al.*, 1986). La base de estas tradiciones dietéticas comienza en los patrones de alimentos típicos de Creta, gran parte de Grecia y el sur de Italia, a principios de la década de 1960, donde la esperanza de vida de las personas que habitaban en esas regiones estaba entre las más altas del mundo, y tenían las tasas de enfermedad coronaria, cáncer y otras enfermedades relacionadas con la alimentación más bajas. Asimismo, este patrón dietético estaba estrechamente relacionado con un estilo de vida que incluía la práctica constante de actividad física y tasas bajas de obesidad (Willet, 2006).

La definición de la Dieta Mediterránea ha cambiado a lo largo de los años; hoy en día, puede describirse como un patrón dietético caracterizado por el consumo de aceite de oliva como principal fuente de grasa, una elevada ingesta de alimentos vegetales, productos integrales, cereales, patatas, legumbres, frutos secos y semillas, así como cantidades bajas o moderadas de alimentos de origen animal (productos lácteos, aves de corral, carnes rojas y huevos) y vino con moderación en las comidas. Además, incluye ciertos componentes de estilo de vida, como la práctica de ejercicio físico regular entre otros, que históricamente se han asociado a la salud y que siguen las personas en los países que bordean el mar Mediterráneo y complementan su efecto beneficioso (Figura 1). Aunque esta definición está ampliamente aceptada, hay que tener en cuenta que la Dieta Mediterránea varía según las características de cada población mediterránea, lo que hace difícil establecer una definición única y universal (D'Alessandro y De Pergola, 2015). La Dieta Mediterránea ha sido objeto de diversos estudios, donde se ha confirmado que la adherencia a este patrón dietético puede brindar protección y disminuir significativamente el riesgo de mortalidad por ECV, cáncer, incidencia de enfermedad de Parkinson y Alzheimer, deterioro cognitivo leve, así como enfermedades cerebrovasculares (Sofi *et al.*, 2010).

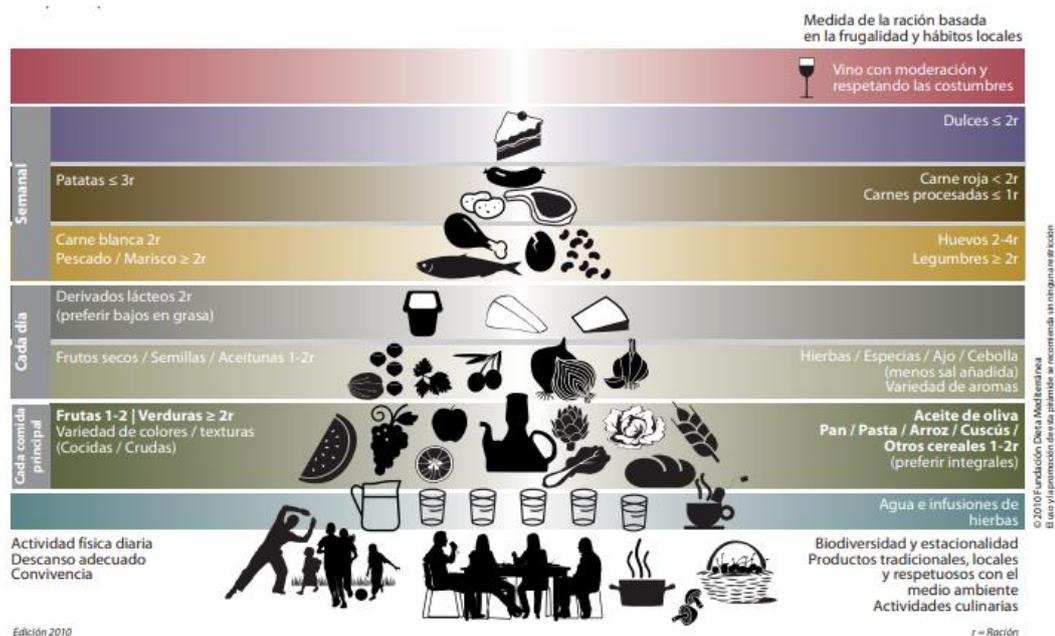


Figura 1. Pirámide tradicional de la Dieta Mediterránea. Los alimentos en la base de la pirámide siguen aportando los niveles más altos de ingesta en términos de gramos/día. Las fuentes de proteínas animales se posicionan a una altura que sugiere una menor frecuencia de consumo y contribución a la ingesta total, ya que se ha cambiado el consumo diario al semanal. La parte superior de la pirámide presenta alimentos animales y ricos en azúcares que sólo deben consumirse ocasionalmente. Se hace hincapié en la preferencia por los alimentos locales, estacionales, frescos y mínimamente procesados, apoyando la biodiversidad y los alimentos ecológicos y tradicionales.

Los estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto una relación positiva entre el consumo de un patrón dietético occidental y una alta tasa de mortalidad, que puede estar relacionado con que el elevado porcentaje de energía proveniente de grasa saturada y un bajo consumo de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) (Keys *et al.*, 1986). El aceite de oliva es un ingrediente clave en la Dieta Mediterránea y de acuerdo con los datos descritos por algunos autores una baja ingesta de ácido oleico tiene relación con el desarrollo de enfermedades coronarias y una alta tasa de mortalidad (Bondia-Pons, 2007). Es importante mencionar que el ácido oleico se encuentra mayoritariamente en el aceite de oliva virgen (AOV) y que se ha demostrado en diferentes grupos poblacionales que las personas que consumen aceite de oliva como principal fuente de grasa tienen mejor salud cardiovascular en relación a las que no lo consumen (Keys *et al.*, 1986). Además, estudios posteriores han demostrado que, en comparación con los carbohidratos, las grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas reducen las concentraciones en sangre de lipoproteína de baja densidad (LDL) y triacilglicéridos (TAG), y aumentan la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Willet, 2006).

El estudio de Prevención con Dieta Mediterránea en España (PREDIMED) ha demostrado la eficacia de la Dieta Mediterránea, suplementada con aceite de oliva virgen extra (AOVE) o con frutos secos

(nueces), comparándola con una dieta hipocalórica baja en grasas (dieta control), sobre la prevención cardiovascular primaria. Después de cinco años de seguimiento, se ha demostrado la eficacia de la Dieta Mediterránea suplementada con AOVE y frutos secos en la prevención de la enfermedad cardiovascular y sus principales factores de riesgo, reduciendo en un 30% la incidencia de complicaciones cardiovasculares crónicas, y respaldando los beneficios previamente publicados (Toledo *et al.*, 2013; Estruch *et al.*, 2018). Asimismo, otros estudios clínicos y epidemiológicos han puesto de manifiesto que la adherencia a la Dieta Mediterránea se encuentra inversamente relacionada con el riesgo de incidencia a desarrollar diabetes, síndrome metabólico y a disminuir la presión arterial y las concentraciones sanguíneas de TAG y LDL (Esposito *et al.*, 2011; García *et al.*, 2016; Jannasch *et al.*, 2017).

La Dieta Mediterránea es probablemente uno de los patrones dietéticos mejor estudiados en relación con la prevención de la ECV, lo que se refleja en la gran cantidad de investigaciones publicadas. Sin embargo, se necesitan más ensayos clínicos en diferentes poblaciones para proporcionar resultados de los que se puedan extraer recomendaciones basadas en la evidencia de este patrón dietético.

Aceite de oliva virgen

El olivo (*Olea europaea L.*) pertenece a la familia *Oleaceae* del género *Olea*, y se cultiva principalmente en las regiones de la cuenca mediterránea (Ray *et al.*, 2015). Su cultivo se dedica a la producción de aceite y aceitunas de mesa, que son productos alimenticios con una amplia tradición milenaria dentro de la Dieta Mediterránea, y son consumidos en el mundo por su alto valor nutricional. Su principal componente es el ácido oleico, y son una fuente de antioxidantes naturales, principalmente compuestos fenólicos (Uylaser y Yildiz, 2014).

De acuerdo con el Comité Oleícola Internacional (COI), se les denomina AOV a los aceites obtenidos mediante medios mecánicos o físicos en condiciones particularmente térmicas (bajas temperaturas) que no conducen a alteraciones en el aceite, y que no hayan sufrido ningún tratamiento que no sea alguno de los siguientes: recolección, lavado, molienda, batido, prensado, decantación, centrifugación y filtración durante su elaboración (COI, 2020). Existen diferentes tipos de aceites de oliva que son aptos para el consumo humano (COI, 2020), los cuales se describen a continuación:

- Aceite de oliva virgen extra (AOVE): tiene una acidez libre expresada como ácido oleico de no más de 0.8 gramos por 100 gramos. La denominación extra se da a los aceites de mayor calidad y lo lleva a cabo un panel de cata formado por expertos.
- Aceite de oliva virgen (AOV): es un zumo oleoso obtenido mediante el prensado en frío del fruto del olivo en perfecta madurez, con una acidez libre, expresada como ácido oleico, de no más de 2 gramos por 100 gramos, y que no alcanza las características de calidad organoléptica del AOVE.
- Aceite de oliva virgen ordinario: es aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresada en ácido oleico, de no más de 3.3 gramos por 100 gramos.

- Aceite de oliva lampante: es un aceite de oliva que tiene una acidez libre, expresada como ácido oleico, de más de 3.3 gramos por 100 gramos, presenta un color y olor prácticamente inadmisibles y un análisis químico con valores inadecuados, por lo que está destinado a refinación o para uso técnico, generalmente se obtiene de aceitunas de suelo que han comenzado un proceso de alteración.
- Aceite de oliva refinado: es un aceite de oliva obtenido mediante métodos de refinación con disolventes orgánicos, que no conducen a alteraciones en la estructura glicérica inicial. Tiene una acidez libre, expresada como ácido oleico, de no más de 0.3 gramos por 100 gramos.
- Aceite de oliva: este aceite es una mezcla de aceite de oliva refinado y AOV. Tiene una acidez libre, expresada como ácido oleico, de no más de 1 gramo por 100 gramos.
- El aceite de orujo refinado: es un aceite obtenido del aceite de orujo de oliva crudo, mediante métodos de refinación que no conducen a alteraciones en la estructura glicérica inicial. Tiene una acidez libre, expresada como ácido oleico, de no más de 0.3 gramos por 100 gramos.
- El aceite de orujo de oliva: es el aceite que comprende la mezcla de aceite de orujo refinado y AOV, aptos para el consumo tal como son. Tiene una acidez libre de no más de 1 gramo por 100 gramos.

Por otra parte, las aceitunas son ampliamente consumidas dentro de la Dieta Mediterránea. Se obtienen a partir de los frutos sanos de variedades de olivo cultivado particularmente aptos para el aderezo, y sometidos a tratamientos u operaciones pertinentes antes de ser ofrecidos para el consumo final. El fruto de la aceituna es una drupa. Tiene bajo contenido de azúcar (2,6-6%) en comparación con otras drupas ($\geq 12\%$), y un alto contenido de aceite, entre 12-30% según la época del año y la variedad. Asimismo, es rica en un compuesto característico, la oleuropeína, que le aporta sabor amargo (Reglamento de Ejecución (UE) n°2016/81903; Convenio Internacional del Aceite de Oliva y las Aceitunas de Mesa)

Las variedades de aceitunas son otro factor a considerar para determinar la calidad de los diferentes tipos de AOV. La principal variedad de aceituna cultivada en España es la Picual y representa el 58.2% de la superficie total de Andalucía, distribuida en las provincias de Jaén, Granada y Córdoba. Por otro lado, la variedad Hojiblanca, representa el 18.1% de la producción total y está distribuida al sur de la provincia de Córdoba, norte de Málaga y sudeste de Sevilla. Otra de las variedades más cultivadas es la Arbequina que destaca por su alto rendimiento y calidad (COI, 2020).

De acuerdo a datos oficiales del año 2019/20 se estima que la producción mundial de AOV, en el año de cosecha agrícola se encuentra en 3 144 000 toneladas, mientras que la producción de los países que forman parte del COI declaran un total de 2 942 500 toneladas anuales, lo cual representa un 93.6% del total de la producción mundial de la campaña agrícola 2019/20 (COI, 2020). La producción en Andalucía durante el período 2009/10-2013/14 fue de 1 100 00 toneladas al año, lo que representa un 80% del total nacional. Específicamente, las dos provincias principales productoras de AOV en la comunidad de Andalucía son Jaén, con un 40% de la superficie cultivada, y Córdoba, con un 24%.

Composición química del aceite de oliva

El AOV está formado por una fracción saponificable, que representa el 98% aproximadamente de su composición, constituida por TAG en los que los AGMI, principalmente ácido oleico (C18:1), que puede oscilar entre el 70-85% de los ácidos grasos, y otros ácidos grasos como el ácido linoleico o palmitoleico presentes en menor cantidad. Los ácidos grasos saturados (AGS) representan un 14% de la composición del AOV, principalmente representado por ácido palmítico y ácido esteárico. En la fracción no saponificable (aproximadamente 2%) se encuentran alrededor de 200 compuestos minoritarios de distinta naturaleza, principalmente compuestos fenólicos y compuestos lipofílicos como el α -tocoferol (vitamina E) (Jímenez-López *et al.*, 2020). Los compuestos fenólicos son responsables de la mayoría de los efectos beneficiosos y propiedades funcionales atribuidas al AOV (Estruch *et al.*, 2018). Asimismo, aportan aroma, color y gusto al aceite, siendo los responsables de sus características organolépticas (Angerosa *et al.*, 2004).

Beneficios del aceite de oliva

Históricamente, el aceite de oliva y los subproductos del olivo, como los extractos de sus hojas, han sido utilizados como remedios tradicionales para el tratamiento de algunas dolencias, tales como la curación de quemaduras, escalofríos, llagas, fortalecimiento de piel y músculos, dolores de estómago, hígado, cabeza, y úlceras, entre otros (Ray *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha demostrado que el AOV tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas, poniendo de manifiesto evidencia científica y epidemiológica que respalda los múltiples beneficios que tiene su consumo (Ray *et al.*, 2015). El AOVE es el componente principal de la Dieta Mediterránea, no solo por su contenido de AGMI, sino también por su alto contenido en compuestos fenólicos. La evidencia clínica sugiere que la Dieta Mediterránea es altamente recomendable para los pacientes con riesgo cardiovascular (Al-Ghamdim, 2018). De hecho, tras revisar las evidencias, la EFSA confirmó que el consumo de 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados (oleuropeína y tirosol), contenidos en 20 mL de AOV, mejora la salud cardiovascular principalmente porque ayuda a prevenir la oxidación del colesterol LDL, y así contribuye a la disminución del riesgo cardiovascular (EFSA, 2012). Posteriormente en 2017, una revisión sistemática concluyó que el consumo de dosis moderadas de AOV como las presentes en la Dieta Mediterránea influye en la expresión de los genes relacionados con la aterosclerosis (Herrera-Marcos *et al.*, 2017).

Del proyecto PREDIMED se han derivado un gran número de estudios diferentes en los que se confirma que la Dieta Mediterránea suplementada con AOVE proporciona una protección considerable frente a la hipertensión arterial. Este estudio demuestra que después de administrar dos tipos de Dieta Mediterránea suplementada con AOVE o nueces se observaron valores más bajos de presión arterial diastólica (PAD) en los sujetos de ambos sexos (Toledo *et al.*, 2013). Asimismo, en otro estudio derivado del PREDIMED en mujeres hipertensas se pone de manifiesto la eficacia en la mejora de la hipertensión arterial (Storniolo *et al.*, 2017) y de la fibrilación auricular (Barrio-López *et al.*, 2019). Además, el consumo

de AOVE acompañado de una Dieta Mediterránea puede disminuir el riesgo de desarrollar DMT2 y la necesidad de tomar medicamentos hipoglucemiantes (Seguí-Díaz, 2014; Basterra-Gortari *et al.*, 2019). Otros beneficios del AOVE que han sido demostrados científicamente, son el aumento del HDL y la ralentización de las primeras etapas del desarrollo de aterosclerosis, gracias a su capacidad para disminuir el estrés oxidativo, la inflamación, y la presión arterial sistólica (PAS), así como la mejora de la funcionalidad endotelial, del control glucémico y por lo tanto del riesgo a desarrollar síndrome metabólico (Yubero-Serrano *et al.*, 2019). Diversas investigaciones señalan que el consumo de AOVE en adultos que padecen DMT2 o con riesgo de padecerla, es beneficioso tanto para la prevención como para el manejo de esta patología, debido a que mejora el metabolismo de la glucosa y la capacidad antioxidante en pacientes con síndrome metabólico (Sureda *et al.*, 2016; Schwingshackl *et al.*, 2017). Los experimentos en modelos murinos también señalan un efecto beneficioso atribuido a la ingesta de AOVE, disminuyendo la hipertensión arterial, mejorando la función endotelial y disminuyendo el estrés oxidativo (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2016).

El aceite de oliva virgen (AOV) es la principal fuente de grasa y es responsable de muchos de los beneficios para la salud atribuidos a este patrón dietético (Tsartsou *et al.*, 2019). Tanto la presencia de ácido oleico como de compuestos bioactivos minoritarios pueden ejercer actividades protectoras, además, se ha descrito que los polifenoles del AOV son los principales componentes bioactivos (Robles-Almazan *et al.*, 2018). Los componentes menores presentes tanto en el AOVE como en los subproductos del olivar, como sus hojas, varían según la variedad, el clima, la madurez de las aceitunas en la cosecha, y el sistema de procesamiento empleado para su elaboración (Baltasar y de las Nieves, 2014). Entre los componentes menores, los más conocidos por sus propiedades antioxidantes, son los compuestos fenólicos, comúnmente llamados “polifenoles”, pero también contiene ácidos triterpénicos característicos, que recientemente están siendo investigados por sus potenciales efectos saludables. Los ácidos triterpénicos se encuentran principalmente en la piel y el hueso de la aceituna, y por lo tanto pasan a formar parte del aceite de orujo y les aportan características organolépticas específicas (Sánchez-Rodríguez y Mesa, 2018). En 2019, una revisión sistemática evaluó el efecto del AOVE con alto contenido de polifenoles (150-800 mg por kg de aceite) en comparación con AOVE con bajo contenido de polifenoles (0-132 mg por kg de aceite), sobre factores de riesgo de ECV, concluyendo que existen evidencias que demuestran mejoras en biomarcadores inflamatorios y en la hipertensión arterial después de la ingesta de aceites ricos en compuestos fenólicos (George *et al.*, 2019).

Actualmente, hay un creciente número de estudios experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales, así como ensayos clínicos de intervención que revelan nuevos aspectos y efectos para la salud en relación con la biodisponibilidad de los principales compuestos fenólicos del aceite de oliva (hidroxitirosol, tirosol, oleuropeína y oleocantal). El hidroxitirosol y la oleuropeína, en el AOVE, son responsables de su peculiar sabor picante y de su alta estabilidad, siendo estos dos de los más importantes por sus efectos antiaterogénicos, cardioprotectores, anticancerígenos y neuroprotectores (Karković

Marković *et al.*, 2019). De manera general, se sabe que los compuestos fenólicos son capaces de reducir la morbilidad y/o ralentizar la progresión de ECV, neurodegenerativas y cancerosas. El mecanismo de acción de los polifenoles se relaciona fuertemente con su actividad antioxidante, que permite disminuir la presencia de especies reactivas de oxígeno en el cuerpo humano (Gorzynik-Debicka *et al.*, 2018).

Hidroxitirosol

El hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol) (Figura 2) es el principal compuesto fenólico del aceite de oliva. Es un alcohol fenólico muy estable, que ha demostrado actividad cardioprotectora, anticancerígena, neuroprotectora, antimicrobiana, y endocrina, entre otros (Karković Marković *et al.*, 2019). La oleuperina (Figura 2) es un éster de ácido elenólico y 3,4-dihidroxifenil etanol, es el glucósido secoiridoide más abundante en las aceitunas y aceites más verdes, y cuya hidrólisis libera hidroxitirosol a lo largo del tiempo de maduración del fruto, y durante la conservación de los aceites (Imran *et al.*, 2018).

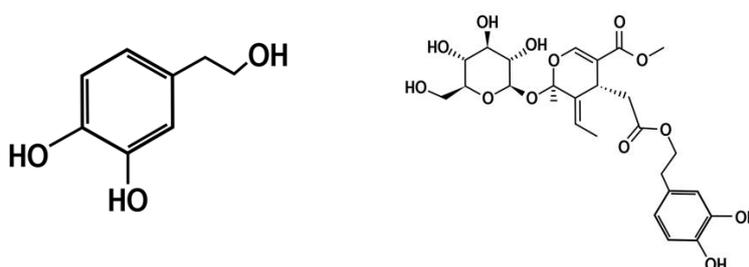


Figura 2. Estructura química del hidroxitirosol y la oleuropeína

Tanto el hidroxitirosol como la oleuropeína son fenoles vegetales capaces de ejercer actividades en el organismo tales como la eliminación de radicales libres y protección contra el daño oxidativo. También se han atribuido al hidroxitirosol actividades antiinflamatorias y antiagregación plaquetaria, como otros mecanismos responsables de sus propiedades cardioprotectoras y neuroprotectoras (Tejada *et al.*, 2017). La declaración de salud aprobada por la EFSA reconoce las propiedades antioxidantes del AOV que contiene al menos 5 mg de hidroxitirosol y sus compuestos relacionados (tirosol y oleuropeína) en 20 g de aceite (EFSA, 2012). Además, el hidroxitirosol puede ejercer cambios en la expresión de factores de transcripción implicados en la proliferación celular (Herrera-Marcos *et al.*, 2017).

Por lo tanto, conseguir un aceite con un contenido elevado de polifenoles puede mejorar sus beneficios. Estudios anteriores han demostrado el efecto cardioprotector del AOV enriquecido en compuestos bioactivos del aceite de oliva en animales (Vázquez *et al.*, 2019) y humanos (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2019). Por otro lado, estudios recientes han demostrado un fuerte efecto ergogénico sobre la actividad física y la remodelación de supercomplejos mitocondriales más eficientes con menor producción de especies reactivas derivadas del oxígeno a dosis de 20 mg/kg y 300 mg/kg de hidroxitirosol (Casuso *et al.*, 2019; Al Fazazi *et al.*, 2018).

La biodisponibilidad del hidroxitirosol radica en su solubilidad en lípidos y en agua, que le permite penetrar fácilmente en los tejidos. Se ha demostrado que los fenoles procedentes del AOVE, concretamente

el hidroxitirosol, pueden absorberse en el organismo independientemente de la dosis ingerida, se metabolizan y se excretan en orina (Gorzynik-Debicka *et al.*, 2018). También se ha observado que la biodisponibilidad del hidroxitirosol es mayor cuando se administra vehiculizado en AOV si se compara con una matriz alimentaria diferente, debido a que el AOVE actúa como un vehículo protector de sus propios fenoles, previniendo su pérdida antes de su absorción en el tracto gastrointestinal (Visioli *et al.*, 2003).

Sus propiedades beneficiosas están estrechamente relacionadas con la capacidad para eliminar radicales libres de oxígeno y nitrógeno, así como para activar los sistemas antioxidantes endógenos del organismo (Gorzynik-Debicka *et al.*, 2018). El hidroxitirosol es capaz de quelar metales y posee una alta eficacia antioxidante que le aporta la estructura *o*-dihidroxifenilo (Visioli *et al.*, 2002). Asimismo, actúa principalmente como rompedor de la cadena de oxidación, al donar un átomo de hidrógeno a los radicales peroxilo que se estabilizan. El radical hidroxitirosol no es reactivo gracias a la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular en el radical fenoxi (Karković Marković *et al.*, 2019). Se ha descrito que el hidroxitirosol tiene potencial terapéutico antiaterogénico y cardioprotector y es muy eficaz para prevenir la peroxidación de lípidos y proteger las LDL de la oxidación (Abdel-Karim, 2016). Aunque los resultados no siempre son coincidentes, algunos autores han descrito que la administración de hidroxitirosol disminuyen la eliminación de isoprostanos en orina, compuestos de tipo prostaglandinas se producen tras la peroxidación de los lípidos y cuya concentración en orina se asocia con enfermedades como hipercolesterolemia y diabetes (Reyna-Villasmil *et al.*, 2016).

Con respecto a la mejora en el perfil de lípidos en sangre, se ha puesto de manifiesto que el hidroxitirosol puede disminuir las concentraciones séricas de colesterol total, TAG y LDL, así como algunos biomarcadores del estrés oxidativo (oxidación de LDL) (Jemai *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2014). Se ha comprobado que la suplementación con hidroxitirosol durante un mes mejora el perfil lipídico en sangre en conejos hiperlipémicos, en los que también se observó una mejora en el estado antioxidante y la disminución del riesgo de desarrollo de aterosclerosis (González-Santiago *et al.*, 2006). El hidroxitirosol también ejerce efectos beneficiosos sobre las HDL, aumentando sus concentraciones en plasma y potenciando sus propiedades antiaterogénicas, ya que mantiene las propiedades fisicoquímicas que a su vez mejoran la funcionalidad de las HDL, especialmente la capacidad de promover la eliminación de colesterol, y por tanto disminuir la incidencia de eventos coronarios relacionados con el desarrollo de aterosclerosis temprana (Rietjens *et al.*, 2007; Berrougui *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2018).

El efecto antiagregante plaquetario del hidroxitirosol se ha demostrado en modelos murinos, en los que su administración ayuda a prevenir la agregación plaquetaria, que es factor implicado en procesos trombóticos, que tiene efectos similares a los del ácido acetilsalicílico (González-Correa *et al.*, 2008). Por otro lado, Catalán *et al.* (2016) demostraron que este compuesto modula las proteínas relacionadas con la proliferación y migración de células endoteliales, mejora la oclusión de los vasos aórticos, y también modula las proteínas relacionadas con la insuficiencia cardíaca en este tejido.

Se ha demostrado que la suplementación con hidroxitirosol disminuye la hipertensión arterial y mejora la disfunción endotelial, gracias a su capacidad para inhibir la activación de este tejido y la adhesión de células monocíticas (Carluccio *et al.*, 2003). Scoditi *et al.* (2014) identificaron el mecanismo protector vascular del hidroxitirosol, que actúa a través de la regulación de las moléculas de adhesión de las células vasculares implicadas en la aterogénesis temprana. Por otro lado, el hidroxitirosol mejora la función endotelial en condiciones inflamatorias al prevenir la disfunción mitocondrial, mejorando la función endotelial, y por lo tanto contribuye así a los beneficios frente a las enfermedades vasculares (Calabriso *et al.*, 2018). De forma similar, se ha descrito que el hidroxitirosol aumenta la función y la biogénesis mitocondrial, es decir, concentraciones relativamente bajas de hidroxitirosol en los adipocitos aumentan la expresión de todos los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, incluida la ATP-sintasa, protegiendo a las mitocondrias frente a la reducción de la síntesis de DNA mitocondrial y modulando la actividad de factores críticos de transcripción, por lo que se sugiere que el hidroxitirosol puede ser usado como un compuesto terapéutico para la prevención y tratamiento de DM2 y obesidad (Hao *et al.*, 2010).

En relación con efectos antidiabéticos, el efecto del hidroxitirosol está relacionado con los efectos reguladores de lípidos y frente a la obesidad. Los ensayos clínicos han demostrado que la ingesta regular de 15 mg/día de hidroxitirosol (cápsulas gastroresistentes) durante 3 semanas modifica los parámetros de composición corporal y modula el perfil antioxidante, la expresión de genes relacionados con la inflamación y el estrés oxidativo en voluntarios sanos (Colica *et al.*, 2017). En 2013, un estudio evaluó el efecto de la administración de 9.67 mg/día hidroxitirosol más 51.1 mg/día oleuropeína durante 12 semanas sobre factores de riesgo cardiovascular modificables por sobrepeso y obesidad, en adultos sanos con sobrepeso. El estudio observó una mejora en la sensibilidad a la insulina y en la capacidad de secreción de las células β pancreáticas, sin embargo, no se observaron cambios en la composición corporal y en el índice de masa corporal (IMC) (de Bock *et al.*, 2013).

La suplementación con hidroxitirosol y oleuropeína (8 y 16 mg/kg de peso corporal de cada compuesto) durante 4 semanas en ratas Wistar con diabetes inducida por inyecciones intraperitoneales de aloxán, demostró una actividad hipoglucemiante capaz de modificar los principales procesos bioquímicos que conducen a la vasculopatía diabética, disminuyendo significativamente las concentraciones séricas de glucosa y colesterol, así como las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y los componentes del sistema antioxidante hepático. Estos resultados sugieren que el efecto antidiabético de la oleuropeína y el hidroxitirosol podría deberse a que su actividad antioxidante restringe el estrés oxidativo, que está ampliamente asociado con la patología y complicaciones de la diabetes (Jemai *et al.*, 2009). En ratas con diabetes provocada por estreptozotocina, el hidroxitirosol disminuye significativamente la proliferación celular en la pared vascular, el estrés oxidativo y nitrosativo, las concentraciones en sangre de LDL oxidada, la molécula de adhesión vascular VCAM-1 y mediadores inflamatorios, la agregación plaquetaria y la producción de tromboxano B₂ que son los principales procesos bioquímicos que conducen a la vasculopatía diabética (López- Villodres *et al.*, 2016).

Diversos estudios ponen de manifiesto que el hidroxitirosol previene el deterioro metabólico, reduciendo la inflamación hepática y restaurando la integridad duodenal en un modelo de rata resistente a la insulina, además de modular el estrés nitrosativo/oxidativo y restaurar la homeostasis de la glucosa (Pirozzi *et al.*, 2016). En ratones con obesidad inducida por dieta, se ha demostrado que el hidroxitirosol puede mejorar la resistencia a la insulina al modular el estrés del retículo endoplásmico, y previene la esteatosis hepática (Wang *et al.*, 2018).

Por otro lado, la administración de hidroxitirosol (20 mg/kg/día) en un modelo de rata con síndrome metabólico durante 8 semanas, provocó una disminución de la adiposidad, una mejora en la tolerancia a la glucosa y la insulina, mejora en la función endotelial y una disminución de la PAS; asimismo disminuyó la fibrosis ventricular y los marcadores de daño hepático (Lemonakis *et al.*, 2017). De forma similar, la administración oral de hidroxitirosol (20 mg/kg/d) en un modelo de ratas Wistar jóvenes disminuyó la esteatosis hepática confirmando su eficacia frente al síndrome metabólico, movilizándolo eficazmente los lípidos hepáticos (Dagla *et al.*, 2018)

Asimismo, el hidroxitirosol ha mostrado mejoras en las funciones neuroprotectoras atribuidas por la reducción del estrés oxidativo a nivel neuronal, protegiendo a las células neuronales frente a la toxicidad inducida por β -amiloide (Rodríguez-Morató, 2015; De las hazas *et al.*, 2018). También se ha observado una asociación inversa entre el consumo de AOV y la prevalencia del deterioro cognitivo (Crespo *et al.*, 2017).

Finalmente, diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado efectos anticancerígenos significativos del hidroxitirosol frente a varios tipos de células malignas, y con diferentes mecanismos de acción propuestos. Se ha demostrado un beneficio eficaz frente a la proliferación celular, el crecimiento celular, la migración, la invasión y la angiogénesis. El hidroxitirosol regula negativamente la expresión de las proteínas BCL-2 y COX-2 y reducen el daño del DNA (Fabiani, 2016). También se ha demostrado que el hidroxitirosol y la oleuropeína inhiben varias etapas de la carcinogénesis del colon: iniciación, promoción y metástasis (Imran *et al.*, 2018), y brindan protección frente a varios cánceres humanos, incluidos el colorrectal, de piel, de mama, tiroides, digestivo, pulmón, cerebro, sangre y cervical (Parkinson y Cicerale, 2016).

En consecuencia, después de confirmar la amplia evidencia científica sobre los beneficios del hidroxitirosol, se confirma que puede ser un compuesto clave en el manejo de diversas enfermedades crónicas (Parkinson y Cicerale, 2016). Además de acuerdo a las acciones y propiedades que tiene este compuesto, actualmente está aceptado como novel food (EFSA, 2017).

El objetivo de uno de los trabajos incluidos en esta Tesis Doctoral es la evaluación de la toxicidad aguda/subaguda, tras 14 días de ingesta, y subcrónica, tras 90 días de ingesta, de un extracto acuoso de AOV rico en hidroxitirosol, según la normativa 408 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE-408), en ratas.

Ácido ursólico (cáscara de manzana como fuente de ácido ursólico)

La Dieta Mediterránea destaca por el contenido de componentes bioactivos, principalmente presentes en alimentos vegetales, como los ácidos triperpénicos. Los ácidos triterpénicos son metabolitos secundarios de las plantas y están presentes principalmente en la piel de las frutas, las hojas y la corteza del tallo.

El ácido ursólico es un compuesto triterpénico pentacíclico natural (1S,2R,4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10S,12aR,14bS)-10-hydroxy-1,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-2,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydro-1H-picene-4a-carboxylic ácido (Figura 3). La presencia de este triterpeno forma parte de la Dieta Mediterránea ya que lo podemos encontrar en la planta del olivo, dónde se encuentra en mayor concentración en la piel, el hueso del fruto y en las hojas, y asimismo, encontramos ácido ursólico en algunas especies vegetales como en la piel de la manzana (*Pyrus malus*), en frutos como la ciruela (*Prunus domestica*), níspero (*Eriobotrya japonica*), arándanos (*Vaccinium myrtillus*), moras (*Morus alba*), en las hojas de café (*Coffea arábica*), en hojas y corteza de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), y en hojas y flores de plantas medicinales tales como albahaca (*Ocimum basilicum*), romero (*Rosmarinus officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*), menta (*Mentha piperita*), mejorana (*Origanum majorana*), tomillo (*Thymus*), y la lavanda (*Lavandula*) (Jäger *et al.*, 2009).

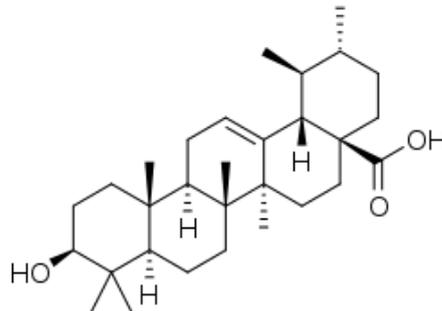


Figura 3. Estructura química del ácido ursólico

Beneficios en la salud del ácido ursólico

En la actualidad, se ha suscitado un creciente interés por el ácido ursólico debido a sus efectos benéficos en varios tejidos y órganos (Figura 4), mejorando la señalización de insulina en los tejidos, disminuyendo la expresión de marcadores de daño cardíaco en el corazón, la atrofia muscular, la inflamación y la señalización apoptótica, y aumentando la termogénesis y la cantidad de antioxidantes en el cerebro y en el hígado, además de tener efectos antiobesidad (Mancha-Ramírez y Slaga, 2016; Seo *et al.*, 2018)

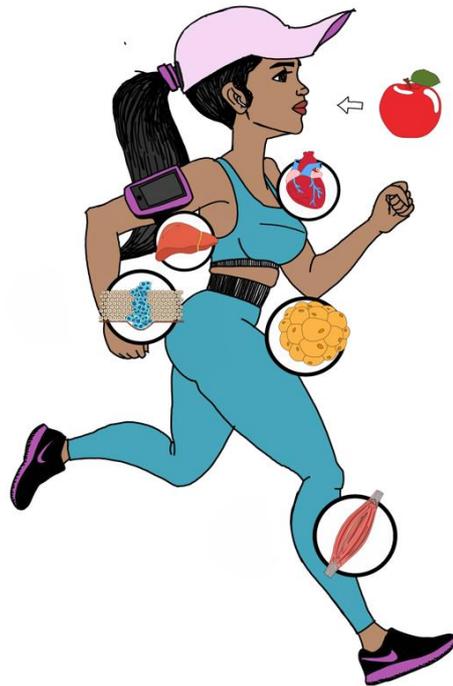


Figura 4. Rol del ácido ursólico en diferentes órganos.

Se han demostrado potenciales efectos en las ECV relacionadas con la suplementación de ácido ursólico en modelos animales. Senthil *et al.* (2007) demostró que la suplementación de ácido ursólico (60 mg) durante 7 días, mejora el perfil lípido y disminuye la peroxidación lipídica (sustancias reaccionantes al ácido tiobarbitúrico, TBARS) y las concentraciones séricas de proteínas unidas a membrana. El ácido ursólico contribuye a la restauración de la actividad de las enzimas cardioprotectoras creatinina kinasa MB (CK-MB) en ratas, lo que sugiere una protección frente a la isquemia cardíaca (Rhadiga *et al.*, 2012). Además, puede disminuir la frecuencia cardíaca en reposo y biomarcadores de fatiga, lactato y lactato deshidrogenasa (LDH) (Bang *et al.*, 2017).

Del mismo modo, se ha demostrado que el ácido ursólico puede contribuir a la prevención de varias enfermedades cerebrales, ya que inhibe el estrés oxidativo y la excitotoxicidad (Zhang *et al.*, 2014). En el hígado, disminuye las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las concentraciones de TBARS (Yang *et al.*, 2016). En células cancerosas, disminuye la proliferación y el volumen y tamaño del tumor (Li *et al.*, 2017).

Al mismo tiempo, se encontró una disminución de la adiposidad, peso corporal, y en las concentraciones de glucosa y colesterol en ayunas (Jeong *et al.*, 2015). El tratamiento con ácido ursólico favorece la función de la insulina, protege frente a desordenes metabólicos, como el aumento del estrés oxidativo sistémico, y disminuye la producción de mediadores de inflamación tales como el factor de

necrosis tumoral α (TNF α), la quimocina (C-C motif) ligando 2, proteína quimioatrayente de monocitos-1, interleucina (IL)-1 beta, IL2, IL6 y IL8 (Yie *et al.*, 2015).

Finalmente, el ácido ursólico carece de toxicidad, por lo que este componente está siendo estudiado para justificar su uso en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales (García *et al.*, 2016). Actualmente, el ácido ursólico está autorizado por la Comisión Europea como un componente de aromas para productos alimenticios y de los materiales de base para su producción, en el ámbito de aplicación de la Directiva 88/388/CEE del Consejo de 22 de junio de 1988, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros referente al uso de aromas (González Vaqué, 1991).

Ácido Ursólico y Masa Muscular

Algunos estudios han demostrado que el ácido ursólico contribuye a la pérdida de peso y al aumento del gasto energético muscular, activando la síntesis de proteínas e inhibiendo la atrofia muscular, el envejecimiento y la pérdida de masa muscular asociada a denervación (Kunkel *et al.*, 2011; Milan *et al.*, 2015). Kunkel *et al.* (2011) describió que el tratamiento intraperitoneal con 25 mg/mL de ácido ursólico ayuda al mantenimiento de la masa muscular y al incremento del diámetro de las fibras musculares, y provoca un aumento de la secreción de factor de crecimiento análogo de la insulina (IGF-I). Los datos disponibles hasta el momento sugieren que el ácido ursólico aumenta la sensibilidad de los receptores a la insulina y al IGF-1 en el músculo esquelético, lo que activa la fosforilación de la familia de proteínas Akt1 y Akt2, claves en las rutas de síntesis proteica (anabolismo), de hipertrofia muscular (crecimiento de tejido) y del transporte intracelular de glucosa (Kunkel *et al.*, 2011). Además, en el músculo esquelético disminuye la actividad CK (Chen *et al.*, 2017), a la vez que aumenta la liberación de hormona del crecimiento y del factor análogo de la insulina (IGF-1) al torrente sanguíneo (Bakhtiari *et al.*, 2007).

Algunos experimentos llevados a cabo *in vitro* en células musculares de mioblastos C2C12 demostraron que el ácido ursólico favorece la activación de proteína quinasa activadora de monofosfato de adenosina (AMPK) y otras moléculas involucradas en la β -oxidación de los ácidos grasos libres. Además, la proteína UCP3 en el músculo esquelético activa la AMPK y aumenta ATP, sugiriendo que el ácido ursólico quema ácidos grasos libres por la activación de la β -oxidación dependiente de AMPK y activa el gasto energético (Rao *et al.*, 2011).

El ácido ursólico activa adicionalmente la proteína mTOR, componente del complejo funcional mTORC1, y la S6K, clave del inicio de la traducción proteica, la síntesis de proteínas del músculo y el crecimiento celular (Kunkel *et al.*, 2012). La suplementación con ácido ursólico en grupos experimentales de ratones sometidos a ejercicio físico estimula un mecanismo de mantenimiento de la activación específica de dicho complejo mTORC1 inducida en ejercicios de resistencia (Ogasawara *et al.*, 2013). Es importante señalar que el ácido ursólico promueve directamente la síntesis de proteínas afectando a la proliferación de mioblastos (Figueiredo *et al.*, 2012).

Se ha puesto de manifiesto, que el ácido ursólico puede potenciar el rendimiento físico. Un estudio realizado en roedores con obesidad señaló que el tratamiento intraperitoneal con ácido ursólico (200 mg/kg) durante 7 días, aumentaba la expresión de sirtuina 1 y la PGC1 α , responsable de la biogénesis mitocondrial en el recto femoral, el tibial, gastronemio y glúteo, aumentando la proliferación de las células satélite. Además, los autores observaron que el ácido ursólico estimuló la expresión de la mioglobina (proteína responsable del transporte de oxígeno) y aumentó la cantidad de fibra de tipo IIA (fibra intermedia oxidativa/glicolítica), que son más resistentes a la fatiga (Bakhtdari *et al.*, 2015).

Por otro lado, se ha descrito en modelos murinos que la suplementación con 0.27% de ácido ursólico añadida a la dieta durante 17 semanas mejora la capacidad física de los animales y disminuye la frecuencia cardíaca en reposo, comparado con el ejercicio por sí solo, debido al aumento de la hipertrofia muscular, mediada por la estimulación de la vía Akt del músculo, y al aumento del tamaño de las fibras musculares de contracción rápida y de las fibras oxidativas de contracción lenta (Kunkel *et al.*, 2012). Otro estudio realizado en ratones demostró que el tratamiento con ácido ursólico durante 12 semanas aumentaba el rendimiento de manera dosis dependiente (75, 150 y 300 mg/kg). Además, el aumento de la fuerza muscular y la disminución de la fatiga se confirmaron mediante pruebas de resistencia, mayor tolerancia al ejercicio (en minutos) y mayor distancia (metros). Los parámetros bioquímicos mostraron que las concentraciones de lactato, la actividad enzimática de LDH, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina eran menores con respecto al grupo control. Estos hallazgos ponen de manifiesto que además de mejorar el rendimiento, el ácido ursólico puede ser eficaz para controlar la fatiga muscular (Jeong *et al.*, 2015).

En humanos sanos sometidos a un entrenamiento de fuerza, la suplementación con ácido ursólico (450 mg vía oral) durante 8 semanas, produjo una disminución en el porcentaje de grasa corporal, aunque el IMC, la masa magra corporal y los niveles de glucemia e insulina apenas variaron en comparación con un grupo control suplementado con placebo. Adicionalmente, las concentraciones plasmáticas de IGF1 e irisina, y la fuerza muscular isocinética máxima (medido con dinamómetro), aumentó significativamente con respecto al grupo control. Estos hallazgos sugieren que la elevación de la irisina sérica inducida por el ácido ursólico puede mediar la mejora de la fuerza muscular esquelética durante el entrenamiento de fuerza (Bang *et al.*, 2014). Asimismo, se ha demostrado que la suplementación con ácido ursólico mejora la capacidad de ejercicio y tiene efectos beneficiosos sobre la resistencia cardiopulmonar y la fuerza muscular (Cho *et al.*, 2016). Sin embargo, se necesitan más investigaciones para confirmar los mecanismos moleculares que median la mejora de la capacidad para la realización de ejercicio inducida por ácido ursólico.

A pesar de la evidencia disponible acerca del efecto del ácido ursólico en la mejora de la capacidad de ejercicio, la resistencia pulmonar y la fuerza muscular, son necesarios más investigaciones para dilucidar aún más los mecanismos de acción de este componente.

Ácido ursólico y tejido adiposo

La adiposidad tiene una acción directa sobre la masa de músculo esquelético, disminuyendo la síntesis proteica y provocando una atrofia muscular inducida por inflamación. Dado que la contracción muscular es crucial para la homeostasis interna del organismo y el control de la función metabólica, dicha acción se considera importante para el mantenimiento de la salud. Adicionalmente, la obesidad y una baja masa muscular ocasionan una disminución de la fuerza con un riesgo prominente de fragilidad física y dependencia en la función locomotriz, lo que acarrearía una mayor predisposición a ganar peso (Katashima *et al.*, 2017). Se ha descrito que la incorporación del ácido ursólico en la dieta y su consumo diario, puede inducir la reducción de adiposidad, acompañada de efectos adicionales beneficiosos como el aumento en la relación de grasa parda y la reducción de las concentraciones de glucosa y lípidos en plasma (Feng *et al.*, 2020).

La inclusión de ácido ursólico en la dieta produce una reducción de grasa blanca y un aumento de la proporción de grasa parda, aumentando la tasa de gasto energético que proporciona protección frente a la obesidad. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito el mecanismo de acción implicado, a pesar de que el tejido graso marrón y el músculo esquelético derivan de las mismas células precursoras y comparten las rutas de señalización de insulina e IGF-I, que desempeñan un papel crucial en el control del desarrollo de las grasas blanca y parda (Boucher *et al.*, 2012). En el tejido adiposo, el ácido ursólico aumenta los receptores de insulina, la actividad Akt y disminuye la masa adipocitaria.

En varios estudios se ha descrito un aumento de la función de la grasa parda y, por lo tanto, un aumento del gasto energético corporal inducido por ácido ursólico. El control de la termogénesis corporal se produce acorde a la ingesta de alimento y al gasto energético. Dicha termogénesis viene determinada principalmente por el funcionamiento del sistema nervioso simpático y varias hormonas como la leptina y la noradrenalina, que juegan un papel muy relevante en la homeostasis corporal (López-Fontana *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha evidenciado que la oxidación de las grasas, especialmente ácidos grasos saturados, estimula vías inflamatorias que conducen a una ruptura de las señales termogénicas sensibles a hormonas anorexigénicas o termogénicas, como la leptina, hormona tiroidea o péptido similar al glucagón (GLP), en el sistema nervioso central, lo que conduce a un aumento del IMC (Drucker, 2001). Sin embargo, la identificación de alimentos que puedan ayudar a aumentar el gasto energético es considerado como un posible objetivo terapéutico, en base a que una optimización del gasto energético podría estimular la grasa parda, promocionando de este modo la producción de calor y el gasto de energía a través del aumento de la termogénesis por la sobreexpresión de proteína desacoplante 1 (UCP1) (Boström *et al.*, 2012). Un estudio demostró que los animales tratados con ácido ursólico (0,5%) en su dieta durante 6 semanas redujeron su peso corporal y las concentraciones de TAG, acompañados de un incremento del gasto energético a través de la β -oxidación de ácidos grasos libres (Rao *et al.*, 2011). En un estudio realizado en ratones con obesidad inducida por la ingesta de una dieta rica en grasa, y que provoca una esteatosis hepática e intolerancia a la

glucosa, la suplementación con ácido ursólico al 0.27% durante 6 semanas, provocó un aumento del gasto energético y de la expresión de la proteína UCP1 en la grasa parda (Kunkel *et al.*, 2012).

El ácido ursólico ha suscitado gran interés por su actividad antiobesidad. En 2012, Kunkel *et al.* demostraron una menor adiposidad (grasa epididimaria) en ratones alimentados con una dieta estándar suplementada con un 0.14% de ácido ursólico durante 7 semanas, así como un incremento de la fosforilación de PKB/Akt que podría inducir un aumento en la captación de glucosa por el músculo. Estos efectos podrían sugerir un efecto beneficioso del ácido ursólico en la reducción de los niveles de glucemia y la diabetes. Resultados similares se obtuvieron cuando los ratones fueron tratados con una dieta suplementada con un 0.27% de ácido ursólico durante 5 semanas, observándose una reducción de la adiposidad y las concentraciones de leptina (Kunkel *et al.*, 2012). Posteriormente, se evaluó su efecto sobre el peso corporal y las concentraciones de glucosa insulina y leptina en sangre, en ratones con obesidad inducida por dieta rica en grasas con una dosis de 10 mg/kg al día durante 20 semanas. De manera interesante, el grupo tratado con el ácido ursólico mostró una menor ganancia de peso, y menores niveles de leptina, insulina y glucemia con mejoría de la resistencia a la insulina y trastornos metabólicos (Yan-Xiang *et al.*, 2013). Se ha descrito que ratones con obesidad inducida con dieta rica en grasa y suplementada con distintas cantidades de ácido ursólico (0.125%, 0.25% o 0.5%) durante 6 semanas, mostraban un menor peso corporal, esteatosis y daño hepático, acompañado de un incremento de PPAR α en hígado (Li *et al.*, 2014). Adicionalmente, resultados similares se observaron *in vitro*, demostrando el papel del PPAR α en la mejoría de la esteatosis hepática en presencia de ácido ursólico en células hepáticas humanas HL-7702 (He *et al.*, 2013).

Aunque se han demostrado abundante evidencia del papel del ácido ursólico frente a la obesidad y sus comorbilidades, también se han demostrado efectos beneficiosos en numerosas otras patologías como la inhibición del crecimiento tumoral, atenuación de sepsis, envejecimiento, HIV, inflamación y artritis reumatoide (Zhang Y *et al.*, 2020). A pesar de que el ácido ursólico desempeña un papel importante en las enfermedades crónicas, comprender cómo interactúan, así como los beneficios en la regulación de la termogénesis corporal y la adiposidad es de gran interés para el desarrollo de estrategias nutricionales destinadas a combatir los trastornos metabólicos relacionados con el exceso de peso (Tseng *et al.*, 2010)

El objetivo de uno de los trabajos incluidos en esta Tesis Doctoral es la evaluación de efecto del consumo de ácido ursólico sobre la reducción de la grasa y la hipertrofia muscular en Humanos.

Chía (*Salvia hispánica*)

En la actualidad, el creciente interés mundial sobre la salud pública ha dado lugar a la demanda de alimentos funcionales con múltiples beneficios para la salud, con la finalidad de ayudar a disminuir el riesgo a padecer ECV. Los beneficios de los alimentos funcionales se deben principalmente a la presencia de ingredientes activos. Un ejemplo de estos alimentos es la Chía (*Salvia hispánica* L.), que ha sido un alimento indispensable para la población desde las culturas mesoamericanas hasta la actualidad, gracias a que es una de las principales fuentes vegetales de (AGPI) especialmente por su contenido en ácidos grasos omega 3, proteínas de alta calidad, fibra dietética, vitaminas, minerales y una amplia gama de polifenoles que le otorgan un gran potencial antioxidante y puede catalogarse como un alimento completo y saludable (Rovati *et al.*, 2012).

Chía es el nombre común de algunas especies pertenecientes al género *Salvia* (Foto 1), entre las que destacan *Salvia columbariae*, *Salvia hispánica* y *Salvia polystachya*. La *S. hispánica* debe su nombre a *Carolus Linnaeus* (1707-1778), quien la encontró creciendo de forma silvestre en el nuevo mundo (Edwards, 1819). Sin embargo, la chía es nativa de México y fue introducida en España después de que Hernán Cortés se estableciera en ese país (Ortiz de Montellano, 1978). La semilla de la chía (*S. hispánica* L.) tiene un especial significado en América Latina, principalmente porque ha sido consumida desde la antigüedad por los pueblos mesoamericanos y su nombre se atribuye a estas poblaciones.



Foto 1. Semillas de *Salvia hispánica* L.

La semilla de chía ha sido cocinada como semilla entera, harina de semilla, mucílago de semilla y aceite de semilla. Varios autores han destacado la importancia del uso de la chía como ingrediente de bebidas y alimentos en el México precolombino (Cahill, 2003). Según Fray Juan de Torquemada, la práctica común de tostar y moler las semillas para producir harina, conocida como Chianpinolli, imitaba el procesamiento de los granos de maíz y a menudo ambos granos se procesaban simultáneamente. El

chianpinolli se incorporó a tortillas, tamales y varias bebidas aztecas conocidas como chianatoles (Cahill, 2003). Para los aztecas, la cosecha de chía era tan importante como el maíz, y junto con las semillas de amaranto estos cultivos eran muy apreciados. Basándose en un gran número de registros y publicaciones, Cahill (2003) ha recogido las pruebas de la importancia que tenía la chía para los habitantes precolombinos de Mesoamérica. Este autor ofrece una excelente revisión y análisis de diversas fuentes, que incluyen documentos anteriores y posteriores al año 1600, entre los que se encuentran códices del siglo XVI, escritos de naturalistas, estudios etnográficos y especímenes de herbario con información etnobotánica. Asimismo, este autor cataloga y describe el uso de la chía en la medicina popular, la preparación de alimentos, así como en cuestiones artísticas y religiosas.

Las interacciones planta-hombre de la especie *S. hispánica* tienen una larga historia. La domesticación y la selección humana de esta planta dieron lugar a cambios en la morfología de las semillas de chía (Cahill y Ehdaie 2005), y la diversidad genética entre las distintas variedades de *S. hispánica* ha sido ampliamente documentada (Cahill y Ehdaie, 2005; Cahill y Provance, 2002; Joseph, 2004). La semilla consta de tres partes principales: la cubierta, el embrión y el endospermo. La testa o capa sirve de capa protectora del embrión y contiene el mucílago, una sustancia polisacárida que se hincha al entrar en contacto con el agua formando una cápsula pegajosa y gelatinosa alrededor de la semilla que está fuertemente adherida a ella. La función real del mucílago se desconoce, sin embargo, se cree que su presencia regula la pérdida de agua de la semilla, lo que permite a la planta crecer en regiones áridas (Ting *et al.*, 1990). Aunque la planta crece mejor en regiones tropicales y subtropicales, las plantas de chía también pueden cultivarse en climas templados (Ayerza y Coates, 2004).

Las semillas de chía son pequeñas, de aproximadamente un par de milímetros de longitud, y tienen una forma ovalada y ligeramente aplanada con una relación anchura/grosor de aproximadamente 1/3, y la humedad relativa ambiental varía de acuerdo a la especie y a la zona donde se cultive (Muñoz *et al.*, 2012; Porras-Loaiza *et al.*, 2014). Normalmente, las semillas son muy estables a las condiciones de almacenamiento, ya que no son altamente higroscópicas (Moreira *et al.*, 2012). Como resultado del cultivo y la domesticación, la *S. hispánica* ha sufrido varios cambios en las características cualitativas, incluyendo el color de la cubierta de la semilla, la pigmentación del tallo y el desgranado. El color habitual de la chía es gris con manchas oscuras, y se sabe que un único gen recesivo, designado como *SSC*, controla el color blanco característico de la semilla, mientras que un único gen dominante, conocido como *SSP*, es el responsable de controlar la pigmentación estriada del tallo (Cahill y Provance, 2002). Porras-Loaiza *et al.* (2014) describieron algunas propiedades físicas y características químicas de las semillas de chía de cuatro regiones diferentes de México, y describieron que la distribución del tamaño de la semilla no se ve afectada significativamente por la región de origen, siendo similares los valores de longitud (2.03-2.10 mm), ancho (1.27-1.32 mm), grosor (0.77-0.81 mm) y superficie (4.95-5.42 mm²) de la semilla.

Composición de la semilla de chía

Aunque las hojas de las plantas de chía tienen un potencial interés comercial por su composición, las semillas son la parte más atractiva, fundamentalmente por su contenido en proteínas, fibra, antioxidantes y ácidos grasos insaturados omega-3 (Bushway *et al.*, 1981; Taga *et al.*, 1984). La composición de la semilla es variable y depende de la especie y región donde crece (Ayerza, 1995). No obstante, Porrás-Loaiza *et al.* (2014) describieron pequeñas fluctuaciones de nutrientes entre semillas cultivadas en diferentes regiones de México. Las semillas tienen un alto contenido en proteínas (18.5-22.3%), grasas (21.5-32.7%) y fibra (20.1-36.1%). Según sus propiedades fisicoquímicas, el aceite, está compuesto principalmente por ácidos grasos insaturados (Velasco *et al.*, 2004), y la relación entre los ácidos grasos omega-3 y omega-6 encontrados en las semillas de chía fue de 3:1 (Porrás-Loaiza *et al.*, 2014). El departamento de agricultura de Estado Unidos (USDA) describe que la semilla de chía contiene aproximadamente un 5.80% de humedad, un 16.54% de proteínas, un 30.74% de lípidos totales, un 34.40% de fibra dietética total, un 42.12% de carbohidratos totales, calcio (714 mg/100g), fósforo (1067 mg/100g), potasio (700 mg/100g) y magnesio (390 g/100 g), además las semillas de chía son una buena fuente de niacina (6.13 mg/100g) y vitamina A (44 IU/100g) (USDA, 2004). Asimismo, la chía es un producto sostenible y respetuoso con el medio ambiente, puede ser almacenada durante años sin alterar su contenido nutricional, sabor, ni olor. En consecuencia, es un producto ideal para enriquecer productos alimentarios y para su uso como materia prima en alimentos funcionales (Fernández, 2010).

Lípidos en la semilla de chía

La naturaleza de los lípidos presentes en la chía ha sido ampliamente documentada en la literatura. Sin embargo, hay algunas deferencias en la composición y el contenido de ácidos grasos específicos, ya que depende en gran medida de la especie y de las condiciones agronómicas del cultivo. Por ejemplo, algunas fuentes (USDA, 2004) informan que la semilla tiene una proporción 2:1 de ácidos palmítico (16:0) y esteárico (18:0), 2.3% de ácidos grasos monoinsaturados en una proporción 5:1 de ácidos oleico (18:1 n9) y palmitoleico (16:1 n9), y 23.7% de AGPI. La semilla de chía contiene cantidades significativas de los ácidos grasos esenciales alfa-linolénico (ALA; 18:3 n3) y ácido linoleico (AL; 18:2 n6) (Morales *et al.*, 2012). Estos ácidos grasos esenciales deben ser ingeridos como parte de la dieta, y en el organismo son precursores metabólicos de un grupo de ácidos grasos más elongados que juegan un papel importante en el organismo, siendo el AL el precursor del ácido araquidónico (AA) y el ALA el precursor de los ácidos grasos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA). El AL y el AA pertenecen a la serie de los ácidos grasos omega-6 (n6), mientras que el ALA y sus derivados metabólicos (EPA y DHA) corresponden a los ácidos grasos de la serie omega-3 (n3). El AA y EPA son precursores de una serie de eicosanoides mediadores de la inflamación, vasoconstricción y coagulación. El AL y ALA compiten por las enzimas de desaturación (Δ -5 y Δ -6) y elongación, favoreciendo el metabolismo del ácido graso con mayor grado de

instauración, en este caso el ALA. Esto conlleva una disminución de la biosíntesis de AA (molécula con una actividad proinflamatoria más potente que el EPA), y de la relación ácidos grasos omega-6/omega-3, que se relaciona con un mayor riesgo cardiovascular (Suri *et al.*, 2016) en la naturaleza la disponibilidad de ALA se limita a unos pocos aceites vegetales como el de chía, canola y soja, mientras que el EPA y DHA se encuentran en pescados grasos o azules. Cabe señalar que el consumo de estos alimentos ricos en ALA no es en general elevado, lo que ocasiona una baja ingesta de estos ácidos en relación a sus requerimientos (IDR_{Omega-3}: 1.1-1.5 g/día; IDR_{Omega-6}: 2-7g/día) (Gil A, 2014). En este sentido, hoy en día, las semillas de chía son consideradas como una fuente vegetal rica en omega-3, y constituyen una forma fácil y accesible para lograr los múltiples efectos saludables atribuidos a estos ácidos grasos (Cotin *et al.*, 2011; Musa-Veloso *et al.*, 2011).

Proteínas de la semilla de chía

El contenido en proteínas de las semillas de chía oscila entre el 16 y el 23%, dependiendo de la zona geográfica en la que se haya cosechado. Este contenido es más alto en comparación con otros granos y cereales que normalmente tienen menos del 16%. Es importante mencionar que la cantidad de proteínas puede variar según la fuente botánica, la variedad de la planta, el método de extracción, entre otros factores (Vázquez-Ovando *et al.*, 2010). La proteína de la chía tiene una buena digestibilidad (78.9%), similar a la de la caseína (88.6%) (Sandoval-Oliveros y Paredes López, 2013). El valor de digestibilidad de la proteína de chía es un indicador general de la calidad nutricional de sus componentes y puede estar asociado a las estructuras químicas que la hacen más o menos susceptibles a las enzimas proteolíticas (López *et al.*, 2018).

El contenido de aminoácidos de la proteína obtenida de la chía es más completo que el de la proteína de otros granos (Ayerza y Coates, 2001). Las semillas de chía contienen todos los aminoácidos esenciales para los humanos, como es la isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, histidina y valina (Sandoval-Oliveros y Paredes-López, 2013). Olivos-Lugo *et al.* (2010) evaluaron el perfil de aminoácidos, la puntuación química y las pruebas de digestibilidad *in vitro* de la chía, y demostraron que la proteína contenía altas cantidades de ácido glutámico (123 g/kg de proteína cruda), arginina (80.6 g/kg de proteína cruda) y ácido aspártico (61.3 g/kg de proteína cruda). En general las proteínas de origen vegetal son una buena fuente de aminoácidos esenciales (Montoya *et al.*, 2015), sin embargo, el perfil de aminoácidos esenciales de la chía es deficiente en lisina respecto a las normas propuestas por la OMS (FAO/OMS/UNU, 1985) para los niños en edad preescolar. Por lo tanto, la chía no se recomienda como única fuente dietética de proteínas, y sería necesario complementarla con una fuente rica en lisina.

Por otro lado, se han estudiado las propiedades funcionales de la semilla de chía y se ha observado la capacidad de retención de agua, de gelificación y de formación de espuma, así como de retención de aceite que tiene esta semilla, esta capacidad podría estar asociada con la presencia de mucilago, que actúa como fibra soluble, capaz de mantener el agua dentro de su matriz (Hernández-Jardón, 2007). Se ha establecido

que el aislado de proteína de chía tiene una excelente capacidad de retención de aceite (4.04 g/g), lo que lo convierte en un posible aditivo en productos de panadería y emulsiones alimentarias debido a que las proteínas tienen la capacidad de formar películas elásticas cuando se incorpora glicerol o sorbitol como plastificante (Olivos-Lugo *et al.*, 2010).

Vázquez-Ovando *et al.* (2013) realizaron un estudio sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales de una fracción rica en proteínas obtenida de las semillas de *S. hispánica* por fraccionamiento en seco, describiendo una actividad emulsionante del 50-56%, concluyendo que las semillas de chía pueden ser un aditivo alimentario y se puede utilizar como estabilizante de emulsión o de espuma.

Compuestos bioactivos de la semilla de chía

Entre la diversidad de compuestos que pueden estar presentes en todas las variedades de semillas de chía, los antioxidantes son sin duda algunos de los más importantes. La producción de radicales libres, está regulado por diferentes rutas metabólicas debido a que representa la primera línea de defensa de los seres vivos, por tanto, un desbalance entre antioxidantes endógenos y radicales libres (estrés oxidativo) se puede relacionar con patologías y envejecimiento (Coronado *et al.*, 2015). Los antioxidantes presentes en la chía son de naturaleza fenólica y pueden estar en forma libre o unidos a azúcares mediante enlaces glucosídicos, lo que aumenta su solubilidad en agua. Con respecto a la función antioxidante de los polifenoles, la evidencia indica que poseen una amplia gama de actividades biológicas, entre las que se encuentran, la capacidad para la modulación de enzimas, quelación metálica, efectos sobre vías de señalización y expresión de genes, protección contra radicales libres, entre otras (Ali *et al.*, 2012). La identidad de los principales antioxidantes está bien documentada en la literatura. Los compuestos fenólicos más importantes son los ácidos clorogénicos, cafeico, ferúlico y cumárico, así como los flavonoides miricetina, quercetina y kaempferol (Ayerza y Coates, 2001). La evidencia científica indica que la quercetina, el ácido caféico y el ácido clorogénico tienen una fuerte actividad frente a radicales libres y procesos oxidativos inhibiendo la peroxidación lipídica (Makris, 2001), mientras que la miricetina y quercetina seguidas por el kaempferol son los flavonoides con mayor actividad neutralizadora de radicales libres (Rodrigo *et al.*, 2011). Por otra parte, los tocoferoles son de gran importancia biológica debido a sus propiedades antioxidantes y a su efecto protector frente a enfermedades degenerativas y la peroxidación lipídica (Jiménez *et al.*, 2013).

En este sentido, el conocimiento actual acerca de los beneficios del consumo de antioxidantes naturales ha llevado a un aumento considerable no sólo en el consumo de la semilla de chía sino también al estudio de sus compuestos bioactivos. Un estudio realizado en México, en los estados de Jalisco y Sinaloa, evaluó el contenido total de compuestos fenólicos de las semillas de ambos orígenes, y describió un total de 0.92 ± 0.04 para las semillas de Jalisco y 0.88 ± 0.01 mg/g de extracto de semilla de chía para las de Sinaloa. En esta última los flavonoles se encontraban en mayor cantidad (0.59 mg/mL de extracto crudo y 0.65 mg/mL de extracto hidrolizado) que en las de Jalisco (0.38 mg/mL de extracto crudo y 0.43 mg/mL de extracto hidrolizado). Es más probable que los principales compuestos fenólicos de los extractos crudos sean

una mezcla de glucósidos de quercetina y kaempferol, predominando las formas agliconas en los extractos hidrolizados. Los ácidos clorogénico y cafeico sólo están presentes en pequeñas cantidades en los extractos crudos no hidrolizados, probablemente porque estos ácidos son sensibles a las condiciones de hidrólisis. Además, los extractos analizados de semillas de chía no contenían antocianinas (Reyes-Caudillo *et al.*, 2008).

La actividad antioxidante de los extractos de chía se ha evaluado mediante el cribado de la actividad antioxidante del catión radical del ácido 2.20-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (radical ABTS+), el sistema modelo del ácido β -caroteno-linoleico (β -CLAMS) y los ensayos del sistema de peroxidación *in vitro* de los liposomas. Los resultados muestran que los extractos crudos tienen una actividad antioxidante similar al antioxidante comercial Trolox[®] utilizado como referencia (Reyes-Caudillo *et al.*, 2008). En el mismo trabajo, los autores demostraron por primera vez que diferentes concentraciones de polifenoles de los extractos hidrolizados y crudos de semillas de chía pueden mostrar un efecto antioxidante en una emulsión alimentaria modelo de agua en aceite.

Posteriormente, Martínez-Cruz y Paredes-López (2014) analizaron la semilla de chía (*S. hispánica L.*) para determinar los compuestos fenólicos totales, la actividad antioxidante y la cuantificación de los ácidos fenólicos y las isoflavonas mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución. Los compuestos fenólicos identificados y cuantificados en los extractos de chía fueron los ácidos rosmarínico, protocatéquico, cafeico y gálico y la daidzina. Además, también se detectaron el ácido ferúlico, la genistina y la genisteína. Entre los compuestos descritos, el ácido rosmarínico fue el antioxidante más abundante (0.927 mg/g). Además, también se identificó la presencia de glicina. En resumen, este estudio demuestra que la semilla de chía tiene una alta capacidad antioxidante y representa una nueva fuente de isoflavonas que podría incorporarse a la dieta humana.

Semilla de chía como alimento funcional

El interés por la semilla de chía ha crecido debido a sus reconocidos atributos y propiedades como buena fuente de diferentes componentes como ácidos grasos insaturados, proteínas, antioxidantes, fibra dietética y componentes bioactivos que la hacen ahora atractiva en todo el mundo como un alimento funcional con un claro impacto sobre la salud. (de la Paz-Salgado-Cruz *et al.*, 2014). La chía puede considerarse como un "alimento funcional" porque además de contribuir a la nutrición humana, ayuda a aumentar el índice de saciedad, previene las ECV, la diabetes, y los trastornos inflamatorios y del sistema nervioso, entre otros. Hoy en día, la semilla de chía ofrece un enorme potencial para la salud y la alimentación, y está siendo utilizada para la preparación de productos farmacéuticos, nutracéuticos y los piensos para alimentación animal, debido a sus componentes funcionales (Múñoz *et al.*, 2013).

En el año 2000, las Guías Alimentarias de EE.UU. recomendaron que la semilla de chía puede utilizarse como alimento principal sin superar los 48 g/día. La chía se consume comúnmente en forma de ensalada a partir de los brotes de chía, en bebidas, cereales y aderezos para ensaladas a partir de la semilla,

o también puede consumirse cruda. La Comisión Europea aprobó el uso de semillas de chía en productos de panadería con un límite máximo del 5%. Aparte del pan, la industria alimentaria de varios países del mundo, como Estados Unidos, Canadá, Chile, Australia, Nueva Zelanda y México, ha utilizado ampliamente las semillas de chía o su aceite para diferentes aplicaciones, como cereales para el desayuno, barras, aperitivos de galletas, zumos de frutas, pasteles y yogures (Norlaily *et al.*, 2012).

Considerando que la principal causa de muerte en el mundo son las ECV (OMS, 2015), se ha descrito que las semillas de chía tienen una actividad cardioprotectora en gran parte debido a su contenido en ALA, en fibra dietética, en tocoferoles y en polifenoles (Ferreira *et al.*, 2015). Estos componentes, descritos en la semilla, desempeñan un papel importante en la formación de compuestos bioquímicos vitales tales como prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos que intervienen en numerosos procesos como la inflamación o la hipertensión. También mejora la frecuencia cardíaca y protegen de la arritmia ventricular (Abedi y Sahari, 2014).

Se han descrito varios mecanismos por los que los ácidos grasos omega-3 podrían resultar beneficiosos a nivel cardiovascular: anti-inflamatorio, anti-trombótico y anti-arrítmica, evitan la adherencia de plaquetas en las arterias, y contribuyen en la disminución de la presión sanguínea y a la reducción de la concentración de TAG en plasma (Farré y Macaya 2006). Los omega-3 y 6 son precursores de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos (sustancias que participan en diferentes actividades como anticoagulantes y antiagregantes (Losoya *et al.*, 2017). Los ácidos grasos presentes en la semilla de chía han demostrado efectos que podrían también ayudar a la prevención de las ECV, mediante la disminución de las concentraciones plasmáticas de factores de crecimiento y moléculas de adhesión, lo que favorece la reducción de la proliferación de células del músculo liso en la parte interior de la pared vascular, y retrasa el proceso aterosclerótico (De la Sancha, 2019). En 2021, un metaanálisis demostró el consumo de chía reduce los ácidos grasos libres y saturados, y aumenta los AGPI, ALN, EPA y LA en plasma, y sugirió que el consumo de chía puede tener un efecto protector sobre el perfil lipídico, disminuyendo el colesterol total, los TAG y las LDL, y aumentando las HDL (De Abreu-Silva *et al.*, 2021). Por otro lado, los ácidos grasos presentes en la semilla de chía son de especial interés debido a que son antiinflamatorios y tienen efecto terapéutico en enfermedades inflamatorias (Rovati *et al.*, 2012). Entre los beneficios de estos lípidos encontramos, actividades hepatoprotectoras y antidiabéticas, además de que pueden ayudar al tratamiento en patologías como artritis autoinmune y el cáncer (Gutiérrez-Tolentino *et al.*, 2014).

La fibra dietética presente en la semilla de chía ha evidenciado tener numerosos beneficios para la salud cardiovascular, concretamente sobre la hipercolesterolemia, la diabetes tipo 2, obesidad, hipertensión arterial, y el síndrome metabólico (Estruch *et al.*, 2009). Los polifenoles, poseen un efecto antioxidante, antitrombótico, antiinflamatorio y antiapoptótico que contribuye a su protección cardiovascular (Dell'Agli *et al.*, 2004). Algunos estudios han demostrado que estos compuestos también pueden inhibir la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), acción que justificaría también sus efectos vasodilatadores y cardioprotectores (Ojeda *et al.*, 2010). Otro de los beneficios que aporta la semilla de chía a la salud es al

control de peso, gracias a la cantidad y tipo de fibra que contiene, debido a que tiene un efecto saciante. Las proteínas contenidas en este alimento también se han asociado al control de peso, esto se debe a que pueden ayudar a reducir el apetito y antojo por ciertos alimentos, gracias a la sinergia entre su alto contenido de fibra y proteína (Dschoutezo, 2016).

En relación con los beneficios que las proteínas de chía aportan a la salud, encontramos, que los péptidos bioactivos presentes pueden ser responsables de los efectos positivos encontrados en estudios de investigación en humanos que consumieron la semilla de chía entera; aunque, muchos resultados aún no son concluyentes. Pueden actuar como compuestos reguladores con actividad similar a la hormonal, así como agentes antihipertensivos, hipocolesterolémicos, antioxidantes, hipoglucemiantes, anticancerígenos, e inmunomoduladores, entre otros (Cicero *et al.*, 2017). Son necesarias nuevas investigaciones centradas en las proteínas de la chía y sus péptidos bioactivos para demostrar específicamente los mecanismos de acción que contribuyen a los beneficios observados para la salud (Grancieri *et al.*, 2019). Concretamente, los péptidos que se encuentran en este alimento han demostrado actividad hipoglucemiante, ya que son capaces de inhibir la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) (Coehlo *et al.*, 2018); hipotensora, inhibiendo la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Segura-Campos *et al.*, 2013; Chim-Chi *et al.*, 2018) estimulante de la liberación de sustancias vasoactivas (Coehlo *et al.*, 2018); hipocolesterolémica, capaz de disminuir la velocidad de reacción enzimática de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), y por lo tanto, la síntesis de colesterol (Coehlo *et al.*, 2018); y efecto antioxidante (Segura-Campos *et al.*, 2013; Chim-Chi *et al.*, 2018). Otro estudio, también mostró que los péptidos de la semilla de chía tenían un potente efecto de eliminación de radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y la sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Cotabarren *et al.*, 2019).

Las fracciones de proteína de chía también se han separado y se han hidrolizado con pepsina y pancreatina. Cada una de las fracciones resultantes, después de la digestión gastrointestinal, presentó diferentes composiciones de péptidos bioactivos con diferentes acciones fisiológicas (Orona-Tamayo *et al.*, 2015). En este estudio, la mayor actividad antirradical frente al ácido 2,20-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y al 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y la capacidad de inhibir la ECA la tuvieron los péptidos de albúmina y globulina. Además, las fracciones de prolamina y globulina mostraron la capacidad más potente para quelar el ion ferroso. Estos resultados ponen de manifiesto el potencial antioxidante y antihipertensivo de los péptidos de la chía (Orona-Tamayo *et al.*, 2015).

Finalmente, se han evaluado los beneficios potenciales de chía en atletas y personas que realizan ejercicio vigoroso, poniendo de manifiesto que ingerir semillas de chía junto con una bebida isotónica podría permitir a los atletas disminuir la ingesta de azúcares en el período de pre-competición y aumentar la ingesta de omega-3, sin embargo, los resultados señalan que no se consigue mejorar el rendimiento deportivo en eventos con una duración mayor a 90 minutos (González y García, 2012). Asimismo, se ha evidenciado que el ejercicio físico excesivo puede llegar a producir estrés oxidativo, por consiguiente, algunos estudios señalan que incluir alimentos con compuestos antioxidantes en la dieta de atletas, puede

ayudar a disminuir este daño oxidativo (Clarkson, 2000). En este sentido, la suplementación con chía podría resultar de gran interés para este colectivo gracias a su contenido en sustancias bioactivas con excelente capacidad antioxidante.

Los datos científicos permiten evaluar la semilla y sus principales componentes sobre la base de datos y criterios cuantitativos y objetivos que, en conjunto, hacen posible comprender e identificar mejor los beneficios, las limitaciones de la semilla y las aplicaciones potenciales de sus componentes. Sin embargo, dada la variabilidad de composición de las semillas resulta imprescindible describir de forma lo más precisa posible, la composición de las semillas utilizadas en los estudios de intervención, con el objetivo de poder encontrar los componentes responsables de los efectos observados.

Uno de los trabajos incluidos en esta Tesis Doctoral tiene como objetivo describir la composición de una semilla de chía de la variedad oscura procedente del sur de Jalisco, México para relacionar los posibles efectos beneficiosos descritos con los componentes específicos encontrados.

La leche y los productos lácteos (Calcio y vitamina D) en el desarrollo de alimentos funcionales

La leche y los productos lácteos, principalmente yogurt y quesos, son alimentos imprescindibles dentro de la Dieta Mediterránea, que deben ser consumidos diariamente. Nutricionalmente se debe destacar que los productos lácteos son excelentes fuentes de calcio y otros minerales, vitaminas liposolubles, como la vitamina D y A, y proteínas de alto valor biológico. Además, el consumo de leches fermentadas (yogur, etc.) se asocia a una serie de beneficios para la salud gracias a los microorganismos vivos que contienen, capaces de mejorar el equilibrio de la microbiota intestinal.

En la actualidad, se ha incrementado el interés por consumir alimentos que nutran y ayuden a mejorar las condiciones de salud. La evidencia reciente sugiere que los productos lácteos deben formar parte de una dieta variada y equilibrada debido a los múltiples beneficios que aporta al ser la fuente más importante de calcio. En 2010, la EFSA estableció que una alimentación variada que contenga calcio presente en la leche y los productos lácteos aseguran el aporte de este nutriente para una buena salud (EFSA, 2010). Las evidencias científicas posteriores respaldan los beneficios que tiene consumir este nutriente, cuya presencia depende exclusivamente de su consumo, y ha llevado a los expertos a aumentar las recomendaciones de este beneficioso alimento (Huertas JR *et al.*, 2019).

Como se ha comentado previamente, se considera que los alimentos funcionales son aquellos que además de ofrecer nutrientes (proteínas, carbohidratos, fibras, grasas y vitaminas) contribuyen a un mejor estado de salud y bienestar a quien los consume. El desarrollo de estos alimentos funcionales requiere de evidencia científica que justifique y demuestre sus funciones beneficiosas. La leche ha sido reconocida como un alimento completo cuyo consumo indica el aporte de nutrientes de alta calidad nutricional. La evidencia científica ha demostrado que los componentes bioactivos provenientes de la leche tienen potenciales aplicaciones que van desde, salud cardiovascular, salud ósea, salud digestiva, salud inmune y salud dental (Fernández-Fernández *et al.*, 2015).

Dentro de su fracción lipídica destaca la presencia de cantidades importantes de ácidos grasos insaturados como el ácido linolénico conjugado (CLA), un compuesto considerado esencial para el organismo humano que no es capaz de producirlo y debe ser ingerido en los alimentos. Los dos isómeros más destacados del CLA son el *cis*-9, *trans*-11, que representa entre un 80 y 90% del total de CLA de la leche, y el *trans*-10, *cis*-12, que se encuentra en concentraciones de 3 a 5% en la leche (Iglesias *et al.*, 2015). El aporte de CLA puede tener efectos antiteratogénicos y anticancerígenos, es un potenciador del sistema inmunitario, y además cumple múltiples funciones en la redistribución de la grasa corporal (Caviedes *et al.*, 2011). En cuanto a su síntesis y presencia en la leche, son muchos los factores que la condicionan, como la conformación genética de la fuente animal, su estado fisiológico, su alimentación, y el manejo tecnológico de las leches (Gómez-Cortés *et al.*, 2019).

Las proteínas de la leche también resultan de gran interés por su alto valor biológico debido a que incluyen todos los aminoácidos esenciales (Tome, 2011). Las proteínas del suero lácteo representan una mezcla variada de proteínas secretadas, tales como la lactoalbúmina, α -lactoglobulina, lactoferrina, lactoperoxidasa, inmunoglobulinas, glucomacropéptido y una gran variedad de factores de crecimiento (Choi *et al.*, 2012). Dentro de los mayores beneficios que se le han atribuido a este tipo de moléculas destacan aquellas relacionadas con el aparato digestivo humano donde se favorecen algunos procesos moduladores de motilidad y secreciones gastrointestinales (Phelan y Kerins, 2011). También actúan potenciando el sistema inmunitario (Bermejo-López *et al.*, 2021), han demostrado actividad antihipertensiva y antitrombótica (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011), y ejercen un efecto antimicrobiano útil para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2011).

Además de las conocidas caseínas y proteínas del suero lácteo, la fracción proteica de la leche contiene péptidos bioactivos, que presentan una actividad moduladora de numerosos procesos metabólicos del organismo. Una revisión realizada por Mohanty *et al.* (2016) describe que las proteínas de suero bovino poseen importantes propiedades biológicas y nutricionales con respecto a la salud, así como a la prevención de enfermedades. Asimismo, los autores destacan las acciones antimicrobianas y antivirales, además de la estimulación del sistema inmunitario, la actividad anticancerígena y otras características metabólicas que se han asociado con proteínas de suero, como la α -lactoalbúmina, la β -lactoglobulina, la lactoferrina y la lactoperoxidasa.

Los péptidos finales de la hidrólisis enzimática que tienen lugar en la digestión gastrointestinal son componentes bioactivos que han demostrado tener efectos antimicrobianos, inmunoestimulantes, antitrombóticos, opioides y son capaces de reducir la presión arterial (Soedamah-Muthu *et al.*, 2012). Se ha descrito que la suplementación con proteína de suero lácteo puede promover una disminución de padecer hipertensión y otros factores de riesgo cardiovascular en comparación con otras fuentes de proteínas como el huevo o la caseína (Cereda *et al.*, 2019).

Por otro lado, se han realizado muchos celulares, preclínicos y de intervención que han destacado las acciones preventivas y terapéuticas del glicomacropéptido procedente de las caseínas y del suero de la leche frente al síndrome metabólico. Sin embargo, se necesitan esfuerzos adicionales para describir los mecanismos que permitan establecerlo como un ingrediente funcional con utilidad en la práctica clínica (Foisly *et al.*, 2021)

Beneficios de los componentes de la leche (Calcio y Vitamina D) en la salud

Es importante mencionar, que hoy en día el consumo del calcio y otros minerales ha disminuido notablemente, por lo que resulta necesario incrementar el desarrollo de alimentos enriquecidos o fortificados, fáciles de consumir, que mejoren la densidad nutricional y puedan garantizar los requerimientos diarios sin tener que modificar demasiado las rutinas habituales de las personas (Kessenich, 2008). En este sentido, entre los factores que debe cumplir los alimentos para ser buenas fuentes de calcio

se encuentran, la estabilidad al almacenamiento y manipulación, la aplicación acorde con la tecnología y el proceso, así como el coste para el consumidor. Además, se debe tener en cuenta que los ingredientes fortificados no deben interferir en el metabolismo de otros nutrientes, ni producir efectos secundarios. Concretamente, la leche y derivados lácteos son los mejores vehículos de calcio, y de otros nutrientes, gracias a su composición y sus características fisicoquímicas que permiten que pueda ser enriquecida fácilmente y mejorar su biodisponibilidad. De hecho, la leche destaca entre los alimentos con un amplio potencial en cuanto a sus características como vehículo de salud y alimento funcional (Gil y Ortega, 2019). Los componentes de la leche con máximo interés relacionados con la prevención de enfermedades cardiovasculares (ECV) son los elementos minerales, principalmente el calcio y la vitamina D, debido a su implicación en diversas funciones vitales y como se ha mencionado anteriormente, por su alta biodisponibilidad (Yu *et al.*, 2018)

Existe evidencia científica que pone de manifiesto que el calcio de la leche es beneficioso para la salud ósea y para la prevención de la hipertensión, esto se debe a que junto con otros elementos minerales presentes en la leche como el magnesio, potasio y péptidos bioactivos puede tener un efecto en la prevención de pérdida de masa ósea y en riesgo de padecer ECV (Drouin-Chartier *et al.*, 2016). Un metaanálisis que incluyó nueve estudios clínicos randomizados, con un tamaño de muestra superior a 57 000 individuos hipertensos, con edades comprendidas desde los 2 hasta los 15 años, ha puesto de manifiesto que el consumo de leche o productos lácteos bajos en grasa, que aportan de 100 a 700 g de calcio pueden llegar a disminuir el riesgo de padecer esta patología hasta en un 3-4% (Soedamah-Muthu *et al.*, 2012). Por otro lado, otro metaanálisis que incluye 17 trabajos con más de 62,000 individuos señala que el consumo de leche y lácteos se encuentra inversamente asociado al riesgo cardiovascular con una disminución hasta de un 4-5% del colesterol total y LDL, lo que se atribuye principal al calcio presente y a los péptidos bioactivos que contiene (Astrup, 2014). Patterson *et al.* (2013) concluyó que un alto consumo de leche o lácteos equilibrados, que incluyan todos los componentes bioactivos dan lugar a una disminución del riesgo de padecer ECV.

El efecto de las dietas ricas en calcio sobre los marcadores cardiovasculares se ha demostrado en varios estudios clínicos de intervención. En 2014, Lorenzen *et al.* compararon el efecto de la ingesta de distintas cantidades de calcio en individuos con sobrepeso y una edad media de 33 años, en los que se evaluó el efecto de dos dietas con aportes similares de proteínas (15%) y carbohidratos (36%), y rica en grasa (50%) de las cuales el 15% eran AGMI, 25% AGS y el 35% AGPI. Ambas dietas se diferencian en el aporte de calcio: 460 vs 1990 mg/10 mg (cuatro veces más). Dicho estudio demostró que la dieta que aportaba más cantidad de calcio incrementa la excreción fecal de grasa y disminuye las concentraciones de colesterol total en sangre. Los resultados concluyen que la adición de minerales provenientes de la leche a pueden contrarrestar el efecto negativo del perfil lipídico (Lorenzen *et al.*, 2014). Otro estudio con resultados similares evaluó 3 dietas isocalóricas con el mismo contenido de fibra, carbohidratos (53%), proteínas (15%) y grasa (32%), que aportaban los mismos tipos de ácidos grasos y en las mismas

cantidades: 46% de AGS, 24 % de AGMI y 7% de AGPI. La primera dieta contenía un control no lácteo que aportaba 500 mg de calcio al día; la segunda dieta incluyó de base leche desnatada que aportaba 1700 mg de calcio al día; y la tercera dieta incluyó queso semiduro que aportaba 1700 mg de calcio al día. Las dos dietas con aportes altos de calcio dieron lugar a una mayor excreción fecal de grasa (5.2 y 5.7 g/día, respectivamente) comparado con 3.9 g/día de la dieta control. Asimismo, los participantes mostraron concentraciones más bajas de colesterol total y TAG que se correlacionaban negativamente con la excreción de grasa (Soerensen *et al.*, 2014).

Por otro lado, la vitamina D destaca por sus múltiples funciones, no solo regulando la absorción del calcio y el metabolismo óseo, sino también otros procesos como la presión arterial, la diferenciación celular, el sistema inmunológico y el sistema neurológico (Amrein *et al.*, 2020). LA vitamina D puede ser sintetizada en el organismo, pero esta síntesis puede estar comprometida en determinadas situaciones, y esto justifica la necesidad de ingesta de esta vitamina a través de los alimentos. Dentro de los alimentos capaces de vehicular esta vitamina liposoluble destacan los productos lácteos porque mejoran su biodisponibilidad.

Aunque no existe todavía un mercado para lácteos nutracéuticos, la incorporación de alimentos enriquecidos que permitan alcanzar las recomendaciones de calcio y vitamina D pueden ser una estrategia para aumentar la ingesta de estos micronutrientes con una alta biodisponibilidad, sin necesidad de modificar la dieta, lo que resulta beneficioso para el mantenimiento de la salud.

Como resultado de la amplia evidencia científica, la leche y sus derivados lácteos son una parte importante de la dieta humana y gracias a que proporcionan una alta biodisponibilidad de calcio y vitamina D, son actualmente un vehículo para obtener estos nutrientes.

El objetivo de uno de los trabajos de la presente Tesis Doctoral es revisar la información sobre los beneficios de la ingesta de leches enriquecidas en calcio y vitamina D.

Justificación

A pesar de toda la evidencia disponible de los efectos beneficiosos de los componentes de la Dieta Mediterránea y los alimentos funcionales es necesario un enfoque integrado de todos los alimentos y componentes bioactivos, para poder evaluar las evidencias sobre la salud de los alimentos funcionales incluidos en este patrón alimentario.

Objetivos

Objetivo general

Describir el efecto beneficioso del consumo de distintos tipos de alimentos funcionales incluidos en el patrón de Dieta Mediterránea, mediante la realización de revisiones bibliográficas, estudios experimentales, ensayos clínicos en humanos.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del consumo de una Dieta Mediterránea suplementada con antioxidantes procedentes de vegetales *vs* una dieta similar no suplementada sobre factores de riesgo cardiometabólico.
- Determinar la toxicidad aguda (una dosis única), subaguda (14 días) y subcrónica (90 días) de un extracto acuoso de aceite de oliva virgen rico en hidroxitirosol en ratas.
- Describir la eficacia en humanos del efecto del consumo de ácido ursólico en relación con la disminución de la masa grasa y con resultados de mejora de la forma física consecuencia de la hipertrofia muscular.
- Caracterizar y cuantificar los compuestos fenólicos presentes en la semilla de chía mediante HPLC.
- Incidir en la importancia que tiene el consumo de calcio de la leche, así como en las recomendaciones actuales de ingesta, y analizar la utilidad de las leches enriquecidas con calcio para determinados grupos de población como alternativa para aumentar las ingestas de este mineral y también de vitamina D. Asimismo, se pretenden clarificar los errores y mitos que han surgido recientemente en relación a determinados alimentos que pretenden sustituir a la leche y sus derivados, basándose en sus diferencias de composición, biodisponibilidad y efectos sobre la salud.

Metodología

La presente Tesis Doctoral reúne distintos trabajos que tratan de evaluar el efecto de varios componentes relacionados con la Dieta Mediterránea sobre distintos aspectos relacionados con la salud. Los trabajos incluyen metodologías diferentes. La figura 5 muestra un esquema de los cinco trabajos presentados, que serán descritos de forma independiente.

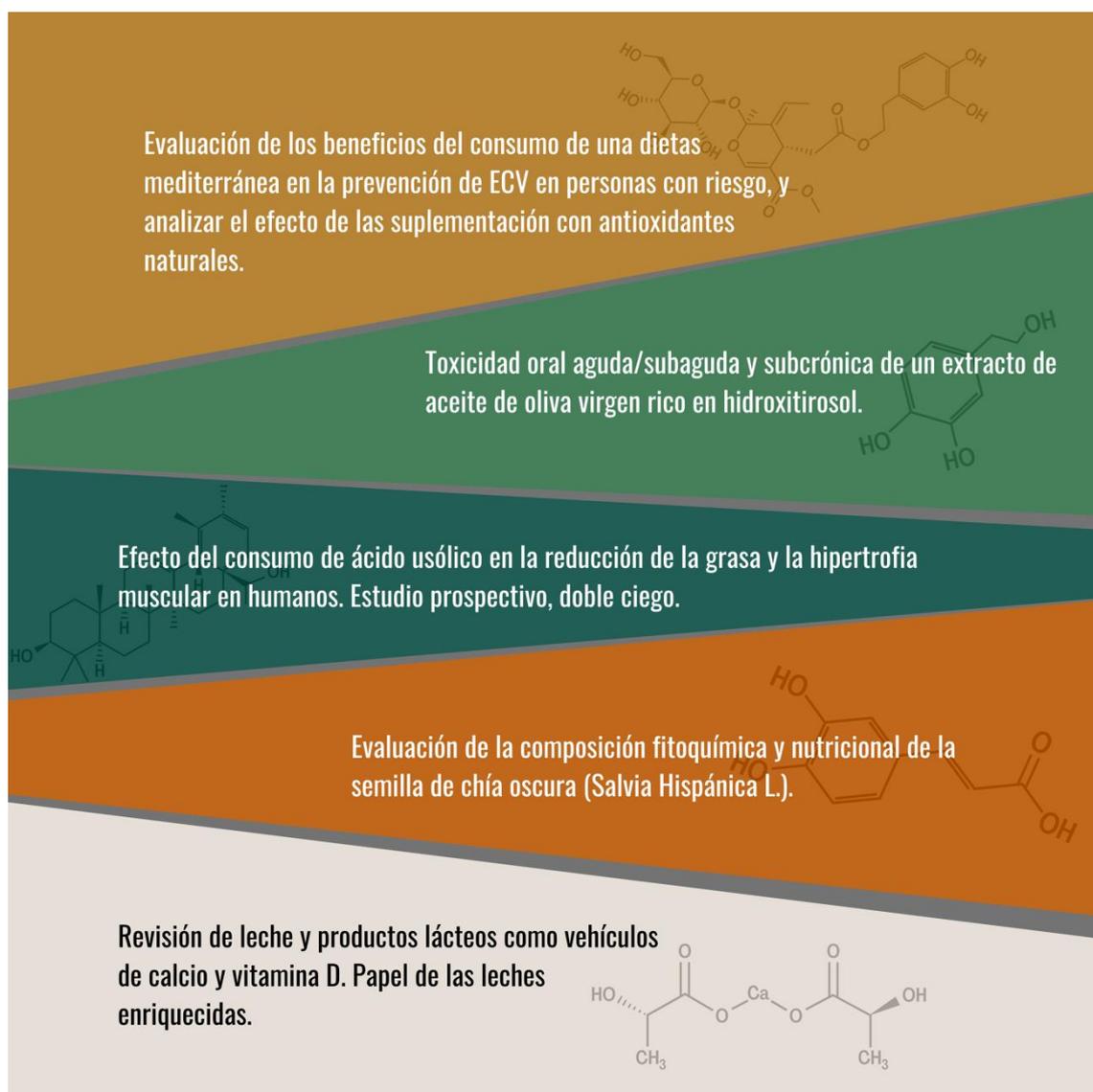


Figura 5. Diagrama general de los estudios incluidos en la presente Tesis Doctoral

RESULTADOS



DIETA MEDITERRÁNEA

Sección I. Estudio Experimental: Beneficios de la Dieta Mediterránea sobre los factores de riesgo cardiovascular

La morbilidad y mortalidad a causa de las ECV está aumentando y representa un importante problema de salud pública en todo el mundo. Es bien sabido que el riesgo de ECV está estrechamente relacionado con el estilo de vida, incluyendo la mala alimentación y la inactividad física. En los últimos años, la dieta mediterránea se ha asociado con amplios beneficios para la salud humana, incluyendo la protección contra las ECV.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este trabajo han sido:

- Evaluar el efecto de la dieta mediterránea sobre la composición corporal
- Evaluar el efecto de la dieta mediterránea sobre la presión arterial
- Evaluar el efecto de la dieta mediterránea sobre parámetros del metabolismo de carbohidratos, lípidos, compuestos nitrogenados y funcionalidad hepática
- Evaluar el efecto de la dieta mediterránea sobre el estado oxidativo
- Evaluar si la suplementación con un cóctel de vegetales deshidratados, rico en antioxidantes tiene un efecto adicional al consumo de la dieta mediterránea

Material y métodos

Sujetos participantes

Se reclutaron 22 sujetos (mujeres n=11 y hombres n=11) de entre 40 y 70 años de la provincia de Granada, con factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (síndrome metabólico), sin síntomas clínicos, ni medicación. Los criterios de inclusión fueron: fumador, presión arterial (>140/90 mm/Hg), sobrepeso u obesidad ($IMC > 25 \text{ kg/m}^2$), antecedentes familiares de enfermedad coronaria prematura (< 60 años) concentración de LDL ($\geq 4.14 \text{ mmol/l}$) y HDL ($\geq 1.04 \text{ mmol/l}$). Los criterios de exclusión fueron: individuos con antecedentes de cardiopatía significativa, que presentaran antecedentes de cirugía bariátrica o que recibieran tratamiento farmacológico para dicha patología, mujeres gestantes, enfermedad gastrointestinal, individuos con patología grave activa en el momento de su inclusión en el estudio que condicionara el cumplimiento del protocolo.

Diseño de estudio

El presente estudio fue un estudio de intervención prospectivo, aleatorizado y cruzado, con dos grupos de intervención. El estudio se realizó en dos fases de 6 semanas, durante las cuales todos los participantes recibieron menús diarios que seguían un patrón de dieta mediterránea especialmente diseñados por expertos y que eran suministrados por un catering. Entre ambas fases, los participantes tuvieron un periodo de lavado de 6 semanas en las que volvían a ingerir la dieta habitual que solían tomar antes del estudio.

Los participantes fueron divididos aleatoriamente en dos grupos de intervención. En la primera fase del estudio cruzado un grupo recibió 4 g/d de suplemento diario de vegetales deshidratados con antioxidantes (omega-3, licopeno, polifenoles, vitamina E y vitamina C) procedentes de vegetales. El otro grupo no recibió el suplemento, tan solo la dieta mediterránea. Tras el lavado, durante la segunda fase (6 semanas) los grupos fueron cruzados y al final del estudio todos los participantes habían tomado el suplemento durante 6 semanas de intervención (Figura 6).

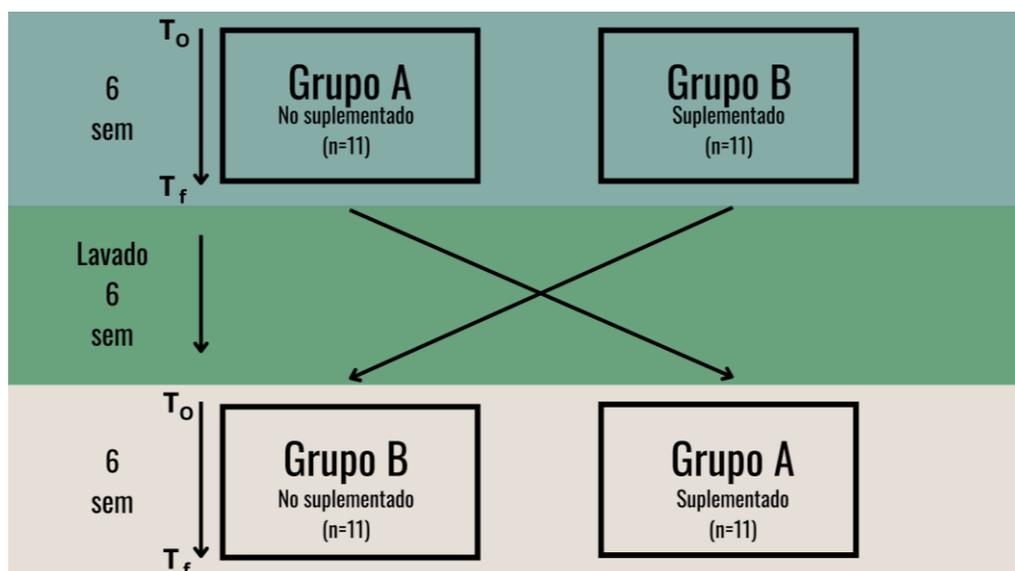


Figura 6. Diseño experimental utilizado en el estudio. T_0 : tiempo inicial; T_f : tiempo final.

Antes de comenzar el estudio, todos los sujetos fueron evaluados por un médico especialista y se les realizaron análisis de sangre rutinarios para comprobar que estaban sanos y cumplían los criterios de inclusión: se evaluaron parámetros sanguíneos, y antropométricos de composición corporal.

Todos los participantes aceptaron ser incluidos en el estudio y firmaron el protocolo de consentimiento informado. Se mantuvo y respetó la confidencialidad de los datos recogidos y de los datos personales utilizados en este estudio. El Comité de Ética de la Investigación de la Universidad de Granada aprobó el estudio, que se realizó siguiendo la normativa de la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica y la Ley Orgánica 15/1999, RD 1720/2007 de protección de datos de carácter personal, así como las normas internacionales para la investigación con muestras de seres humanos.

Diseño de menús y suplementación de antioxidantes

La dieta fue diseñada por los investigadores especialistas del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, y elaborada por la empresa Biogolden, que se encargó de la elaboración de los menús y de su distribución semanal a los domicilios de los participantes. La dieta se realizó siguiendo el patrón de dieta mediterránea y con una distribución de macronutrientes: 50-55% de hidratos de carbono, 15% de proteínas y 25-30% de lípidos. Para conseguir un aporte adecuado de micronutrientes la dieta incluyó una gran variedad de alimentos basados en el patrón mediterráneo, que proporciona una dieta equilibrada y completa. Se proporcionaron las 5 comidas diarias: desayuno, media mañana, almuerzo, comida y cena, durante las dos fases de 6 semanas cada una. El seguimiento de las intervenciones fue llevado a cabo por los investigadores del proyecto, que consultaban semanalmente por teléfono a los participantes sobre su satisfacción con los menús y realizaban cambios según los gustos y preferencias de los sujetos.

En cada una de las etapas del estudio, uno de los grupos recibió un suplemento que consistía en un cóctel de vegetales deshidratados, rico en antioxidantes, en formato polvo (4g/d), preparado por la empresa Biogolden. El concentrado de vegetales deshidratados contenía: omega 3, licopeno, polifenoles, vitamina E y Vitamina C.

Composición corporal

Evaluación antropométrica

La valoración de la composición corporal de los sujetos seleccionados para esta investigación fue llevada a cabo al inicio del estudio por el personal investigador y siguió las normas y técnicas recomendadas por el Grupo Internacional de Trabajo de Cineantropometría (I.W.G.K.). Se tomaron 19 medidas antropométricas, marcando previamente los puntos anatómicos de referencia en el lado derecho del sujeto del estudio según los criterios determinados por la Sociedad Internacional para el Avance de la Cineantropometría (ISAK).

Las medidas antropométricas tomadas fueron: altura; peso; pliegues cutáneos: bicipital, tricipital, subescapular, suprailíaco, abdominal, muslo y pierna media; y diámetros óseos: biepicondilar del húmero, biepicondilar del fémur y bistiloide; asimismo, se calculó el IMC.

Para estimar la forma y la composición corporal de cada participante se utilizó la metodología de somatotipo expresada mediante una puntuación en un número de tres cifras (Sheldon, 1940; Heath y Carter, 1967). Se utilizó la metodología de los cuatro compartimentos para determinar el porcentaje correspondiente a la masa muscular, la masa grasa, la masa ósea y la masa residual, esta última conocida como la englobada por el peso de los líquidos corporales y las vísceras utilizando la fórmula de Rose y Guimares (1980).

$$\text{Masa Muscular} = P - (\text{masa grasa} + \text{masa ósea} + \text{masa residual})$$

$$\text{Masa grasa} = 0.01 \times P [(S \text{ PSE, PT, PSI, PA}) \times 0.153 + 5.783]$$

$$\text{Masa ósea} = 3.02 (T^2/100 \times DM/100 \times DF/100 \times 400)^{0.712}$$

$$\text{Masa residual} = P \times 0.241$$

Cada número representa la evolución de uno de los tres elementos primarios del físico: endomorfo, mesomorfo y ectomorfo y, por tanto, describe las variaciones individuales dentro de la morfología y la compostura humanas (Villanueva, 1979). El somatotipo es una descripción de la configuración morfológica actual o una predicción de los futuros y sucesivos fenotipos que puede presentar una persona siempre que el factor nutricional sea constante. El componente endomorfo representa la adiposidad relativa; el componente mesomorfo representa la corpulencia o magnitud musculoesquelética relativa; y el componente ectomorfo representa la linealidad o delgadez relativa de un físico.

Para confirmar la precisión y consistencia de las medidas de pliegues cutáneos, se calculó el porcentaje del error técnico de medición (TEM), que debe ser inferior al 5%. El %TEM se calculó utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{TEM} = (\sum d^2 - 2n) 0.5$$

$$\% \text{TEM} = 100 (\text{TEM}/\text{media})$$

Nuestros resultados mostraron una variación entre medidas de pliegues inferior al 2.29%, con una reproducibilidad determinada por un coeficiente de correlación $r=0.987$; e inferior al 0.89% para los diámetros y las circunferencias, con un $r=0.99$.

La masa grasa (MG) por pliegues se calculó utilizando diferentes ecuaciones para intentar evitar errores e incrementar la precisión y la consistencia de las medidas obtenidas por este método, que posteriormente se utilizaron para obtener valores medios. Las ecuaciones utilizadas fueron: Sloan y Faulkner que no diferencian entre hombres y mujeres, y la ecuación de Pollack, Wilmore y Fox (Siri de 3 y 7 pliegues), y la de Yuhasz, que diferencian entre sujetos de ambos sexos (Figura 7).

a) Ecuación de Sloan para hombres y mujeres

$$MG(\text{kg}) = 0.135 \times (a) + 0.373 \times Pc_{\text{tricipital}} + 0.389 \times Pc_{\text{subescapular}} - 3.967$$

b) Ecuación de Faulkner para hombres y mujeres

$$Pg (\%) = 5.783 + (0.153 \times (a))$$

$$a (\text{mm}) = Pc_{\text{tricipital}} + Pc_{\text{subescapular}} + Pc_{\text{suprailíaco}} + Pc_{\text{abdominal}}$$

c) Ecuación de Pollack, Wilmore & Fox

Mujeres $\Sigma 3P: (DC) = 1.0994921 - (0.0009929 \times (\Sigma 3P)) + (0.0000023 \times (\Sigma 3P)^2) - (0.00021392 \times (E))$

$$\Sigma 7P: (DC) = 1.0970 - (0.00046971 \times (\Sigma 7P)) + (0.00000056 \times (\Sigma 7P)^2) - (0.00012828 \times (E))$$

Hombres $\Sigma 3P: (DC) = 1.109380 - (0.000827 \times (\Sigma 3P)) + (0.0000016 \times (\Sigma 3P)^2) - (0.0002574 \times (E))$

$$\Sigma 7P: (DC) = 1.112 - (0.00043499 \times (\Sigma 7P)) + (0.00000055 \times (\Sigma 7P)^2) - (0.00028826 \times (E))$$

$$\% MG = 4.95/DC - 4.5 \times 100$$

d) Ecuación de Yuhasz

Hombres $\%MG = 0.1051 \times \Sigma (Pc_{\text{tricipital}} + Pc_{\text{subescapular}} + Pc_{\text{suprailíaco}} + Pc_{\text{abdominal}} + Pc_{\text{muslo}} + Pc_{\text{pantorrilla}})$

Mujeres $\%MG = 0.1548 \times \Sigma (Pc_{\text{tricipital}} + Pc_{\text{subescapular}} + Pc_{\text{suprailíaco}} + Pc_{\text{abdominal}} + Pc_{\text{muslo}} + Pc_{\text{pantorrilla}})$

Figura 7. Ecuaciones antropométricas utilizadas en el **A)** Ecuación de Sloan para hombres y mujeres: MG: masa grasa; a: peso actual (kg); Pc: pliegue cutáneo (mm) **B)** Ecuación de Faulkner: PG: compartimento grasa **C)** Ecuación de Pollack, Wilmore & Fox: Hombres 3 Pliegues: DC: densidad corporal; E: edad; Pliegues: pectoral, abdominal y muslo; 7 pliegues: pectoral, abdominal, muslo, tricipital, subescapular, suprailíaco y axilar medio. Mujeres: 3 pliegues: DC: densidad corporal; E: edad; Pliegues: tricipital, suprailíaco y muslo; 7 pliegues: pectoral, abdominal, muslo, tricipital, subescapular, suprailíaco y axilar medio **D)** Ecuación de Yuhasz.

Parámetros sanguíneos

Se obtuvieron muestras de sangre venosa en ayunas de la vena antecubital en tubos vacutainer (BD Bioscience, San José, CA, USA) antes y después de la intervención de 24 semanas. Se extrajeron 11 ml de sangre: 1 ml de sangre total para el hemograma, 2 ml en tubos sin anticoagulante para obtener suero y 6 ml en tubos con EDTA como anticoagulante para obtener plasma y linfocitos. Las muestras de sangre se centrifugaron a $1.500 \times g$ y $4^\circ C$ durante 15 minutos para separar el plasma, que se almacenó congelado a $-80^\circ C$ hasta su análisis. Los parámetros medidos y/o analizados en muestras de sangre fueron los siguientes:

Hemograma: recuento de glóbulos blancos, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, recuento de plaquetas, linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), distribución del tamaño de los glóbulos rojos (RWW), volumen plaquetario medio (VPM), porcentaje del volumen sanguíneo ocupado por plaquetas (PCT) y distribución del tamaño de las plaquetas (PDW). Los parámetros en sangre total se realizaron en un contador hematológico Mythic 22 CT C2 Diagnostics al inicio y al final de cada periodo de intervención.

Análisis bioquímico general en suero: al inicio y al final de cada periodo de intervención se determinaron las concentraciones de glucosa, triacilglicéridos, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, ácido úrico, creatinina, albúmina, y las actividades de las enzimas, aspartato aminotransferasa (GOT), alanina aminotransferasa (GPT), gamma glutamiltransferasa (γ GT). Los parámetros bioquímicos plasmáticos fueron medidos espectrofotométricamente en un Analizador Bioquímico BS-200 (Chemistry Analyzer, SHENZHEN MINDRAY BIO-MEDICAL ELECTRONICS CO., LTD), utilizando kits de Spinreact (Sant Esteve de Bas, Girona).

Marcadores de estrés oxidativo en plasma: malondialdeído e hidroperóxidos

Como marcadores específicos de estrés oxidativo de origen lipídico se determinaron las concentraciones de hidroperóxidos y malondialdeído (MDA) en plasma. La peroxidación lipídica es un proceso degenerativo que se produce en condiciones de estrés oxidativo, que provoca la oxidación de los lípidos, produciendo hidroperóxidos, como producto primario, y MDA, como producto final de la oxidación. Ambas moléculas se utilizan como biomarcador de daño oxidativo.

Determinación de hidroperóxidos en plasma

La cuantificación de hidroperóxidos en plasma se llevó a cabo utilizando el método de Jiang *et al.* (1992) con ligeras modificaciones. La técnica está basada en la rápida formación de hidroperóxidos mediada por la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} en medio ácido. El Fe^{3+} forma un cromóforo con el anaranjado de xilenol que absorbe a 560 nm. Se empleó el reactivo de Fox, protegido de la luz; está compuesto por:

- 100 ml de ácido sulfúrico 250 mM
- 880 mg de BHT
- 98 mg de amoniosulfato amónico ferroso
- 76 mg de anaranjado de xilenol
- Metanol c.s.p. 1 L

Método:

En las distintas muestras se indujo la peroxidación mediante la adición de AAPH (2,2'-azobis amidinopropano) 2.5 mM, compuesto hidrosoluble que genera radicales libres a una velocidad constante, y para ello se adicionaron volúmenes de muestra correspondientes a 100 µg de proteína, junto a 20 µl de AAPH, y se completó con agua bidestilada hasta 200 µl; se incubaron a 37 °C durante 30 min. Se adicionó 1.8 ml de reactivo de Fox y tras 60 min en oscuridad se midió la absorbancia a 560 nm. La concentración de los hidroperóxidos inducidos se calculó mediante la aplicación de la ecuación de Lambert Beer, con un coeficiente de extinción molar de $4.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los valores se expresaron como nmoles de hidroperóxidos/mL de plasma.

Determinación de las sustancias reaccionantes al ácido barbitúrico (TBARS)

Para la determinación de **MDA** se utilizó el método descrito por Buege y Aust (1978) que se basa en la reacción estequiométrica de 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) con una molécula de MDA para formar un aducto rosado (Figura 8), el cual tiene su máximo de absorbancia a una longitud de onda de 535 nm, en solución ácida, pH 2. Es el método más empleado para la determinación de MDA en las muestras biológicas. Existen otras sustancias originadas en la peroxidación lipídica tales como alcanales, alquenales, alcadienales también reaccionan con el TBA, por lo que normalmente los resultados de la reacción se expresan como concentración de TBARS, no de MDA. Los reactivos utilizados fueron:

- Solución TBARS, para 100 ml:
- 0.375 g de TBA
- 15 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 100%
- 2.5 ml de HCl concentrado
- 82.5 ml de agua desionizada

Esta solución es de preparación extemporánea; se disolvió aplicando calor y continua agitación.

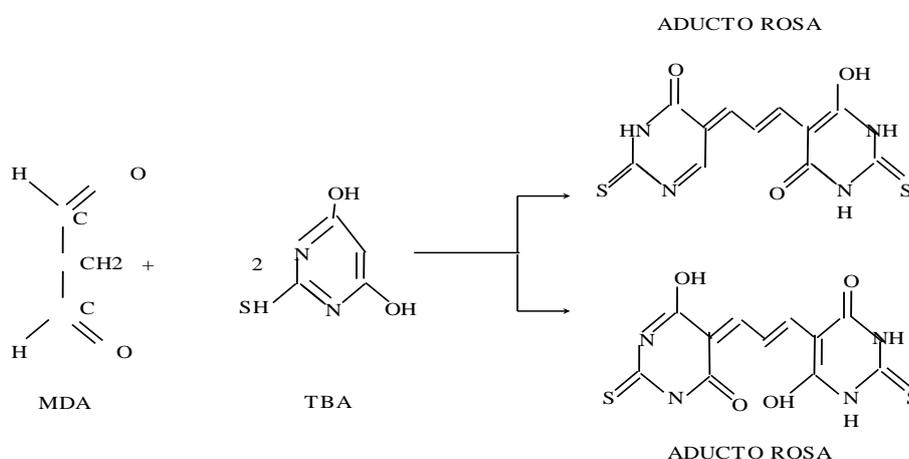


Figura 8. Reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico

Se mezclaron 0.5 ml de plasma (a distintas concentraciones de cobre) que contienen 100 µg de proteína, con 1 ml de solución TBARS, se cerraron con tapón de rosca, y se incubaron en un baño de agua a 100 °C durante 15 min. Se enfriaron y se centrifugaron a 1790 x g durante 10 min, a 4°C. Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 535 nm. La concentración de TBARS en plasma se calculó mediante extrapolación del valor de absorbancia obtenido para la muestra en la curva estándar. Dicha curva se construyó con distintas concentraciones de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en un rango desde 0.2 nmoles a 10 nmoles. Los valores se expresaron como nmoles de TBARS/mL de plasma.

Evaluación dietética

Al inicio del estudio, se realizó un registro dietético de ingesta diaria de cinco días "registro de 24 horas" (incluyendo un sábado o domingo) a todos los voluntarios. La dieta se evaluó mediante un software diseñado en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, "Nutrición y Salud" (Empresa ASDE, Valencia) de la Universidad de Granada, versión 2.0, (Victoria Muñoz y Mañas-Almendros, 2011), que utiliza la tabla de composición de alimentos española.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como valores medios \pm error estándar de la media (SEM). Inicialmente se analizó la normalidad de las variables mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de la varianza de las distintas variables por el método de Levene. Cuando las variables no seguían el criterio de normalidad, se utilizó la transformación logarítmica y se volvieron a analizar. Las diferencias entre grupos ($P < 0,05$) se determinaron mediante el test de análisis de la varianza (ANOVA) utilizando las pruebas a posteriori (*post-hoc*) para la comparación entre grupos: DMS para las varianzas homogéneas y T2 de Tamhane para las varianzas no homogéneas. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa informático Statistical Package for the Social Sciences versión 21 (SPSS Inc.; Chicago, IL, EE.UU.).

Resultados

Descripción basal de los voluntarios

La edad y los parámetros antropométricos de los sujetos participantes al inicio del estudio están descritos en la Tabla 1. La Tabla 2 muestra la evaluación nutricional de las dietas de los voluntarios antes de iniciar el estudio y su adecuación a las ingestas diarias recomendadas (IDR) separadas por sexo. Los datos muestran que no había diferencias entre los dos grupos de intervención.

Tabla 1. Parámetros antropométricos iniciales de los voluntarios participantes en el estudio, distribuidos en los grupos experimentales

	No Suplementado	Suplementado	<i>p</i> -valor
Edad (años)	56±2	57±2	0.638
Estatura (cm)	162.5±1.7	162.5±1.7	1.00
Masa grasa (%)	27.8±2.6	27.1±4.0	0.901
Masa Muscular (%)	37.8±2.0	38.3±3.1	0.882
Brazo-Área Total (cm ²)	91.4±5.2	92.2±4.6	0.917
Brazo-Área Muscular (cm ²)	64.0±4.4	62.5±3.7	0.813
Pierna-Área Total (cm ²)	242.6±15.9	260.3±18.0	0.470
Pierna-Área Muscular (cm ²)	155.1±12.6	179.1±10.9	0.160
Grasa corporal (3P)	37.6±2.3	35.0±3.2	0.498
Grasa corporal (7P)	35.2±1.8	34.0±3.1	0.714
Grasa corporal (Faulkner)	31.4±1.5	26.7±2.0	0.309
Grasa corporal (Yuhasz)	30.0±2.1	28.1±2.1	0.540
Grasa corporal (Sloan)	29.2±2.3	29.4±2.7	0.967
Grasa corporal (media)	36.0±1.6	34.2±2.4	0.588

Los datos se expresan en media ± SEM. Grasa corporal (%), Grasa corporal (Siri)- Durmin & Womersley (%); Grasa corporal (3P), Grasa corporal (Siri)-Pollack, Wimore & Fox (3P) (%); Grasa corporal (7P), grasa corporal (Siri)-Pollack, Wimore & Fox (7P) (%); Grasa corporal (media), grasa corporal media de todos los datos calculados.

Tabla 2. Evaluación nutricional de la dieta de los sujetos voluntarios antes del inicio de iniciar el estudio.

	Mujeres	%IR	Hombres	% IR	Total	%IR
Macronutrientes						
Kilocalorías (kcal)	1988±629	97.2	2428±732	92.0	2218±484	94.5
Kjoules (kj)	8302±2625	97.2	9201±2774	92.0	8773±1914	94.5
Colesterol (mg)	253±80	84.3	475±143	158.3	370±81	123.3
Fibra (g)	20.1±6.4	80.4	20.3±6.1	81.2	20.2±4.4	80.8
Proteínas (g)	85±27	113.3	105±32	114.6	95±21	114
Carbohidratos (g)	222±70	81	251±15	75.1	237±51	77.6
Grasas (g)	87±27	131	102±31	126	95±21	133
AGMI (g)	46±15	138.6	51±15	126	49±11	132
AGPI (g)	9±3	67.8	11±3	67.8	10±2	67.8
AGS (g)	21±7	95	26±8	96	23±5	93
Micronutrientes						
Vit A (mg)	724±229	87.0	681±205	65.0	701±153	75.5
Vit B1 (mg)	1.5±0.5	184.7	1.6±0.5	158.0	1.6±0.3	170.7
Vit B2 (mg)	1.7±0.5	134.7	1.8±0.5	121.2	1.7±0.4	127.6
Vit B6 (mg)	1.8±0.6	112.0	2.0±0.6	121.4	1.2±0.4	116.9
Vit B12 (mg)	8.4±2.7	418.1	15.0±4.6	748.5	11.8±2.6	591.1
Vit C (mg)	138±44	228.9	103±31	188.7	119±26	207.3
Vit D (mg)	5.1±1.6	101.8	4.5±1.4	111.1	4.8±1.1	106.7
Vit E (mg)	11.5±3.6	95.1	11.2±3.4	100.3	11.3±2.5	97.9
Niacina (mg)	28.7±9.1	212.0	33.6±10.1	203.0	31.2±6.8	202.8
Pantotenato (mg)	4.4±1.4	88	5.8±1.8	116	5.2±1.1	104
Biotina (µg)	5.6±1.8	18.6	5.0±1.6	16.6	5.3±1.2	17.6
Ácido fólico (mg)	266±84	132.6	331±100	178.5	300±66	156.6
Sodio (mg)	2200±696	95.7	2060±621	90	2127±464	92.5
Potasio (mg)	2745±868	78.4	3754±1132	107.2	3274±714	106.4
Calcio (mg)	815±258	101.4	765±231	98.3	789±172	99.8
Fósforo (µg)	1231±389	98.5	1385±418	111	1312±286	105
Magnesio (mg)	298±94	93.3	365±110	105.7	333±73	99.8
Hierro (mg)	14.6±4.6	135.0	19.0±5.7	201.7	16.9±3.7	169.9
Zinc (mg)	8.8±2.8	57.9	9.9±2.9	68.1	9.4±2.0	63.7
Yodo (mg)	107±34	93.2	91±27	66.6	98±21	79.2
Cobre (µg)	18.8±5.9	2.1	70.7±21.3	8	45.9±10.0	5.1
Cloro (mg)	2556±808	127.8	1974±595	98.7	2251±491	128
Manganeso (mg)	8.6±2.7	330	7.6±2.3	374	8.1±1.8	352
Selenio (µg)	90.9±28.7	204	112.9±34.1	130	102.4±22.4	163.84

Mujeres (n=11), Hombres (n=11). AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados; AGS, ácidos grasos saturados; % IR=% respecto a las ingestas recomendadas.

Efecto de la dieta mediterránea suplementada con antioxidantes

La tabla 3 muestra que el peso, IMC grasa, PAS, PAD y frecuencia cardiaca no se modificaron significativamente tras el consumo de dieta mediterránea durante 6 semanas, y que la suplementación con antioxidantes tampoco indujo ningún efecto adicional en estos parámetros.

Tabla 3. Evolución del peso corporal, IMC, porcentaje del compartimento graso y frecuencia cardíaca de los voluntarios tras la intervención con dieta mediterránea y el suplemento de antioxidantes durante 6 semanas.

	No Suplementado		Suplementado	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Peso (kg)	84 ±3	80±4	84±4	82±4
IMC (kg/m ²)	32±1	30±3	31±2	31±3
MG (%)	39±2	36±2	39±2	38±2
FC (ppm)	69±2	69±13	71±3	70±3
PAS (ppm)	137±3	138±3	144±4	138±4
PAD (ppm)	88±2	82±3	87±3	85±2

Los datos se expresan en media ± SEM. IMC, índice de masa corporal; FC, frecuencia cardiaca; MG, masa grasa; PAD, presión arterial diastólica; PAS, presión arterial sistólica.

La Tabla 4 muestra la evolución de los parámetros hematológicos determinados tras la intervención dietética en ambos grupos experimentales. No hubo diferencias significativas tras la intervención con dieta mediterránea durante 6 semanas con o sin suplementación con antioxidantes en ninguno de los parámetros analizados.

Tabla 4. Evolución de los parámetros hematológicos de los voluntarios tras la intervención con dieta mediterránea y el suplemento de antioxidantes durante 6 semanas.

	No Suplementado		Suplementado	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Glóbulos blancos (mil/mm ³)	6.90±0.41	7.10±0.42	7.02±0.43	7.18±0.46
Glóbulos rojos (mill/mm ³)	4.67±0.09	4.69±0.08	4.75±0.10	4.81±0.09
Hemoglobina (g/100 ml)	14.71±0.28	14.49±0.28	15.02±0.33	14.99±0.34
Hematocrito (%)	43.38±0.84	43.37±0.76	43.97±0.97	44.42±0.93
Plaquetas (mil/mm ³)	241.54±12.97	249.14±11.83	236.00±12.62	240.10±10.47
Linfocitos (% del total FE)	2.27±0.17	2.27±0.21	2.31±0.12	2.36±0.13
Monocitos (% del total FE)	0.51±0.04	0.59±0.05	0.53±0.03	0.56±0.04
Neutrófilos (% del total FE)	3.92±0.32	3.78±0.51	3.96±0.39	4.02±0.35
Eosinófilos (% del total FE)	0.24±0.05	0.19±0.03	0.21±0.03	0.20±0.03
Basófilos (% del total FE)	0.01±0.01	0.00±0.00	0.01±0.01	0.03±0.01
Linfocitos (% del total GB)	32.53±2.08	33.99±1.90	33.86±1.84	33.83±1.53
Monocitos (% del total GB)	7.38±0.56	8.98±0.82	7.79±0.43	7.92±0.42
Neutrófilos (% del total GB)	56.01±2.49	53.79±2.22	54.70±2.17	54.98±1.87
Eosinófilos (% del total GB)	3.65±0.72	2.92±0.41	4.59±1.56	2.73±0.38
Basofilos (% del total GB)	0.43±0.07	0.32±0.06	0.38±0.04	0.54±0.09
VCM (fl)	93.13±1.10	92.53±1.07	92.66±1.00	92.42±1.04
HCM (pg)	31.60±0.46	30.91±0.50	31.70±0.47	31.21±0.52
CHCM (g/100 ml)	33.92±0.21	33.39±0.21	34.17±0.24	33.73±0.22
RDW (%)	13.70±0.16	13.52±0.16	13.59±0.15	13.53±0.17
VPM (fl)	8.73±0.14	8.90±0.15	10.14±0.37	10.73±0.37
VSOP (%)	0.21±0.01	0.22±0.01	0.25±0.01	0.25±0.01
PDW (%)	13.78±0.25	13.66±0.23	14.23±0.53	14.65±0.38

Los datos están expresados en media ± SEM. CHCM, concentración de hemoglobina corpuscular media; EF, elementos formes; GB, glóbulos blancos; HCM, hemoglobina corpuscular media; PDW, distribución de tamaño de plaquetas; RDW, distribución de tamaños de glóbulos rojos; VCM, volumen corpuscular medio; VPM, volumen plaquetario medio; VSOP, volumen de sangre ocupado por plaquetas.

La Tabla 5 muestra la evolución de las concentraciones de glucosa, lípidos, compuestos nitrogenados, biomarcadores de estado oxidativo y actividad de las enzimas hepáticas en sangre de los voluntarios tras la intervención con dieta mediterránea y el suplemento de antioxidantes. La ingesta de dieta mediterránea durante 6 semanas no provocó cambios significativos en estos parámetros sanguíneos, y la suplementación con el cóctel de vegetales deshidratados tampoco indujo ningún efecto adicional.

Tabla 5. Evolución de las concentraciones de glucosa, lípidos, compuestos nitrogenados, biomarcadores de estado oxidativo y actividad de las enzimas hepáticas en sangre de los voluntarios tras la intervención con dieta mediterránea y el suplemento de vegetales deshidratados, rico en antioxidantes.

	No Suplementado			Suplementado		
	Inicio	Final	P-valor	Inicio	Final	P-valor
Glucosa (mg/dl)	97±4	84±4	0.219	86±4	81±4	1.00
Triglicéridos (mg/dl)	153±18	117±14	0.645	141±16	137±16	1.00
Colesterol (mg/dl)	182±9	168±9	1.00	190±13	169±10	0.853
Col-HDL (mg/dl)	47±2	46±3	1.00	50±3	44±2	0.759
Col-LDL (mg/dl)	125±11	125±10	1.00	128±9	137±15	1.00
Ácido úrico (mg/dl)	6.0±0.5	5.5±0.3	1.00	5.5±0.2	5.5±0.3	1.00
Creatinina (mg/dl)	0.83±0.02	0.86±0.03	1.00	0.85±0.03	0.82±0.02	1.00
Albúmina (g/dl)	4.8±0.1	4.4±0.1	0.001*	4.8±0.1	4.4±0.1	0.001*
AST/GOT (U/I)	27.0±3.4	24.3±2.7	1.00	25.6±4.2	23.9±3.4	1.00
ALT/GPT (U/I)	25.5±3.8	22.9±3.6	1.00	23.8±3.6	23.1±4.9	1.00
γGT (U/I)	43.4±9.8	37.7±4.8	0.754	34.0±5.3	30.8±7.3	1.00
MDA (nmol/ml)	3.1±0.2	2.7±0.1	0.587	3.3±0.2	3.1±0.1	1.00
Hidroperóxidos (nmol/ml)	17.9±1.2	14.6±0.7	0.125	18.9±1.2	16.2±0.7	0.343

Los datos están expresados en media ± SEM. ALT/GPT, alanina aminotransferasa; AST/GOT, aspartato aminotransferasa; MDA, malondialdehído; γGT, gamma-lutamyl transferasa.

Discusión

En las últimas décadas, varios estudios han tratado de identificar los posibles mecanismos que justifiquen los beneficios de la dieta mediterránea sobre la ECV. En este sentido, su alto contenido en fibra, el perfil lipídico específico, rico en AGM y AGPI, y su riqueza en otros componentes con reconocidas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, como los polifenoles, han sido propuestos como los principales responsables de esta protección frente a la ECV por su capacidad para modular la presión arterial, el perfil lipídico, el peso corporal y la glucemia en ayunas, entre otros mecanismos (Esposito *et al.*, 2011; Rees *et al.*, 2013 Papadaki *et al.*, 2020). Los efectos de la dieta mediterránea no sólo pueden explicarse por la sinergia entre todos los componentes nutritivos incluidos, sino que, además, la dieta

mediterránea incluye una serie de pautas de orden conductual, cultural y social, íntimamente ligados al estilo de vida mediterráneo, que también contribuye a sus efectos beneficiosos (Martínez-Lacoba *et al.*, 2018). Por lo tanto, no se trata tan sólo de dar prioridad a un determinado tipo de alimentos, sino a la manera de seleccionarlos, de cocinarlos y de consumirlos, que hacen que esta dieta sea realmente eficaz para el mantenimiento de la salud (Estruch *et al.*, 2018). En el presente trabajo se realizó un ensayo clínico para confirmar los beneficios del consumo de una dieta mediterránea sobre la prevención de enfermedades cardiovasculares en personas con riesgo de padecerlas, y si la suplementación adicional con un cóctel de vegetales deshidratados, rico en antioxidantes presentes en los alimentos característicos de este patrón dietético, puede aportar beneficios adicionales a la propia dieta. Nuestros resultados muestran que la ingesta de una dieta mediterránea durante 6 semanas sin modificación de estilo de vida, no provoca una mejora del peso y la composición corporal, ni de algunos parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo y el estado oxidativo en plasma, reforzando el concepto de que dieta mediterránea no es sólo un patrón dietético, sino que debe complementarse con un estilo de vida, que incluya ejercicio físico, y una serie de pautas conductuales, para que pueda ser de utilidad para el tratamiento y la prevención de las ECV.

Las encuestas dietéticas de consumo de alimentos previo al inicio del estudio mostraron que los voluntarios consumían aproximadamente un 56% de carbohidratos, 22% de grasas y un 22% de proteínas. Con relación a la distribución de la grasa ingerida se encontró que estaba dentro de las recomendaciones de la OMS: <10% para AGS y 15-20% para AGMI (OMS, 2018), ya que aproximadamente el 9.5% de la energía consumida eran grasas saturadas, el 20% de la energía consumida eran AGMI, y la ingesta de AGPI se encontraba por debajo de las recomendaciones (6-11%) con un aporte del 4% de la energía consumida. El consumo de colesterol era adecuado en las mujeres (253 mg/d), pero excesivo para los hombres (475 mg/d), ya que la recomendación es <300 mg/d (OMS, 2018), mientras que el consumo de fibra se encuentra dentro de unos valores aceptables (recomendado 20-35 g/d) (Buil-Cosiales *et al.*, 2014). Respecto a las vitaminas, en general la dieta previa al estudio aportaba las cantidades necesarias, a excepción de la vitamina A (que solo aportaba el 87% de las IDR); incluso algunas eran consumidas por encima de estos requerimientos, observándose ingestas muy elevadas en las vitaminas B12 (591% de las IDR), vitamina C (207% de las IDR) y niacina (202% de las IDR), principalmente en los hombres (Cuervo *et al.*, 2009; FESNAD, 2010).

Nuestros resultados relacionados con la composición corporal indican que no hubo cambios significativos en los parámetros analizados tras ninguna de las intervenciones (con suplemento o sin suplemento). En este estudio se aplicaron diversas técnicas y ecuaciones antropométricas que permiten estimar el porcentaje de grasa corporal, mostrando una ausencia de efectos tras la intervención nutricional. La técnica de antropometría utilizada muestra una elevada correlación con el porcentaje de grasa corporal obtenido a través de diversas técnicas consideradas como el patrón estándar, como son, la densitometría (DEXA) y bioimpedancia, sin embargo, el coste y accesibilidad de estas técnicas es alto, por tanto, se justifica la utilización de los pliegues cutáneos y la ecuación de Siri para la valoración del porcentaje de

grasa corporal, dando por válidas tanto la forma global como la forma específica de calcular la densidad corporal con las ecuaciones utilizadas en el presente estudio (Marrodán *et al.*, 2013).

Nuestros resultados pueden estar limitados debido a que los participantes de nuestro estudio no cambiaron sus hábitos de vida durante el período de intervención. Esta hipótesis se refuerza de acuerdo con un estudio realizado por Kastorini *et al.* (2011), donde señala que la dieta mediterránea puede ser una herramienta útil para disminuir el peso corporal, especialmente cuando la dieta tiene una restricción energética y/o está asociada a la actividad física con una duración superior a 6 meses.

El efecto de la intervención con dieta mediterránea sobre la presión arterial no está claro debido a las diferencias metodológicas y clínicas entre los estudios controlados y aleatorios que se han llevado a cabo. En 2021, un metaanálisis concluyó que la incorporación del patrón de dieta mediterránea puede disminuir la presión arterial levemente, sin embargo, los efectos son más significativos cuando los voluntarios inician la intervención con valores de presión arterial elevados, principalmente PAS. Asimismo, la duración de la intervención es un factor clave para potenciar el efecto reductor de la PA. En nuestro estudio, los resultados de presión arterial muestran que no hubo cambios significativos tras la intervención con o sin suplemento. Se ha descrito ampliamente que la dieta mediterránea junto con el estilo de vida mediterráneo puede mejorar la PAS. Jennings *et al.* (2019) concluyeron que la adherencia a la dieta mediterránea es eficaz para mejorar la salud cardiovascular, disminuyendo la presión arterial y la rigidez de las arterias en adultos mayores. Sin embargo, estos hallazgos han sido descritos tras 12 meses de intervención y en una población de 1294 participantes, por lo que nuevamente el número de participantes y el tiempo han sido una limitación en el presente estudio.

Con respecto a los hallazgos encontrados en los parámetros bioquímicos, las concentraciones de albúmina disminuyeron para ambos grupos, no obstante, esta disminución se debe principalmente a una normalización puesto que los valores medios parten de cantidades próximas al nivel superior de normalidad. El rango normal de albúmina plasmática es de 3.5 a 5.5 g/dl (nivel óptimo: 4.0 g/dl), por lo que la dieta tiende a que los sujetos se aproximen a su nivel de normalidad. (McPherson, 2022).

Por otra parte, los resultados referentes a las concentraciones de glucosa en sangre disminuyen, no llega a ser significativo, sin embargo, se puede considerar un logro importante ya que algunos de los participantes eran diabéticos. Estos resultados concuerdan con investigaciones recientes, que señalan que la Dieta Mediterránea es el enfoque dietético más efectivo para mejorar el control glucémico en pacientes con diabetes tipo 2 (Schwingsckack *et al.*, 2018; McPherson y Pincus, 2021). Este efecto protector se atribuye a que la dieta mediterránea mejora el metabolismo de la glucosa, reduce la presión arterial, mejora el perfil lipídico y disminuye los marcadores de oxidación e inflamación relacionados con la arteriosclerosis. Estos efectos son independientes de los polimorfismos de los principales genes implicados en los cambios lipídicos o la respuesta inflamatoria, lo que confirma la eficacia de la dieta mediterránea en la prevención de las enfermedades cardiovasculares y los principales factores de riesgo vascular, incluida la diabetes (Gómez-Delgado *et al.*, 2014).

En relación con las concentraciones de triglicéridos y colesterol también disminuyeron sin llegar a ser significativos. Este mismo comportamiento se aprecia para el colesterol HDL e inverso para el LDL. Sin embargo, debe tenerse presente que la concentración total de colesterol plasmático tiene un valor predictivo muy limitado respecto del riesgo cardiovascular global (Penalvo et al., 2015; González *et al.*, 2019). No obstante, la intervención dietética durante un mes y medio ha sido suficiente para disminuir el colesterol total en ambos grupos.

De las tres enzimas analizadas, es la γ GT la que muestra una disminución, se observa una normalización de las tres enzimas en sangre, lo que indica menor destrucción celular en los tejidos, sobre todo hepático, cardíaco y muscular. Se ha evidenciado el papel protector de la dieta mediterránea sobre el índice de hígado graso, en efecto, este patrón de alimentación está asociado con una disminución en el síndrome metabólico donde el hígado graso es el componente hepático. Estos resultados sugieren que una intervención con Dieta Mediterránea podría retrasar o enlentecer la progresión natural del hígado graso (Cueto-Galán *et al.*, 2016).

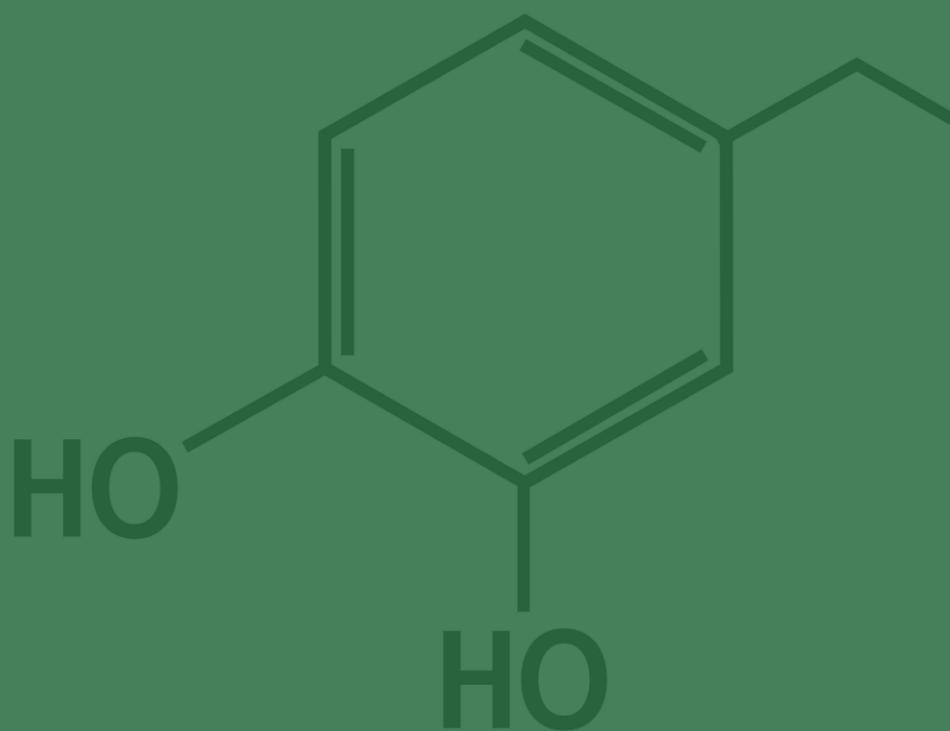
Con relación a los marcadores de estrés oxidativo los resultados indican que la intervención produce una disminución de ambos marcadores, sin embargo, las patologías cardiovasculares, diabetes e hipertensión siempre suponen un aumento de este proceso, aunque no se sabe si es causa o efecto de dichas patologías. Para disminuir cualquier situación de estrés oxidativo, es crucial ajustar con sumo cuidado el aporte de antioxidantes de la dieta (tocoferol, CoenzimaQ, Retinol, polifenoles, ácido ascórbico, etc) pero sobre todo maximizar el contenido en oleico de la grasa de la dieta (Barbosa *et al.*, 2008).

Por su parte, el descenso de MDA es igual para ambas dietas experimentales, aunque esto lo podemos atribuir parcialmente a que esta técnica es menos precisa que la de hidroperóxidos y que en general el MDA es eliminado con más rapidez que hidroperóxidos por mecanismos específicos (Delgado Roche *et al.*, 2009).

A pesar, de todos los efectos beneficiosos que la dieta mediterránea aporta a la prevención enfermedades cardiovasculares, el grado de evidencia científica que aportan los artículos publicados es todavía insuficiente. En general, la mayoría de los estudios han afianzado que la dieta mediterránea muestra efectos beneficiosos sobre fenotipos finales e intermedios de la enfermedad, tanto para la prevención primaria como para la secundaria. La calidad de las pruebas de los modestos beneficios sobre los factores de riesgo de ECV en la prevención primaria es baja o moderada (Rees *et al.*, 2019). No obstante, son necesarios más estudios aleatorizados, controlados, de intervención con dieta mediterránea que proporcionen mayor grado de evidencia científica, y permitan establecer recomendaciones dietéticas y de estilo de vida adecuadas para la prevención de ECV.

Conclusión

Tras el análisis del estudio, se observa que la ingesta durante 6 semanas de dieta mediterránea, suplementada o no con antioxidantes característicos de esta dieta, y sin modificación de cambios en los estilos de vida no provoca efectos positivos sobre la prevención de las ECV. No obstante, observamos cierta tendencia en la mejora de parámetros claves como IMC y presión arterial cuando se normaliza la dieta lo que no se constata con la suplementación de antioxidantes. Evidenciando que la normalización de la dieta es la mejor opción. Por lo tanto, se requieren más estudios que evalúen el efecto de una dieta mediterránea acompañada de un estilo de vida mediterráneo para poder establecer los beneficios reales y cuáles son los parámetros más importantes que contribuyen a dichos beneficios.



HIDROXITIRO SOL

HIDROXITIRO SOL

Sección II. Toxicidad oral aguda/subaguda y subcrónica de un extracto de aceite de oliva virgen rico en hidroxitirosol

Los extractos de AOV ricos en componentes bioactivos pueden ejercer actividades funcionales beneficiosas para la salud, justificando su posible incorporación como ingredientes para enriquecer los mismos aceites o incluso otros tipos de alimentos a los que les aportarán propiedades saludables. Sin embargo, es necesario demostrar la seguridad alimentaria y la ausencia de toxicidad de estos extractos en estudios que sigan las directrices establecidas por los organismos de seguridad alimentaria (OCDE-408), con el fin de que puedan ser aprobados como ingredientes funcionales y nutraceuticos para el tratamiento de enfermedades crónicas.

Objetivos específicos

- Evaluar la toxicidad aguda (24 horas) de un extracto acuoso de AOV rico en hidroxitirosol según la normativa 408 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), en ratas.
- Evaluar la toxicidad subaguda tras 14 días de ingesta de un extracto acuoso de AOV rico en hidroxitirosol
- Evaluar la toxicidad subcrónica tras 90 días de ingesta de un extracto acuoso de AOV rico en hidroxitirosol

Material y Métodos

Para evaluar la toxicidad del hidroxitirosol se siguió el protocolo descrito en las disposiciones de la Directiva 92/69 / CEEE-OECD 408, según las Directrices de la OCDE-408 para el ensayo de productos químicos, N° 408, titulada "Estudio de toxicidad oral de dosis repetidas durante 90 días en roedores"(Directiva 92/69/CEEE-OECD 408).

La evaluación de la **toxicidad aguda/subaguda** del extracto acuoso de AOV rico en hidroxitirosol se llevó a cabo durante 14 días, tras la administración de una dosis única de 300 mg/kg (ensayo agudo), o una dosis única de 2000 mg/kg (ensayo subagudo) en el agua de bebida; además de un grupo control.

Para la evaluación de la **toxicidad subcrónica** los animales recibieron una dosis diaria de 100 mg de hidroxitirosol/kg/d, considerada una dosis baja, 300 mg/kg/d, considerada la dosis intermedia, y 1000 mg/kg/d, considerada la dosis alta. Además, se incluyó un grupo control que no recibió ningún extracto en el agua de bebida.

Preparación del extracto de AOV estudiado

El extracto de AOV rico en hidroxitirosol fue suministrado por EXTRACTOS Y DERIVADOS, S.L. (Granada, España). El extracto contenía una concentración inicial del 15% de hidroxitirosol, confirmada por HPLC-UV (Agilent serie 1260) utilizando una columna cromatográfica Hypersil Gold 5 μm (4.6 mm x 100 mm).

El extracto de AOV se administró en el agua de bebida para minimizar la manipulación de los animales. Tras calcular la cantidad media diaria de ingesta de agua, se prepararon diluciones del extracto en agua mili Q para conseguir diferentes dosis finales de hidroxitirosol: 100 mg/kg (dosis baja), 300 mg/kg (dosis intermedia) y 1000 mg/kg (dosis alta). Las dosis se ajustaron según el peso corporal de la rata dos veces por semana (lunes y jueves) y se prepararon 500 ml del agua enriquecida para los siguientes tres días.

Estudio piloto

En primer lugar, realizamos un estudio piloto para establecer el protocolo de intervención. Se mantuvieron tres ratas en jaulas metabólicas individuales para controlar la ingesta de comida y agua durante cinco días. A continuación, se colocaron las tres ratas juntas en una jaula y se confirmaron las cantidades ingeridas de comida y agua durante cinco días. En este estudio piloto comprobamos que la ingesta de comida y agua (37 mL/d) era similar cuando las ratas se colocaban de forma independiente o en grupos de tres animales.

Diseño del estudio

Antes de comenzar el período experimental, los animales se mantuvieron en jaulas de tipo III (1650 x 690 x 1870 cm) durante cinco días para su aclimatación. Ochenta ratas Wistar SHD (origen HARLAN Ltd) de tres semanas de edad, se dividieron aleatoriamente en tres grupos de intervención, y un grupo control (10 machos y n=10 hembras por grupo). Se colocaron aleatoriamente tres animales por jaula ajustando por peso, de manera que las diferencias de peso corporal en los cuatro grupos fueron inferiores al 20%. Los animales se mantuvieron en módulos con un nivel sonoro < 65 dB, renovación del aire 15-17/h, luz < 325 lux y ciclos de luz/oscuridad de 12 h, temperatura 20-24 °C y humedad HR 50+10%.

Para la toxicidad aguda/subaguda del extracto acuoso de AOV rico en hidroxitirosol se utilizaron 16 ratas que fueron divididas en tres grupos. El grupo experimental recibió una dosis única de 300 mg/kg (n=3) en el agua de bebida (ensayo agudo), un segundo grupo recibió una dosis de 2000 mg/kg (n=4) en el agua de bebida durante 14 días (ensayo subagudo), y el tercer grupo control no recibió ningún suplemento en el agua de bebida (n=9).

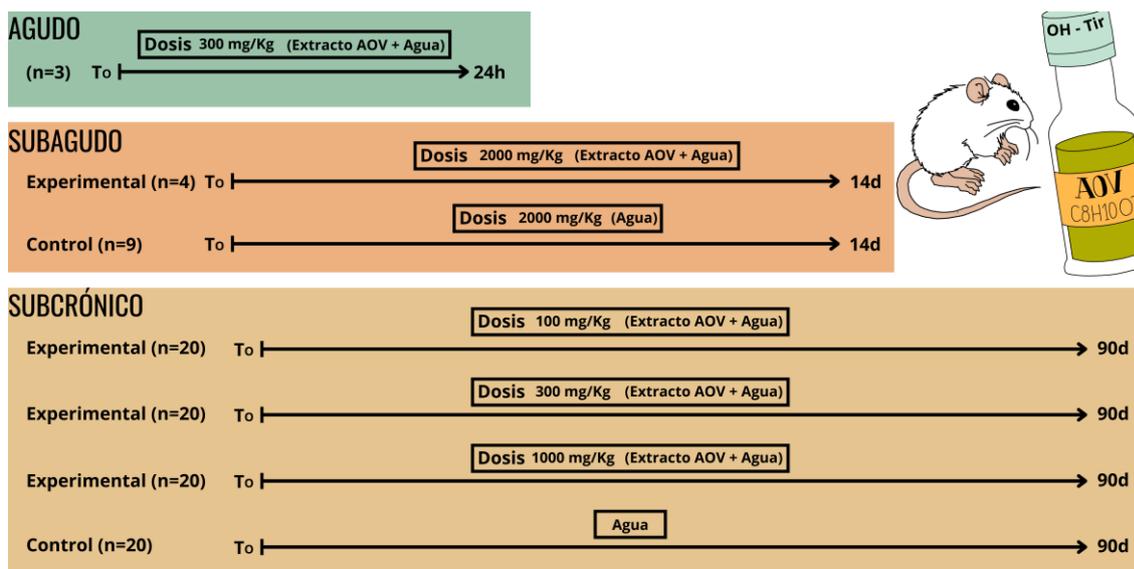


Figura 9. Diseño experimental del estudio agudo/subagudo y subcrónico siguiendo el protocolo descrito en las disposiciones de la Directiva 92/69 / CEEE-OECD 408.

El estudio subcrónico incluyó 80 ratas distribuidas en cuatro grupos (n=20: 10 machos y 10 hembras) que recibieron diariamente tres dosis diferentes que se ajustaron según su peso, del extracto de AOV en el agua de bebida durante 90 días. El grupo 1 recibió una dosis diaria de 100 mg del extracto/kg de peso; el grupo 2 recibió una dosis diaria de 300 mg de extracto/kg de peso; el grupo 3 recibió una dosis diaria de 1000 mg de extracto/kg de peso. Paralelamente, se siguió un grupo control (n=20: 10 machos y 10 hembras) que no recibió ningún extracto en el agua de bebida.

Durante el periodo de tratamiento se evaluaron signos clínicos y el peso corporal, se llevaron a cabo observaciones funcionales de reactividad sensorial y motora, y análisis hematológicos y bioquímicos, histopatología macroscópica y microscópica.

Evaluación y consumo

El consumo del extracto de AOV se midió cada tres días. La ingesta de agua con el extracto de AOV se calculó por diferencia entre una cantidad preparada (500 mL/botella) y la restante, entre las tres ratas que había en cada cubeta, reponiendo una nueva botella con la dosis ajustada al peso cada tres días. Todos los animales recibieron comida *ad libitum*.

El peso corporal se controló dos veces por semana. Para evaluar la posible reacción ocasionada por la ingesta del extracto del AOV, durante los 90 días del estudio se analizó cada rata en busca de signos visibles de morbilidad y mortalidad, según las especificaciones del test de Irwin (Irwin, 1968). La exploración se realizó dos veces al día, entre las 8:00-9:00 de la mañana y las 19:00-21:00 de la tarde. Se evaluaron los signos de toxicidad durante los 90 días de intervención basándose en las directrices de la OCDE. Los signos de toxicidad buscados fueron:

- Signos de percepción: alerta, estereotipia, pasividad.
- Signos de estado de ánimo: ordenado, inquieto, irritable-agresivo.
- Signos de actividad motora: espontaneidad, reactividad, respuesta táctil.
- Signos de excitación y depresión del sistema nervioso central (SNC): cola levantada, temblores y convulsiones.
- Signos de coordinación motora: recuperación del salto mortal
- Diarrea.
- Salivación.
- Signos cutáneos cambios en la piel y el pelaje
- Modificaciones en la mucosa ocular.

Análisis hematológicos y bioquímicos

Al final del periodo experimental, los animales fueron anestesiados con anestesia inhalatoria con isoflurano, en un equipo de anestesia móvil CA-EAC22, CIBERTEC (Madrid España). Posteriormente, se extrajeron muestras de sangre de la vena sublingual. Se recogió 1 ml de sangre en un tubo con EDTA, que se agitó ligeramente y se mantuvo a temperatura ambiente hasta un máximo de 3 a 4 h para los análisis hematológicos. El resto de la sangre (2-3 mL) se recogió con heparina, se centrifugó a 3000 rpm, y el plasma separado se congeló a -80°C inmediatamente para el análisis bioquímico.

Los parámetros hematológicos se determinaron en las muestras de sangre utilizando un analizador de diagnóstico Mythic 22 CT C2, Orphe, (Shenzhen, China). Se determinaron como índices eritrocitarios el recuento total de glóbulos rojos (RBC), la hemoglobina, el porcentaje del volumen sanguíneo total ocupado por glóbulos rojos (volumen de glóbulos rojos empaquetados, PCV), el volumen corpuscular medio (MCV), la hemoglobina corpuscular media (MCH), la concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC) y la distribución del tamaño de los glóbulos rojos (RDW). El recuento total de glóbulos blancos (WBC), y los neutrófilos diferenciados (NEU), monocitos (MON), linfocitos (LYM), eosinófilos (EOS) y basófilos (BAS) se determinaron como recuento total y como porcentajes. El recuento total de plaquetas (PLT), el volumen medio de plaquetas (MPV), el porcentaje del volumen total de sangre ocupado por las plaquetas (HTC) y la anchura de distribución de las plaquetas (PDW) se determinaron como índices plaquetarios.

Los parámetros bioquímicos plasmáticos: glucosa, colesterol total, TAG, proteínas totales, albúmina, aspartato aminotransaminasa (AST), alanina aminotransaminasa (ALT), bilirrubina total, urea, creatinina, sodio, potasio, cloro, fósforo y creatinina quinasa-MB (CK-MB) se analizaron en un analizador químico BS-200 (Shenzhen Mindra y Biomedical Electronics, Shenzhen, China). Las globulinas se calcularon como la diferencia entre las proteínas totales y la albúmina, y también se calculó la relación albúmina/globulinas.

Examen histopatológico

Tras el sangrado, los animales anestesiados fueron sacrificados con la inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (30-40 mg/kg de peso corporal) para la posterior necropsia, que se realizó según los criterios éticos de Feldman *et al.* (1988). Las ratas fueron examinadas cuidadosamente en busca de anomalías externas. A continuación, se extrajeron diferentes órganos y se evaluó su aspecto macroscópico. Se estudiaron biopsias en 12 órganos o sistemas diferentes: cerebelo, corazón, esófago, glándula salival, gónadas, hueso, médula ósea, nervio, páncreas, piel, tráquea y timo. Para las biopsias, las muestras de tejido se conservaron en frascos de formalina tamponada al 10% y se incluyeron en bloques de parafina. En cada bloque se realizaron secciones con micrótopo rotatorio y se utilizó hematoxilina y eosina para la tinción antes del examen microscópico.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como valores medios \pm error estándar de la media (SEM). Tras comprobar la normalidad de las variables mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Levene, se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para comparar los valores medios entre grupos. Las diferencias entre grupos se establecieron mediante la prueba post-hoc de Bonferroni para las varianzas homogéneas y la T2 de Tamhane para las variables de varianzas no homogéneas (cloruro, albúmina, fósforo, AST, ALT). Los valores atípicos para cada intervención se eliminaron si la curtosis > 1 y la asimetría > 1 en la distribución de las respuestas. En todos los casos, se incluyeron más del 80% de los datos. Todos los análisis se realizaron por intención de tratar. Un valor $p < 0,05$ se consideró significativo. Se utilizó el programa informático Statistical Package for the Social Sciences versión 20 para realizar el análisis estadístico (SPSS Inc.; Chicago, IL, EE.UU.).

Resultados

En el estudio piloto, se confirmó la idoneidad de colocar tres ratas por jaula en comparación con el mantenimiento de una sola rata por jaula. Se calculó el consumo diario de agua (37 mL/d) y fue similar cuando se colocaron tres animales juntos a los determinados cuando las ratas se colocaron individualmente.

Consumo de agua y evolución del peso

En el *estudio de toxicidad aguda/subaguda*, la ganancia de peso corporal fue continua sin diferencias significativas entre los animales del grupo de control y los animales suplementados con las dos dosis del extracto de AOV durante los 14 días.

En el *estudio de toxicidad oral subcrónica*, no se observaron diferencias significativas en el consumo de agua entre los cuatro grupos de intervención: 33 ± 0.19 mL/d para las ratas de control, y 38 ± 0.17 mL/d, 35 ± 0.27 mL/d y 31 ± 0.46 mL/d para las ratas suplementadas con 100, 300 y 1000 mg/kg/d,

respectivamente. Durante las dos primeras semanas del estudio, las ratas que recibieron la dosis alta de extracto de AOV bebieron un 25% menos de agua que el resto de los grupos (no significativo). Esta diferencia se normalizó en las siguientes semanas de intervención, lo que demuestra una aceptación organoléptica del extracto de AOV.

El crecimiento fue normal y similar entre los animales del grupo control y los tres grupos de intervención (Figura 10).

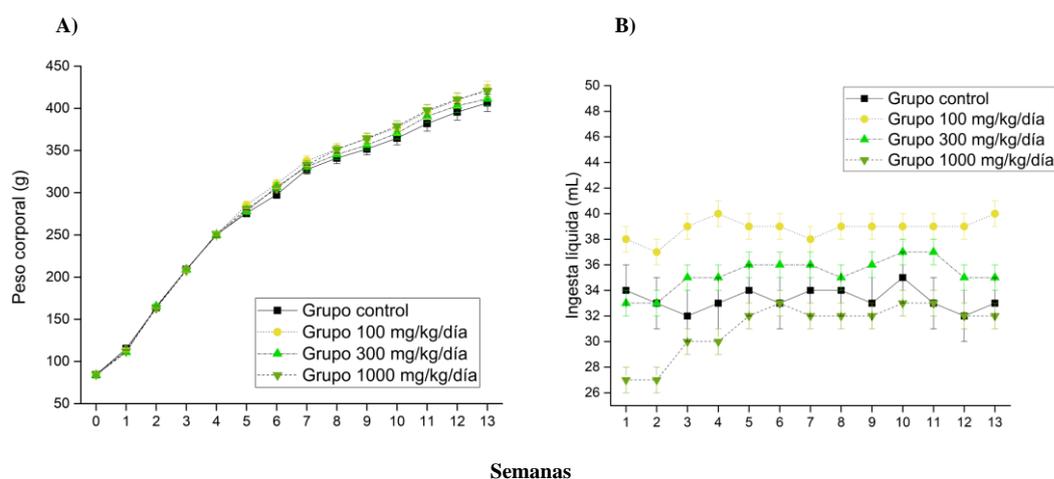


Figura 10. A) Evolución del peso corporal durante los 90 días de intervención. B) Evolución de ingesta líquida durante los 90 días de intervención. Los datos se expresan en medias \pm SEM. Se utilizó la prueba ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Bonferroni para comparar los resultados entre los grupos en cada punto temporal. $P < 0,05$ se consideró significativo. Análisis de varianza de una vía, ANOVA.

Evaluación clínica: Test de Irwin

En el *estudio de toxicidad aguda/subaguda*, no se observaron temblores, convulsiones, entumecimiento, salivación o diarrea ni a las 24 h de la administración de la dosis aguda, ni durante la administración de la dosis subaguda durante 14 días. Tampoco se detectaron alteraciones en la piel, ni en el pelo de los ojos. El color de la orina fue normal durante la manipulación en todos los casos.

En el *estudio de toxicidad subcrónica*, La tasa de supervivencia de los animales al final del experimento fue del 100%. El color del pelo era normal en todos los animales. Se observaron casos accidentales de pequeña alopecia en cuatro ratas (dos ratas del grupo suplementado con la dosis baja (100 mg/kg/d) y dos ratas del grupo suplementado con la dosis intermedia (300 mg/kg/d). En esos cuatro animales no se observaron hongos mediante la lámpara de Wood, y la administración de dos dosis de un tratamiento tópico con fungizel (tolnaftato, lindano y ácido benzoico) consiguió la recuperación de las

zonas calvas al cabo de 15 días. El resto de los animales presentaron un aspecto de piel y pelaje normal durante los 90 días de estudio.

No se observó ningún signo clínico alterado de diarrea, salivación, alteración de la mucosa ocular, estimulación o depresión del sistema nervioso central, ni de la forma de caminar (con el abdomen moviéndose hacia atrás) en los 80 animales de los cuatro grupos experimentales, incluyendo el grupo de control y los animales tratados con las tres dosis del extracto de AOV, durante los 90 días de intervención. Además, no se observaron temblores, convulsiones ni adormecimiento de las extremidades. El color de la orina fue normal en todos los animales.

Biomarcadores hematológicos

Los datos hematológicos de los animales incluidos en el *estudio de toxicidad aguda/subaguda* se indican en la Tabla 6. Todos los biomarcadores hematológicos estaban dentro del rango de normalidad al inicio y al final del estudio. El recuento de glóbulos rojos y la hemoglobina fueron mayores en el grupo suplementado con la dosis máxima de los extractos de AOV que en los animales suplementados con la dosis baja y el control ($p=0.005$ y $p=0.029$ respectivamente). El PCV% y el recuento de MON fueron mayores en el grupo suplementado con la dosis baja que en la dosis alta y en el grupo control ($p=0.033$). El resto de los parámetros hematológicos fueron similares en todos los grupos.

Los datos hematológicos *del estudio subcrónico* se indican en la Tabla 8. Todos los biomarcadores hematológicos estaban dentro de los rangos de normalidad tras los 90 d de intervención en todos los grupos. El recuento de glóbulos rojos, el PCV y el MCV fueron menores en el grupo suplementado con la dosis baja del extracto de AOV que en los animales suplementados con la dosis alta ($p=0.010$ y $p=0.010$ respectivamente). El MCH fue mayor en el grupo suplementado con la dosis alta que en los grupos de control y de dosis intermedia ($p=0.001$), mientras que el MCHC fue menor en el grupo de dosis alta que en los otros grupos ($p=0.001$). El recuento y los porcentajes de glóbulos blancos totales y diferenciados fueron similares en todos los grupos de animales, excepto el porcentaje de neutrófilos, que fue inferior en el grupo de dosis alta que en los demás grupos ($p=0.094$). El recuento de plaquetas y el VPM fueron mayores en el grupo de control que en el que recibió 100 mg/kg/d ($p=0.063$), mientras que el VPM fue menor en el grupo de control frente a los grupos suplementados, y mayor en el de dosis baja ($p=0.001$). El resto de los parámetros hematológicos fueron similares en todos los grupos.

Tabla 6. Parámetros hematológicos de las ratas después de 14 días tras la administración de una dosis aguda (300 mg/kg) y subaguda (1000 mg/kg) del extracto de AOV

	Control	300 mg/kg (dosis intermedia)	2000 mg/kg/d (dosis máxima)
RBC (10 ⁶ /μL)	7.05±0.21 ^{ab}	4.57±1.26 ^a	7.58±0.21 ^b
Hemoglobina (g/dL)	14.0±0.4 ^a	10.1±2.7 ^b	14.8±0.3 ^{ab}
PCV%	38.5±1.2 ^a	27.7±7.8 ^b	14.8±0.3 ^{ab}
MCV (fl)	54.63±0.99	60.0±5.65	53.87±1.06
MCH	19.94±0.38	22.16±2.29	36.32±0.28
MCHC (g Hb/dL)	36.53±0.27	36.90±0.81	36.32±0.28
RDW	15.27±1.14	15.0±0.94	15.0±0.94
WBC (10 ⁶ /μL)	8.86±0.82	6.13±1.61	13.60±4.47
LYM (10 ⁶ /μL)	4.66±0.49	4.03±1.31	4.72±0.46
MON (10 ⁶ /μL)	0.11±0.02	0.20±0.05	0.12±0.02
EOS (10 ⁶ /μL)	0.11±0.06	0.06±0.03	0.07±0.04
BAS(10 ⁶ /μL)	0.17±0.03	0.13±0.03	0.25±0.02
LYM%	83.8±0.8	85.9±2.2	78.2±5.3
MON%	1.9±0.1 ^a	3.5±0.3 ^b	2.3±0.4 ^{ab}
EOS %	2.14±0.91	1.43±0.35	1.42±0.53
BAS%	3.2±0.2	2.9±0.6	4.4±0.8
PLT (10 ³ /μL)	732.0±96.7	596.0±252.0	660.5±168.3
MPV (fL)	6.60±0.36	7.80±0.68	6.80±0.30
PCT %	0.48±0.07	0.49±0.21	0.44±0.11
PDW	13.28±1.42	14.43±0.63	16.22±3.64

Los datos se expresan en medias ± SEM (error estándar de la media). Se utilizó la prueba ANOVA para comparar los resultados entre grupos y la prueba post hoc de Bonferroni para las comparaciones múltiples entre grupos. Letras de superíndice diferentes indican diferencias significativas entre los grupos (a,b). $p < 0.05$ ha sido considerado significativo. AOV, aceite de oliva virgen; BAS, basófilos; EOS, eosinófilos, LYM, linfocitos; MCH, hemoglobina corpuscular media; MCHC, concentración de hemoglobina corpuscular media; MCV, volumen corpuscular medio; MON, monocito; VPM, volumen plaquetario medio; PCT, porcentaje del volumen sanguíneo total ocupado por las plaquetas; PCT, porcentaje del volumen sanguíneo total ocupado por los glóbulos rojos, volumen de glóbulos rojos empaquetados; PDW, anchura de distribución de las plaqueta; PLT, recuento total de plaquetas; RBC, recuento total de glóbulos rojos; RDW, distribución del tamaño de los glóbulos rojos; WBC, Recuento total de glóbulos blancos.

Tabla 7. Parámetros hematológicos de las ratas después de 90 días de intervención con diferentes dosis del extracto de AOV.

	Control	100 mg/d (dosis baja)	300 mg/d (dosis intermedia)	1000 mg/d (dosis alta)
RBC (10 ⁶ /μL)	7.51±0.32 ^{ab}	6.22±0.42 ^a	7.59±0.25 ^{ab}	7.99±0.49 ^b
Hemoglobina (g/dL)	14.0±0.5	12.1±0.8	14.3±0.5	13.2±0.7
PCV%	41.4±1.6 ^{ab}	33.9±2.3 ^a	41.0±1.4 ^{ab}	44.7±3.1 ^b
MCV (fl)	54.64±0.50 ^{ab}	54.71±0.63 ^a	54.0±0.38 ^{ab}	56.8±0.80 ^b
MCH	18.85±0.22 ^a	19.84±0.71 ^{ab}	18.79±0.26 ^a	16.17±0.96 ^b
MCHC (g Hb/dL)	34.50±0.305 ^a	36.18±1.00 ^a	34.79±0.34 ^a	28.85±1.86 ^b
RDW	14.04±0.12	14.92±0.62	13.79±0.14	14.77±0.21
WBC (10 ⁶ /μL)	4.85±0.46	3.19±0.37	4.44±.51	4.21±0.44
LYM (10 ⁶ /μL)	3.80±0.36	2.54±0.40	3.42±0.50	3.60±0.40
MON (10 ⁶ /μL)	0.06±0.02	0.08±0.03	0.07±0.01	0.10±0.02
NEU (10 ⁶ /μL)	0.76±0.09	0.51±0.09	0.63±0.09	0.48±0.08
EOS (10 ⁶ /μL)	0.05±0.02	0.09±0.03	0.16±.011	0.10±0.04
BAS(10 ⁶ /μL)	0.13±0.01	0.08±0.02	0.12±0.02	0.09±0.02
LYM%	78.0±1.6	73.8±2.8	75.9±4.1	84.1±1.4
MON%	1.4±0.3	2.3±0.7	1.5±0.2	2.9±0.7
NEU%	16.0±1.2 ^a	16.60±2.09 ^a	15.51±1.82 ^a	8.26±1.28 ^b
EOS %	1.5±0.5	3.86±1.20	3.99±2.52	3.1±1.00
BAS%	3.0±0.3	3.45±0.50	3.08±0.33	2.66±.26
PLT (10 ³ /μL)	684.5±70.9 ^a	399.1±68.3 ^b	541.7±63.8 ^{ab}	424.8±72.2 ^{ab}
MPV (fL)	6.13±0.06 ^a	7.23±0.38 ^{bc}	6.43±0.18 ^{ab}	7.19±0.30 ^c
PCT %	0.38±0.034	0.26±0.04	0.33±0.04	0.28±0.05
PDW	12.02±1.02	13.20±1.03	13.56±1.20	12.70±1.56

Los datos se expresan en medias ± SEM (error estándar de la media). Se utilizó la prueba ANOVA para comparar los resultados entre grupos y la prueba post hoc de Bonferroni para las comparaciones múltiples entre grupos. Letras de superíndice diferentes indican diferencias significativas entre los grupos (a,b,c,d). $P < 0.05$ ha sido considerado significativo. AOV, aceite de oliva virgen; BAS, basófilos; EOS, eosinófilos; LYM; linfocitos, MCH, Hemoglobina corpuscular media; MCHC, concentración media de hemoglobina corpuscular; MCV, volumen corpuscular medio; MON, monocitos; VPM, volumen plaquetario medio; NEU, neutrófilos diferenciados; PCT, porcentaje del volumen sanguíneo total ocupado por plaquetas; PCT, porcentaje del volumen sanguíneo total ocupado por los glóbulos rojos Volumen de glóbulos rojos empaquetados; PDW; anchura de distribución de las plaqueta; PLT, recuento total de plaquetas; RBC, recuento total de glóbulos rojos; RDW, distribución del tamaño de glóbulos rojos; WBC, recuento total de glóbulos blancos.

Biomarcadores bioquímicos en plasma

Las concentraciones plasmáticas de los biomarcadores bioquímicos en plasma de los animales incluidos en el *estudio de toxicidad aguda/subaguda* se indican en la Tabla 8. La CK-MB fue mayor en el grupo suplementado con la dosis baja (300 mg/kg) del extracto de AOV en comparación con la dosis alta y el grupo de control ($p=0.041$). El resto de los parámetros bioquímicos fueron similares en todos los grupos tras 90 días de intervención con el extracto acuoso de AOV.

Tabla 8. Parámetros bioquímicos plasmáticos. Toxicidad subaguda tras 14 días de intervención con diferentes dosis del extracto de VOO.

	Control	300 mg (dosis baja)	2000 mg (dosis intermedia)
Glucosa (mg/dL)	149.91±5.27	135.07±11.73	145.11±9.15
Colesterol (mg/dL)	64.54±2.87	64.54±2.98	77.89±3.09
Triglicéridos (mg/dL)	99.12±13.97	101.82±22.55	69.72±13.70
Proteínas (g/dL)	5.72± 0.11	5.60±0.10	5.86±0.15
Albumina (g/dL)	3.05±0.03	2.93±0.06	3.04±0.04
AST (U/L)	89.74±6.13	91.19±9.57	81.17±7.56
ALT (U/L)	35.59±2.44	32.06±0.86	31.19±1.83
Bilirrubina (mg/dL)	0.15 ± 0.03	0.14±0.02	0.12±0.01
Urea (mg/kg/dL)	27.7±1.6	26.9±4.06	29.6±2.5
Creatinina (mg/kg/dL)	0.12±0.02	0.08±0.03	0.05±0.02
Sodio (mg/kg/dL)	232.73±5.79	242.77±17.33	250.99±14.50
Potasio(mg/kg/dL)	123.55±21.35	210.04±27.07	134.44±41.81
Cloruro (mg/kg/dL)	310.5±2.0	300.0±2.3	303.1±6.4
Fósforo (mg/dL)	3.8±0.13	3.9±0.17	4.1±0.18
CK-MB (U/L)	374.6±36.3 ^a	549.8±22.14 ^b	418.0±29.8 ^{ab}

Los datos son medias ± SEM. Se utilizó la prueba ANOVA para comparar los resultados entre grupos y la prueba post hoc de Bonferroni para las comparaciones múltiples entre grupos. Letras de superíndice diferentes indican diferencias significativas entre los resultados posteriores a la intervención (a, b). ALT, alanina aminotransaminasa; AST, aspartato aminotransaminasa; CK-MB, Isoenzima creatinina-kinasa.

Las concentraciones plasmáticas de los biomarcadores bioquímicos en plasma de los animales incluidos en el *estudio de toxicidad subcrónica* (90 días) se incluyen en la Tabla 9. Los niveles plasmáticos de glucosa fueron menores en el grupo suplementado con la dosis baja del extracto de VOO en comparación con el grupo suplementado con la dosis alta ($p=0.018$). Los niveles plasmáticos de proteínas totales fueron menores en el grupo suplementado con la dosis intermedia del extracto de VOO en

comparación con el grupo control ($p=0.024$). La bilirrubina plasmática fue mayor en el grupo suplementado con la dosis intermedia que en los grupos de control y de dosis alta de suplemento ($p=0.001$). Los niveles de sodio fueron mayores en los grupos suplementados en comparación con el grupo de control ($p=0.001$). El resto de los parámetros bioquímicos fueron similares en todos los grupos.

Tabla 9. Parámetros bioquímicos plasmáticos tras 90 días de intervención con diferentes dosis del extracto de AOV

	Control	100 mg (dosis baja)	300 mg (dosis intermedia)	1000 mg (dosis alta)
Glucosa (mg/dL)	180.99±9.58 ^{ab}	154.38±6.74 ^{ab}	151.23±10.52 ^a	188.20±11.65 ^b
Colesterol (mg/dL)	73.83±3.20	76.34±2.98	65.70±4.29	76.12±3.77
Triglicéridos (mg/dL)	105.1±10.3	103.9±7.7	101.3±8.5	122.3±9.6
Proteínas (g/dL)	6.36± 0.06 ^a	6.05±0.11 ^{ab}	5.88±0.17 ^b	6.25±.10 ^{ab}
Albumina (g/dL)	3.2±0.02	3.2±0.03	3.2±0.07	3.4±0.115
Albumina/Globulina	1.0±0.5	1.0±0.3	1.1±0.7	1.2±0.3
AST (U/L)	96.20±8.73	87.38±.17.18	68.08±6.38	92.11±12.90
ALT (U/L)	43.03±3.74	33.33±1.93	34.41±2.85	37.04±3.31
Bilirrubina (mg/dL)	0.69 ± 0.005 ^a	0.74 ± 0.005 ^{ab}	0.77 ± 0.004 ^b	0.70 ± 0.024 ^a
Urea (mg/kg/dL)	45.8±1.4	41.1±1.5	43.2±1.9	43.4±1.7
Creatinina (mg/kg/dL)	0.32±0.02	0.26±0.02	0.27±0.03	0.25±.02
Sodio (mg/kg/dL)	183.60±4.52 ^a	237.14±8.64 ^b	214.06±7.75 ^b	226.28±8.16 ^b
Potasio(mg/kg/dL)	105.69±8.34	116.67±8.78	119.31±10.15	114.95±10.54
Cloruro (mg/kg/dL)	366.6±7.9	334.4±3.1	342.5±17.8	337.5±2.8
Fósforo (mg/dL)	5.7±0.0.21	4.9±0.21	6.7±0.93	5.8±0.24
CK-MB (U/L)	463.5±58.2	376.5±69.3	308.0±34.0	410.9±52.2

Los datos son medias ± SEM (n = 20), para cada grupo, excepto en el grupo de 100 mg y 300 mg porque se descartaron las muestras de lisis defectuosas. Se utilizó la prueba ANOVA para comparar los resultados entre grupos y la prueba post hoc de Bonferroni para las comparaciones múltiples entre grupos. P < 0,05 indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a su correspondiente grupo de control. Letras de superíndice diferentes indican diferencias significativas entre los resultados posteriores a la intervención (a, b.). VOO, Aceite de oliva virgen; ALT, Alanina aminotransaminasa; AST, Aspartato aminotransaminasa; CK-MB, Isoenzima creatinina-kinasa

Examen histopatológico

La autopsia de los animales incluidos en *el estudio subagudo* no mostró ninguna alteración macroscópica (es decir, de color, tamaño o textura) ni microscópica (Figura 11) de los órganos y tejidos examinados de los animales tratados con el extracto de AOV en comparación con los animales de control.

El examen macroscópico de los tejidos de los animales incluidos *en el estudio subcrónico* muestra que el cerebelo, el corazón, el esófago, las glándulas salivales, las gónadas, los huesos, la médula ósea, los nervios, el páncreas, la piel, la tráquea y el timo de las ratas tratadas con el extracto de AOV no reveló anomalías en su aspecto (color, tamaño o textura) en comparación con los animales control. No se observó ninguna alteración histológica macro o microscópica tras la intervención con ninguna de las tres dosis del extracto de AOV cuando se comparó con los animales de control. La evaluación microscópica no mostró ninguna discordancia histológica con una estructura normal y confirmó la ausencia de lesiones patológicas (Figura 12).

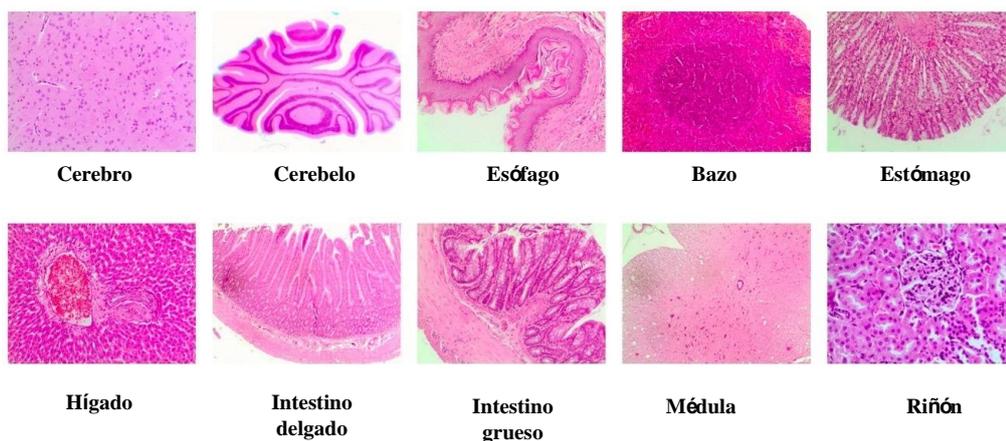


Figura 11. Evaluación microscópica representativa (10×) de tejidos seleccionados 14 días tras la administración de una dosis única de 2000 mg/kg/d de un extracto de AOV en el estudio agudo/subagudo. Aceite de oliva virgen (AOV).



Figura 12. Evaluación microscópica representativa (10×) de tejidos seleccionados después de la intervención con la dosis alta (1000 mg/kg/d) del extracto de AOV durante 90 d en el estudio es subcrónico. Aceite de oliva virgen, AOV.

Discusión

El AOV es la principal fuente de grasa de la Dieta Mediterránea y se ha asociado a los beneficios saludables que se atribuyen a este patrón dietético (Yubero-Serrano *et al.*, 2019). Las alegaciones de salud relacionadas con el AOV de la EFSA proponen la eficacia del AOV que contiene al menos 5 mg de hidroxitirosol y sus compuestos relacionados (tirosol y oleuropeína) por cada 20 g de aceite (EFSA, 2011). Por tanto, el enriquecimiento de este aceite con sus propios compuestos bioactivos supone una mejora del aceite y es uno de los objetivos actuales de la industria oleícola. Sin embargo, es necesario demostrar la seguridad de los concentrados de compuestos bioactivos del AOV antes de que puedan utilizarse para el enriquecimiento de aceites dietéticos u otros alimentos, o para su uso como nutracéutico. El presente estudio demuestra la ausencia de efectos tóxicos 14 días después de la administración de una dosis única de 300 mg/kg/d o 2000 mg/kg de un extracto de AOV rico en hidroxitirosol, en un estudio de toxicidad aguda/subaguda, y tras la suplementación subcrónica durante 90 días con 100 mg/kg/d, 300 mg/kg/d y 1000 mg/kg/d, según las directrices de la OCDE-408.

Una dieta rica en polifenoles puede estar inversamente asociada a la mortalidad por ECV, al desarrollo de ciertos tipos de cáncer e incluso al estado de ánimo (Godos *et al.*, 2018). Las pruebas epidemiológicas sugieren que los fenoles presentes en el aceite de oliva pueden desempeñar un papel importante en la reducción de la inflamación, los radicales libres y la carcinogénesis, así como mejorar la composición de la microbiota intestinal (Godos *et al.*, 2018; Grosso, 2018). Borzi *et al.* (2019) señalan que los polifenoles del

aceite de oliva ejercen un efecto protector contra el cáncer colorrectal. Estos estudios ponen de manifiesto la necesidad de investigar las dosis a las que los polifenoles inducen sus efectos sobre la salud.

Las investigaciones sobre los polifenoles del AOV son muy amplias, y se ha investigado su metabolismo y transformación en moléculas biodisponibles responsables de las acciones preventivas atribuidas, incluyendo la transformación de carcinógenos, y la modulación de las vías responsables de la señalización de las células cancerosas y la progresión del ciclo celular (Groso, 2018). El hidroxitirosol ha demostrado tener actividades antioxidantes, antiinflamatorias, hipocolesterolemiantes y proapoptóticas (Parkinson y Cicerali, 2016) que pueden ser responsables de las propiedades cardioprotectoras y antitumorales atribuidas a esta molécula (de Pablos *et al.*, 2019; Karkovic'y *et al.*, 2019).

Nuestros resultados muestran que, aunque se observaron pequeñas diferencias hematológicas y bioquímicas entre el grupo control y el suplementado con extracto de AOV, éstas no siguieron un patrón dependiente de la dosis, y todos los parámetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e histológicos evaluados se encontraban dentro de los rangos de normalidad en todos los animales, lo que indica que no hay efecto toxicológico de este extracto en la duración y las dosis examinadas. Estos resultados son de gran interés, ya que garantizan que el enriquecimiento de los AOV u otros alimentos con el extracto de AOV puede ser una buena herramienta para la preparación industrial de alimentos funcionales que pueden ser utilizados como coadyuvantes para la prevención o el tratamiento de enfermedades crónicas no transmisibles como las cardiovasculares, cáncer, entre otras.

En la actualidad, existen pocos estudios que hayan evaluado la toxicidad aguda, subcrónica o crónica de los extractos de AOV (Soni *et al.*, 2006). El principal componente del AOV es el hidroxitirosol y los estudios de investigación suelen definir la composición de los aceites de oliva o extractos obtenidos en relación con el contenido de este polifenol principal. Un estudio toxicológico agudo con un extracto acuoso de pulpa de aceituna que contenía aproximadamente 400 mg/kg de hidroxitirosol describió una mortalidad y efectos tóxicos nulos (Christian *et al.*, 2004). Estos autores evaluaron el efecto tóxico de una dosis única de 5 g/kg de peso, y establecieron una dosis letal 50 (DL50) de unos 3,5 g de hidroxitirosol/kg de peso. Además, se evaluó la toxicidad subcrónica de la administración de dosis de 1.000, 1.500 y 2.000 mg de hidroxitirosol/kg de peso durante 90 días, sin observar cambios significativos asociados a los componentes del extracto de AOV (Heilman *et al.*, 2015). Otros autores han informado de efectos tóxicos no significativos tras un ensayo de toxicidad subcrónica de 90 días de un extracto con un 35% de hidroxitirosol, a dosis de 125, 250 y 500 mg de hidroxitirosol/kg/d (Kirkland *et al.*, 2015). Estos autores sugirieron una disminución del peso corporal y un aumento del peso relativo del hígado, el timo, los riñones y el bazo provocado por la ingesta de 250 y 500 mg/kg/d en ratas macho. Además, Kirkland *et al.* (2015) evaluaron la toxicidad aguda de un extracto enriquecido con hidroxitirosol (40%) y determinaron que 2000 mg de hidroxitirosol/kg eran bien tolerados.

Por otro lado, pocos estudios han evaluado la seguridad del hidroxitirosol puro en animales siguiendo las directrices de la OCDE-408. Por ejemplo, Auñon-Calles *et al.* (2013) evaluaron el potencial

toxicológico oral subcrónico del hidroxitirosol puro en ratas, e informaron que la administración oral de hidroxitirosol durante 90 días, a dosis de 5, 50 y 500 mg/kg de peso corporal, no indujo efectos que pudieran considerarse de relevancia toxicológica. Estos autores propusieron un nivel sin efectos adversos observados (NOAEL) de 500 mg/kg/d de hidroxitirosol puro. Anteriormente, D'Angelo *et al.* (2001) no encontraron efectos tóxicos tras la administración de una dosis única de 2 g/kg de peso corporal en ratas. Además, Martínez *et al.* (2018) evaluaron la toxicidad oral aguda durante 28 días de 2000 mg/kg/d de un hidroxitirosol fosfatidil-derivado, que no muestra efectos tóxicos en comparación con los animales de control.

En conclusión, el presente estudio demuestra la ausencia de toxicidad aguda/subaguda y subcrónica de un extracto de AOV que contiene un 15% de hidroxitirosol, como principal componente evaluado siguiendo las directrices de la OCDE-408. Estos resultados garantizan la seguridad alimentaria del uso del extracto de AOV rico en hidroxitirosol.

Conclusión

La administración oral de un extracto de aceite de oliva virgen que contiene un 15% de hidroxitirosol no indujo efectos que puedan considerarse de relevancia toxicológica en ensayo agudo, subagudo y subcrónico en un modelo murino. En consecuencia, después de confirmar la amplia evidencia científica sobre los beneficios del hidroxitirosol, se confirma que puede ser un compuesto clave en el manejo de diversas enfermedades crónicas. Además de acuerdo a las acciones y propiedades que tiene este compuesto, actualmente está aceptado como novel food.

The image features a dark teal background with a faint, light teal chemical structure of Ursolic acid. The structure is a pentacyclic triterpene with a carboxylic acid group at the C-28 position. The text 'ÁCIDO URSÓLICO' is overlaid on the structure in a large, bold, white font. The word 'ÁCIDO' is positioned above 'URSÓLICO'.

**ÁCIDO
URSÓLICO**

Sección III. Efecto del consumo de Ácido Ursólico en la reducción de la grasa y la hipertrofia muscular en Humanos. Estudio Prospectivo, Doble Ciego.

El ácido ursólico interviene en los mecanismos metabólicos relacionados con la obesidad, el gasto energético y el aumento de masa muscular. Además, se ha demostrado que el ácido ursólico es un potente antioxidante y puede mejorar el rendimiento muscular durante el ejercicio. Sin embargo, estos resultados han sido evaluados en modelos animales, por lo tanto, son necesarios estudios clínicos en humanos que puedan evaluar el efecto del ácido ursólico con relación con la mejora de la forma física y la composición corporal.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este trabajo han sido:

- Evaluar el efecto de la ingesta de ácido ursólico durante 12 semanas sobre la composición corporal
- Evaluar el efecto de la ingesta de ácido ursólico durante 12 semanas sobre la masa magra y masa grasa corporal
- Evaluar el efecto de la ingesta de ácido ursólico durante 12 semanas sobre la fuerza muscular
- Evaluar el efecto de la ingesta de ácido ursólico durante 12 semanas sobre la mejora de la forma física secundarias a la hipertrofia muscular, mediante la determinación de la capacidad de resistencia y la mejora del esfuerzo.

Material y Métodos

Fiambre suplementado con ácido ursólico

El ácido ursólico utilizado en el estudio se administró vehiculizado en un fiambre de pechuga de pollo braseada. Este producto se caracterizaba por su bajo porcentaje de grasa (< 1,5 %) y bajo contenido en sodio (<0,6 %). Los ingredientes del fiambre de pechuga de pollo fueron: pechuga de pollo (65%), agua, estabilizadores (E-420, E-451, E-407, E-508, E-412), almidón, dextrosa, aromas, sal, especias, conservante (E-250); para el recubrimiento decorativo se utilizó colorante caramelo (E-150d). Las características nutricionales del producto cárnico se incluyen en la Tabla 12.

Tabla 12. Información nutricional: pechuga de pollo braseada reducida en sal

Valor energético (kcal)	88
Proteínas(gr)	15
Carbohidratos (g)	3.7
Grasas (gr)	1.5
Sodio (gr)	0.5
Valores medios por 100 g	

Al producto experimental se le añadieron 180 mg de un extracto de manzana que contenía entre el 18-22% de ácido ursólico y que aportaba entre 32.4-39.6 mg/d de ácido ursólico. El extracto de manzana no afectó a las características fisicoquímicas y organolépticas del producto final. El producto control era el mismo sin el extracto de manzana.

Diseño de estudio y participantes

El presente estudio fue un estudio de intervención y aleatorizado, paralelo y doble ciego, con dos grupos de intervención. Se seleccionaron 30 sujetos (20 mujeres y 10 hombres) de entre 18 y 65 años de la Universidad de Granada, España. Los participantes fueron divididos aleatoriamente en dos grupos (n=15) que tomaron diariamente 100 g de un fiambre de pechuga de pollo (dos rebanadas a media mañana y dos rebanadas a media tarde) durante 12 semanas. Los participantes del grupo experimental tomaron 100 g del producto cárnico que aportaba aproximadamente 32.4-39.6 mg/día de ácido ursólico. Paralelamente, los participantes del grupo control recibieron la misma cantidad del producto cárnico sin el ácido ursólico (Figura 10). A todos los participantes se les pidió que realizaran caminata libre (dos veces por semana), durante el tiempo de intervención.

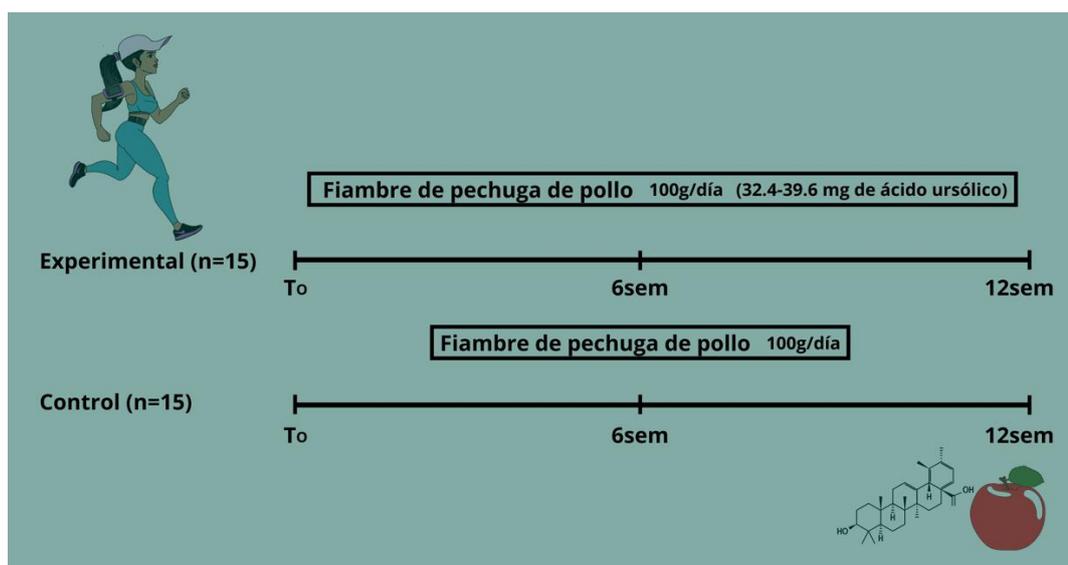


Figura 10. Diseño experimental utilizado en el estudio. T₀: tiempo inicial—Al inicio del estudio, a la semana 6 y a las 12 semanas se evaluó la composición corporal, la mejora de la condición física y la fuerza muscular.

Todos los participantes aceptaron ser incluidos en el estudio y firmaron el protocolo de consentimiento aprobado. Se mantuvo y respetó la confidencialidad de los datos recogidos y de los datos personales utilizados en este estudio. El Comité de Ética de la Investigación aprobó el estudio que siguió la normativa de la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica y la Ley Orgánica 15/1999, RD 1720/2007 de protección de datos de carácter personal, así como las normas internacionales para la investigación con muestras de seres humanos.

Determinación antropométrica y de la composición corporal

Medidas Antropométricas

El peso corporal se determinó utilizando una Tanita BC-558 (Illinois, USA) y la masa grasa se midieron al inicio, a las 6 semanas y al final del periodo de intervención, de acuerdo con las directrices de la EFSA utilizando técnicas de imagen y de medición del peso corporal. La medición antropométrica directa del perímetro muscular: bíceps, antebrazo, cuádriceps y pantorrilla, se realizó utilizando una cinta estandarizada, flexible y no extensible (Cescorf, 7 mm).

Absorciometría de rayos X de doble energía (Dexa)

Para determinar la composición corporal, se realizó una absorciometría de rayos X de doble energía (DEXA) al inicio, a las 6 semanas y al final del periodo de intervención para evaluar la cantidad y

distribución de la masa grasa y la masa magra. La prueba se realizó con un osteodensitómetro (Hologic QDR 4500).

Determinación de la fuerza muscular

La evaluación de la fuerza muscular se realizó al inicio del estudio y tras las 12 semanas de intervención. Para esta evaluación se realizaron pruebas biomecánicas estandarizadas y validadas de peso máximo levantado (Kraemer, 1995). Se realizaron las siguientes pruebas:

1. *Prueba de torsión de rodilla.* Para esta evaluación se realizó una prueba de evaluación de los flexores y extensores de la rodilla utilizando un dinamómetro biocinético (Biodex System 4 Pro). El participante se colocaba en posición sentada con la rodilla doblada a 90°. La prueba isocinética consiste en cuatro movimientos de extensión y flexión de la rodilla con una amplitud de movimiento de 90° a 180°. Esta prueba es uno de los métodos más objetivos de cuantificación de la fuerza muscular humana de las piernas en condiciones dinámicas.
2. *Prueba de esfuerzo isométrico del brazo dominante.* Para esta evaluación se realizó una prueba de esfuerzo isométrico, o agarre isométrico, de la mano utilizando un dinamómetro de mano Smedley de línea base (200 lb/90 kg). El participante realizó un agarre progresivo lo más fuerte posible sin doblar el brazo, mientras que mantenía la contracción durante 2 a 5 segundos; se repitió 3 veces. El objetivo de esta prueba es evaluar la fuerza de los músculos de los dedos y del antebrazo.

Determinación de la forma física

La evaluación de la fuerza muscular se realizó al inicio del estudio y tras las semanas 12 de intervención. Se realizaron las siguientes pruebas:

1. *Prueba de esfuerzo.* Para la prueba de esfuerzo se evaluó la sensación de fatiga muscular tras el máximo número de sentadillas que podían realizar. El participante debía indicar la sensación de fatiga según la escala de Borg, o escala de esfuerzo percibido, que es una herramienta para medir subjetivamente el esfuerzo en una actividad determinada (Borg, 1982) y cuantifica el esfuerzo percibido en 10 niveles (Figura 14).

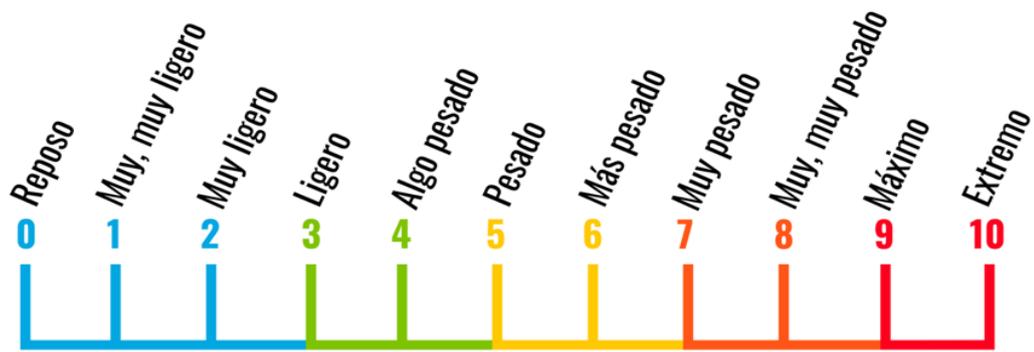


Figura 11. Escala de esfuerzo percibido de Borg

2. *Cuestionario de actividad física.* Se utilizó el Cuestionario Internacional de Actividad Física (IPAQ) (OMS, 2012). El cuestionario contiene 7 preguntas sobre la actividad física desarrollada en una semana habitual y diferencia claramente los ámbitos en que se realizan los distintos tipos de actividad: trabajo, desplazamientos y tiempo libre (ANEXO).
3. *Caminata.* Para evaluar el rendimiento físico, se les pidió a los participantes que durante las caminatas libres realizadas al inicio y al final de periodo de intervención, se midieran la frecuencia cardiaca (lpm), y que registraran la distancia recorrida (m), así como la sensación de fatiga tomando como referencia la escala de Borg (Figura 11).

Análisis estadístico

Los datos se presentan como valores medios \pm error estándar de la media (SEM). Previamente se analizó la normalidad de las variables mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre grupos se determinaron mediante el test de análisis de la varianza (ANOVA) utilizando las pruebas a posteriori (*post-hoc*) para la comparación entre grupos: DMS para los parámetros con varianzas homogéneas y T2 de Tamhane para los parámetros con varianzas no homogéneas. Todos los análisis se realizaron por intención de tratar. Un valor $p < 0,05$ se consideró significativo. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa Statistical Package for the Social Sciences versión 21 (SPSS Inc.; Chicago, IL, EE.UU.)

Resultados

Composición corporal

Las características de los participantes al inicio del estudio se muestran en la Tabla 13. No hubo diferencias significativas en el peso, la estatura y el índice de masa corporal entre los grupos.

Tabla 13. Composición corporal inicial de los participantes en el estudio, distribuidos en los grupos experimentales

	INICIO		SEMANA 6		SEMANA 12	
	Grupo control	Grupo Experimental	Grupo Control	Grupo Experimental	Grupo Control	Grupo Experimental
Peso (kg)	75.7±2.8	74.5±2.5	75.1±2.9	73.5±3.0	75.7±3.0	74.7±3.2
IMC (kg/m ²)	27.8±0.4	27.5±0.5	27.8±0.4	27.3±0.6	27.7±0.4	27.8±0.8
CMA (cm)	25±1	26±1	25±1	26±1	24±1	26±1
CMC (cm)	56±1	54±1	54±0	53±1	54±1	51±2
CMP (cm)	38±1	38±1	38±1	38±1	38±1	36±0
VMMT (kg)	44±3	46±2	44±2	46±2	45±2	45±3
VMGT (kg)	31±2	28±1	30±2	27±1	30±2	28±2
VMMA (kg)	21±1	23±1	22±1	23±1	22±1	22±1
VMGA (kg)	15±1	14±1	15±1	13±1	14±0	14±1
VMMEI (kg)	11±1	11±1	7±1	7±0	7±0	7±1
VMGEI (kg)	8±1	7±1	6±1	5±0	6±1	5±0
VMMES (kg)	3±0	4±0	2±0	3±0	2±0	2±0
VMGES (kg)	3±0	2±0	2±0	2±0	2±0	2±0

Los datos se expresan como medias y SEM. No hay diferencias significativas en los dos grupos. Circunferencia del músculo del antebrazo (CMA); circunferencia muscular del cuádriceps (CMC); circunferencia del músculo de la pantorrilla (CMP); valores de masa grasa abdominal (VMGA); valores de la masa grasa de las extremidades inferiores (VMGEI); valores de masa grasa total (VMGT); valores de masa magra abdominal (VMMA); valores de masa magra de las extremidades inferiores (VMMEI); valores de masa grasa de las extremidades superiores (VMMES); valores de masa magra de las extremidades superiores (VMMES); Valores de masa magra total (VMMT).

Los cambios en los parámetros de fuerza muscular desde el inicio hasta después de 12 semanas se presentan en la Tabla 14. No hubo diferencias significativas en las diferentes pruebas de esfuerzo realizadas en ninguno de los grupos experimentales.

Tabla 14. Evolución de la fuerza muscular de los participantes durante el período de intervención

	VISITA INICIAL		VISITA SEMANA 6		VISITA SEMANA 12	
	Grupo control	Grupo Experimental	Grupo control	Grupo Experimental	Grupo Control	Grupo Experimental
Prueba de esfuerzo (n° de repeticiones)	38±6	36±5	51±10	48±6	61±10	51±8
Prueba de esfuerzo (escala de Borg)	7±1	7±0	7±1	8±0	7±1	7±1
Prueba marcha y FC inicial (lpm)	75±3	74±3	71±3	75±3	71±3	73±3
Prueba marcha y FC final (lpm)	125±7	112±7	121±5	107±6	129±6	106±5
Distancia caminata (m)	6058±1172	3986±498	5680±1052	3939±120	5788±1079	3989±151
Fatiga prueba de caminata (escala de Borg)	4±0	3±0	4±0	3±0	4±1	2±0
Fuerza isométrica de la mano derecha	43±19	43±17	43±19	43±17	46±20	45±17
Fuerza isométrica de la mano izquierda	35±13	32±12	35±13	32±12	34±12	34±12
Prueba de torsión de la rodilla Mflexc30	57±4	48±5	ND	ND	49±4	50±4

Los datos se expresan como medias y SM. No hay diferencias significativas en los dos grupos. FC: Frecuencia cardiaca; ND: No determinado

Discusión

En este estudio hemos analizado el efecto de la suplementación con ácido ursólico sobre la composición corporal y la mejora de la forma física secundaria a la hipertrofia muscular en individuos sanos. Nuestros resultados muestran que la suplementación con alrededor de 35 mg/d de ácido ursólico durante 12 semanas no modifica el peso y la composición corporal, ni tampoco afecta a la forma física ni fuerza muscular en voluntarios sanos.

Diversos estudios en modelos animales sugieren la capacidad del ácido ursólico para promover la pérdida de peso en modelos murinos, y el papel importante que ejerce sobre las vías de diferenciación de los adipocitos, la síntesis proteica en células de músculo, la sensibilidad a la insulina y el efecto sobre los valores de glucemia en sangre (Bakthiari *et al.*, 2015; Chu *et al.*, 2015; Katashima *et al.*, 2017). Yang-Xiang *et al.* (2013) demostraron que la suplementación con 10 mg/kg de ácido ursólico durante 20 semanas disminuye el peso corporal y las concentraciones de glucosa insulina y leptina en sangre en un modelo de ratón obeso inducido por una dieta alta en grasa (HFD) en relación con el grupo no suplementado. Por otro lado, Kunkel *et al.* (2011) señalaron que existía una disminución en la adiposidad, así como un aumento de

la actividad Akt en el músculo esquelético en ratones alimentados con una dieta estándar suplementada con 0.27% de ácido ursólico durante 5 semanas, aumentando el tamaño de las fibras musculares de contracción rápida y de las fibras oxidativas de contracción lenta, y mejorando la capacidad física de los roedores sometidos a ejercicio en cinta rodante (2 m durante 2 min). Posteriormente, los mismos investigadores reprodujeron el experimento suplementando la dieta de los ratones con 0.14% de ácido ursólico durante 17 semanas. Los resultados demostraron la mejora de la capacidad física y de la frecuencia cardíaca en reposo, y la disminución del peso corporal, de la grasa epididimaria, de la grasa retroperitoneal y de la esteatosis hepática (Kunkel *et al.*, 2012).

Con respecto a la masa muscular, la evidencia científica en modelos animales sugiere el beneficio del ácido ursólico en el desarrollo muscular, activando la síntesis de proteínas e inhibiendo la atrofia, y en el envejecimiento y la pérdida de músculo esquelético mediada por la denervación (Xu *et al.*, 2015). Estos efectos han sido relacionados con la estimulación de la señalización mediada por mTORC1 que activa la síntesis de proteínas (Jeong *et al.*, 2015; Ogasawara *et al.*, 2013). Del mismo modo, se ha puesto de manifiesto que el ácido ursólico atenúa la atrofia muscular en condiciones de ayuno, y puede aumentar la hipertrofia muscular en un modelo de ratones macho tratados intraperitonealmente con 25 mg/ml de ácido ursólico, manteniendo la masa muscular y aumentando el diámetro de las fibras musculares a través de la secreción de IGF-1 (Kunkel *et al.*, 2011).

En relación con la mejora de la forma física los experimentos en animales obesos sugieren que el ácido ursólico puede mejorar el rendimiento físico al aumentar la mioglobina y la presencia de fibras de tipo IIA más resistentes a la fatiga (Bakthiari *et al.*, 2015). Jeong *et al.* (2015) describieron que el tratamiento con distintas dosis de ácido ursólico (75, 150 y 300 mg/kg) durante 12 semanas aumentaba el rendimiento en ratones de un manera dosis dependiente, aumentando la tolerancia al ejercicio, tanto en tiempo como en distancia recorrida, y reduciendo la fatiga en pruebas de resistencia (15-20 metros/min hasta el agotamiento) (Jeong *et al.*, 2015).

Sin embargo, a pesar de que está demostrado que el ácido ursólico juega un papel importante en la capacidad muscular en modelos murinos, los resultados en estudios clínicos humanos, incluidos los nuestros, no son tan concluyentes. Al igual que nuestros resultados, Lobo *et al.* (2021) no encontraron ningún efecto sinérgico de la suplementación con 400 mg/d ácido ursólico durante 8 semanas sobre la fuerza y la masa muscular en respuesta al entrenamiento de resistencia en hombres físicamente activos que consumían una dieta alta en proteínas (Lobo *et al.*, 2020). Por otra parte, Cione *et al.*, (2021) evaluaron si la suplementación con ácido ursólico acompañada de un programa de ejercicios podría tener efectos terapéuticos en el síndrome metabólico en mujeres posmenopáusicas, y señalan que dicha suplementación no promovió una mejora adicional del perfil de síndrome metabólico después de 8 semanas de intervención lo que concuerda con nuestros resultados.

Es importante señalar, que una mayor frecuencia de entrenamiento para alcanzar los 150 min/ semana recomendados por la OMS (Bull *et al.*, 2020) podría mejorar aún más la respuesta al ejercicio, pero no el

efecto de supletoriedad del ácido ursólico. Nuestros resultados difieren de las observadas por Ramírez-Rodríguez *et al.* (2017) quienes describieron que la suplementación con 150 mg/día de ácido ursólico durante 12 semanas produjo un cambio sustancial en el peso corporal y el IMC. No obstante, a diferencia de nuestro estudio, todos los participantes recibieron recomendaciones nutricionales, más allá de la intervención con ácido ursólico, y se les indicó que no cambiarán su rutina de ejercicios habitual, no se llevó a cabo un control de la ingesta ni del ejercicio realizado. Además, tanto la dosis como la vía de administración puede influir en los resultados ya que la farmacocinética del ácido ursólico en humanos tras la ingestión oral no se conoce del todo y se ha descrito que el ácido ursólico tiene una baja solubilidad en agua y, por lo tanto, una baja absorción en el tracto gastrointestinal lo que conduce a una reducida biodisponibilidad (Chen *et al.*, 2011). En modelos murinos, el ácido ursólico se metaboliza en el hígado y se excreta rápidamente, es posible que su biodisponibilidad sea mayor que en humanos, y pueda ejercer mayor efecto (O'Neill *et al.*, 2016).

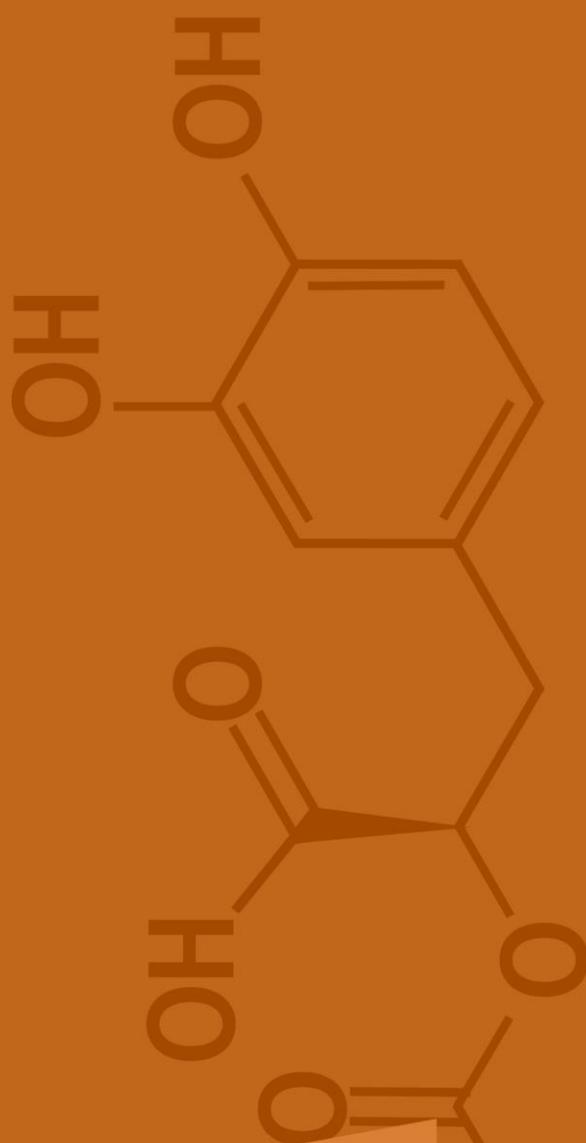
Por otro lado, nuestros resultados no mostraron ningún efecto de la ingesta de aproximadamente 35 mg/día durante 12 semanas sobre el metabolismo muscular y la fuerza de agarre de las manos, lo que indicaba que la aptitud física era similar al inicio del estudio. Algunos estudios epidemiológicos señalan que la fuerza isométrica de la mano es un indicador útil del estado de salud general y riesgo de mortalidad cardiovascular (Soysal *et al.*, 2021). Cho *et al.* (2016) describieron un mayor aumento de la fuerza isométrica de la mano en participantes que recibieron 50.94 mg/día de extracto de ácido ursólico proveniente de hoja de nispero durante 12 semanas. Además, hasta lo que nosotros conocemos, no hay ningún estudio que haya evaluado los efectos de diferentes matrices alimentarias sobre la biodisponibilidad del ácido ursólico, y si éstas pueden tener alguna influencia que modifique sus efectos. Si bien los programas de ejercicio combinados a corto plazo han demostrado tener un efecto beneficioso en la salud, las mejoras pueden atribuirse principalmente al efecto del ejercicio y no a la suplementación con ácido ursólico (Asghari *et al.*, 2020). Por lo tanto, se necesitan más estudios para establecer una dosis adecuada para conseguir efectos sobre el metabolismo muscular, y para establecer los posibles efectos del ácido ursólico en humanos.

Las principales fortalezas del presente estudio es el diseño del mismo, ya que es un ensayo aleatorio, doble ciego, controlado con placebo. Asimismo, la técnica utilizada para evaluar la composición corporal (DEXA) se considera la técnica de mayor precisión ya que proporciona una mejor visión de los cambios en la grasa corporal y la masa grasa visceral. Sin embargo, la presente investigación tiene algunas limitaciones. El número de voluntarios incluidos fue bajo, y no nos permite llevar a cabo un análisis estratificado por sexo, que podría tener una influencia sobre nuestros resultados. Por otro lado, aunque se indicó la realización de ejercicio dos veces a la semana, no se pudo llevar a cabo un buen control de dicho ejercicio, y los pocos datos de los que se disponen no muestran una gran adherencia. Además, aunque a los voluntarios no se les indicó que modificaran su dieta de ninguna manera, durante el estudio no se llevó a cabo ninguna evaluación nutricional por lo que no pudimos confirmar si los patrones dietéticos pudieran

haber tenido algún efecto sobre los resultados. Por último, nuestro estudio se llevó a cabo en individuos con sobrepeso, menores de 65 años, y con un buen estado físico. En futuras investigaciones, el efecto biológico de la intervención del ácido ursólico, solo o combinado con el ejercicio, debería tener en cuenta, no solo a individuos sanos, sino también a grupos de población con diferentes estados de enfermedad en los que la fuerza física pueda estar comprometida.

Conclusión

En conclusión, nuestros resultados muestran que la suplementación durante 12 semanas, con 35 mg/d de ácido ursólico procedente de un extracto de piel de manzana y vehiculizado en un fiambre de pechuga de pollo, acompañada de actividad física dos veces a la semana, no ejerce ningún efecto sobre el peso y la composición corporal, ni en la fuerza y resistencia muscular, en humanos sanos.



CHÍA

(SALVIA HISPÁNICA)

Sección IV. Evaluación de la composición fitoquímica y nutricional de la semilla de chía oscura (*Salvia Hispánica L.*)

Las semillas de chía son una fuente de diferentes macro y micronutrientes asociados con beneficios para la salud; por lo que podría considerarse un alimento funcional. En la actualidad, diversos estudios han demostrado una elevada actividad biológica y tecnológica de las semillas de chía, lo que abre un gran abanico de posibilidades para este prometedor componente alimentario (Teoh *et al.*, 2018). Sin embargo, su composición depende de la variedad, el origen, el clima y el suelo, y su composición debe ser caracterizada exhaustivamente con el objetivo de proponer potenciales beneficios para la salud asociados a la presencia de una serie de compuestos nutricionales y bioactivos.

Objetivos específicos

- Describir de forma completa y exhaustiva la composición completa de unas semillas de chía procedentes de un cultivo específico de una variedad de chía oscura de Jalisco (México), describiendo los efectos nutricionales y sobre la salud de sus compuestos y sus potenciales usos terapéuticos
- Describir el análisis proximal de las semillas de chía que incluye: la determinación de la humedad total, proteínas totales, grasa total, carbohidratos, cenizas, energía total y humedad.
- Análisis del perfil de ácidos grasos de la semilla de chía por cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MM)
- Determinación de compuestos fenólicos por HPLC-ESI-QTOF-MS

Material y Métodos

Las semillas de chía fueron proporcionadas por productores mexicanos de Acatic, Jalisco, México. Las semillas de chía fueron cosechadas en el año 2015, se enviaron tres kilos de semillas de la variedad oscura al Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos donde se procesaron los análisis por triplicado. Las semillas se conservaron en un recipiente sellado con una humedad relativa inferior al 40%, y se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

Análisis proximal

El análisis proximal de las semillas de chía incluye la determinación de la humedad total, proteínas totales, grasa total, carbohidratos, cenizas, energía total y humedad.

Para la determinación de la **humedad total** se molieron 3 g de chía fresca en un molino enfriado por homogeneización Foss Knifetec™. Se realizó mediante un método gravimétrico en una estufa de secado a 102°C. Tras el secado, la muestra se incineró en un horno de mufla a 550°C hasta que se consiguieron cenizas blancas. A continuación, las muestras se cuantificaron por gravimetría.

Las proteínas totales se determinaron por el método de Kjeldhal tras la digestión con ácido sulfúrico (Horwitz et al, 1997). Se utilizó el factor de conversión 6.25, la muestra se descompuso en ácido sulfúrico caliente, en presencia de un agente reductor catalizador (mercurio), asimismo se le añadió una sal neutra para aumentar el punto de ebullición de la disolución de ácido sulfúrico.

La cantidad de grasa total se determinó siguiendo el método Soxhlet. Para esto, se hidrolizaron 2 g de muestra con ácido clorhídrico 4 M y se extrajeron con éter de petróleo. Se pesaron 2 g de la muestra seca y se colocaron en la unidad de extracción, posteriormente se conectó el extractor al matraz con éter de petróleo a 2/3 del volumen total. Se secaron a 40-60°C y la grasa total se determinó por gravimetría después de la extracción (AOAC 1997).

El contenido de hidratos de carbono se estimó como extracto libre de nitrógeno (NFE) por diferencia de la suma del contenido de proteínas, grasas, cenizas y fibra bruta (Blanco-Metzler *et al.*, 2004).

La determinación de la fibra dietética total se realizó por el método gravimétrico enzimático (AOAC, 1997). Este método permite determinar el contenido de fibra en la muestra, después de ser digerida con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio y calcinado el residuo, la diferencia de pesos después de la calcinación nos indica la cantidad de fibra presente.

Análisis del perfil de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MM), tras una extracción y transesterificación directa a partir de 100 mg de muestra molida, basándose en una modificación del método de Lepage y Roy (1988). Los ácidos grasos se identificaron comparándolos con un estándar externo compuesto por 37 ácidos grasos (37 Component FAME Mix Ref. 47885-U. Sigma-Aldrich). La cuantificación de cada ácido graso se realizó por extrapolación en curvas de calibración, y los datos se expresaron como porcentajes de la cantidad total.

La cromatografía de gases-espectometría de masas (GC-MS) se realizó en un Agilent A7890 (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU.). La temperatura inicial fue de 140°C que se mantuvo durante 2 min, seguida de un incremento de temperatura 4° C/minuto, hasta alcanzar una temperatura máxima de 310°C, que se mantuvieron durante 6 min. La temperatura del inyector (250°C), y la temperatura de la

interfaz y la fuente fue de 240°C. Se utilizó una columna capilar SP 25-60 (100 0.25 0.25) de 100 m de longitud, 0.25 de diámetro interno y 0.25 micras de espesor de película.

Las condiciones del espectrómetro de masas (Water micromas, Quattro micro-GC, Manchester, Reino Unido) fueron:

- Barrido completo 45-500 Dalton.
- Ionización por impacto de electrones.
- El+ a 70 e V.

Los índices de calidad de los lípidos se calcularon según las fórmulas propuestas por Ulbricht y Southgate (1991) y Johnson y Bradford, (2014):

El *índice aterogénico* (IA) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$AI = \frac{[12 : 0 + 4 (14 : 0 + 16 : 0)]}{[(n6 + n3)PUFA + 18 : 1 + \sum MUFA]}$$

El *índice de trombogenicidad* (IT) se calculó con la siguiente fórmula:

$$IT = \frac{(14 : 0 + 16 : 0 + 18 : 0)}{[(0.5 \times 18 : 1) + 0.5(\sum MUFA) + 0.5 (n6PUFA) + (\frac{n3PUFA}{n})]}$$

Determinación de los compuestos fenólicos por HPLC-ESI-QTOF-MS

Para la preparación de la muestra las semillas de chía se molieron en un molino ultracentrífugo ZM 200 (Retsch, Haan, Alemania) a 10.000 rpm, y se pasaron por un tamiz de anillo de 0.1 mm. Los compuestos fenólicos de las semillas de chía se extrajeron según el método descrito por Martínez-Cruz et al. (2014) con ligeras modificaciones. En resumen, 0.5 g de semillas molidas se extrajeron por triplicado con 10 mL de metanol acuoso al 70% en un baño de ultrasonidos Branson 3510 (Branson Ultrasonic Corp., St. Louis, MO, USA), operando a 25° C y 40 kHz durante 15 min. A continuación, la mezcla se centrifugó a 7.500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga Sorvall ST 16R (Thermo Fisher Scientific, Leicestershire, Reino Unido). El sobrenadante se evaporó en un evaporador rotatorio (BUCHI Ibérica S.L.U., Barcelona, España) a 40°C, reconstituyendo el precipitado con metanol al 70% hasta una concentración de 5 mg/mL, que se filtró a través de un filtro de jeringa de celulosa de 0.22 µm antes de la inyección en el cromatógrafo. Para realizar los análisis cuantitativos, se añadió como estándar interno ácido gálico a una concentración de 10 µg/mL a cada extracto.

Siempre que los estándares estuvieran disponibles se cuantificaron los principales compuestos encontrados en el extracto. Además, algunos compuestos adicionales pudieron ser cuantificados tentativamente en base a otros compuestos con estructuras similares.

Los análisis por HPLC se llevaron a cabo en un instrumento de HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) equipado con una bomba binaria, un desgasificador en línea, un automuestreador, un compartimento de columna con control termostático, y un detector de matriz de diodos. Las muestras extraídas se separaron previamente en una columna Agilent ZorBax Eclipse Plus C18 (1.8 μ m, 4.6 150 mm). Las fases móviles consistieron en una mezcla de ácido fórmico al 0.1% en agua (A) y metanol (B) utilizando una elución en gradiente según el siguiente perfil: 0 min, 5% B; 15 min, 30% B; 20 min, 95% B; 25 min, 5% B. Las condiciones iniciales se mantuvieron durante 5 min. El flujo fue de 0.5 mL/min, la temperatura de la columna, 25°C, y el volumen de inyección, 5 μ L.

La detección se llevó a cabo con un espectrómetro de masas Q-TOF Agilent 6540 Ultra-High-Definition (UHD) Accurate Mass dentro de un rango de masas de 50-1700 m/z, operando en modo de iones negativos y equipado con una interfaz Jet Stream dual ESI; este modo de ionización es el más apropiado en términos de ionización de compuestos. Los parámetros de funcionamiento fueron los siguientes: caudal de gas de secado, 10 L/min; temperatura del gas de secado, 325° C; nebulizador, 20 psi; capilar, 4000 V; fragmentador, 130 V. Los análisis MS/MS se adquirieron mediante fragmentación automática en la que se fragmentaron los dos picos de masa más intensos. Los valores de energía de colisión para los experimentos MS/MS se ajustaron a 10, 20 y 40 eV. Se utilizó nitrógeno como gas de secado, nebulización y colisión. Se utilizó la infusión continua de los iones de referencia m/z 112 985 587 (anión trifluoroacetato) y 1033 988 109 (aducto de hexanos (1H,1H, 3H-tetrafluoropropoxi) fosfazina o HP921 para corregir cada espectro de masas.

El análisis de los datos se realizó con el software de la estación de trabajo Masshunter versión B.06.00 (Agilent Technologies, EE.UU.). Se obtuvieron gráficos de calibración de siete puntos por triplicado con un conjunto de soluciones de sacarosa, ácido cítrico, tirosina, fenilalanina, ácido protocatéquico, ácido gentísico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido rosmarínico y luteolina, utilizando ácido gálico a una concentración de 10 μ g/mL como patrón interno.

La tabla 15 muestra los datos de calibración, incluyendo los límites de detección (LOD) y los límites de cuantificación específicos (LOQs) para los compuestos individuales en las soluciones estándar, que se calcularon como $S/N = 3$ y $S/N = 10$, respectivamente, donde S/N es la relación señal/ruido. Las concentraciones de los compuestos se determinaron utilizando el área corregida de cada compuesto individual (tres réplicas) y por interpolación en la curva de calibración correspondiente.

Tabla 15. Datos de calibración utilizados para la cuantificación de compuestos específicos.

Analito	Ecuación de calibración	RDC (µg/mL)	R²	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Sacarosa	$y = 0.1602x + 1.0751$	10-50	0.975	0.05±0.01	0.18 ± 0.05
Ácido cítrico	$y = 0.012x + 0.194$	10-50	0.970	0.9±0.3	3.0 ± 0.9
Tirosina	$y = 0.1248x + 0.0364$	1-10	0.991	0.071±0.005	0.24 ± 0.02
Fenilalanina	$y = 0.0634x + 0.0062$	1-10	0.989	0.10±0.01	0.32 ± 0.05
Ácido protocatéquico	$y = 0.0264x - 0.0201$	1-10	0.970	0.31±0.06	1.0 ± 0.2
Ácido gálico	$y = 0.0390x - 0.0050$	1-10	0.984	0.19±0.03	0.6 ± 0.1
Ácido vanílico	$y = 0.0293x + 0.0081$	1—10	0.988	0.18±0.03	0.59 ± 0.08
Ácido cafeico	$y = 0.2119x - 0.0094$	0.25—5	0.986	0.027±0.004	0.09 ± 0.01
Ácido ferúlico	$y = 0.1207x + 0.0135$	0.5—5	0.976	0.041±0.004	0.14 ± 0.01
Ácido rosmarínico	$y = 0.1067x + 0.0398$	0.5—20	0.983	0.028±0.005	0.09 ± 0.02
Luteolina	$y = 2.0691x + 0.0586$	0.05—1	0.993	0.0019±0.0004	0.006 ± 0.001

LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación. RDC: rango de calibración

Resultados

Caracterización de las semillas de chía

La composición proximal de las semillas de chía muestra una alta cantidad de proteína (18.8%) y fibra (35.15). La cantidad mayoritaria de grasa es grasa insaturada (17.1%). Asimismo, la cantidad de azúcar es < 0.1 % y presenta un valor energético de 388.3 kcal. Los datos se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Composición proximal de las semillas de chía.

Componente	Composición
Carbohidratos	21.8 %
Azúcares	< 0.1 %
Fibra	35.1 %
Grasa	18.3 %
Grasa saturada	1.2 %
Grasa Insaturada	17.1%
Proteína	18.8 %
Cenizas	4.7 %
Humedad	5.8 %
Energía(kcal)	388.3
Energía (kJ)	1612

LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación

El perfil de ácidos grasos encontrados en la semilla de chía de la variedad oscura, destacan por su alto contenido en ácido α -Linolénico, Linoleico, Oleico, Esteárico y Palmítico. Los datos se presentan en la tabla 17

Tabla 17. Perfil de ácidos grasos de las semillas de chía.

Ácidos grasos	Composición (%)
Mirístico C14:0	0.41
Palmítico C16:0	7.49
Palmitoleico C16:1 cis-9	0.5
Esteárico C18:0	4.0
Oleico C18:1 cis-9	8.34
Linoleico C18:2 cis-9,12 (ω -6)	19.5
α -Linolénico C18:3 cis-6,9,15 (ω -3)	59.2
γ -Linolénico C18:3 cis-6,9,12 (ω /n-6)	0.52
ω 6: ω 3	3.02
Índice de Trombogenicidad	0.045
Índice de Aterogenicidad	0.007

La Figura 15 muestra el cromatograma del pico base en modo de iones negativos del extracto de semillas de chía oscura. Los principales compuestos se han numerado según sus tiempos de retención. Estos compuestos se identificaron tentativamente siempre que fue posible mediante la interpretación de sus espectros MS y MS/MS obtenidos por QTOF-MS combinados con los datos proporcionados por las bases de datos (SciFinder, PubChem y Mass bank) y la literatura (Tabla 18).

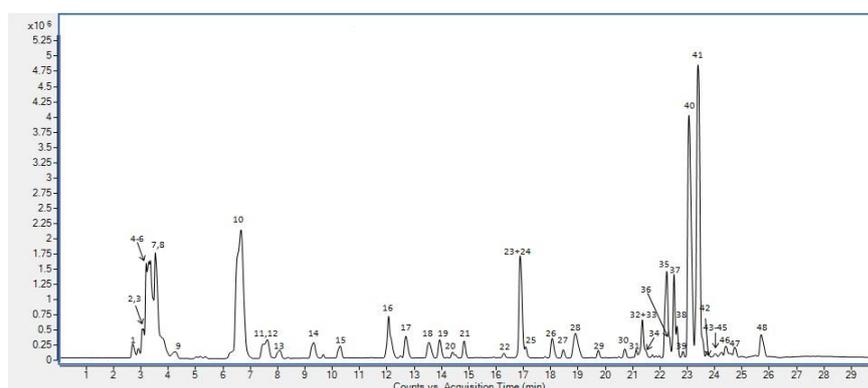


Figura 15. Cromatograma del pico base del extracto de semillas de chía. Los picos se identifican con números según su orden de elución.

La Tabla 18 resume los datos de MS de los compuestos identificados encontrados en el extracto de semillas de chía, incluyendo la fórmula molecular propuesta y las especies detectadas, el m/z experimental, el error de m/z y la puntuación de la fórmula molecular seleccionada. También se incluyen los principales fragmentos obtenidos por MS/MS, así como el nombre del compuesto propuesto para cada pico y las referencias utilizadas para su identificación. Los compuestos identificados fueron 5 aminoácidos (L-Aspargina, Ácido L-aspartico, L-tirosina, L-fenilalanina y L-triptófano), 4 azúcares (Estaquirosa, Isómero de rafinosa 1, isómero de rafinosa 2 y sacarosa), 2 fenoles (dihidroxibenzaldehído isómero 1 e Isómero de dihidroxibenzaldehído 2) 16 ácidos fenólicos (ácido dihidroxifenilacético, glucósido de dihidroxibenzoilo, ácido salviónico A, glucósido de ácido vanílico, ácido caftárico, áido dihidroxibenzoico, apisosil glucósido, sibiricosa A3, gentibiosa de cafeína, ácido férrico, ácido dihidroxibenzoico, ácido salvianólico B/E, gñucósido de ácido rosmarínico, metil rosmarinato y ácido salvianólico F), 2 iridoides (glucósido de ácido tuberónico y salviandulina), 3 nucleósido de pirimidina 8uridina, adenosina y guanosina), 2 ácidos orgánicos (ácido málico y ácido cítrico), 1 flavonoide (jaceosidina) y otros ocmpuestos como Metiltanshinonato.

Tabla 18. Compuestos detectados en el extracto de semillas de chía. (Figura 1) clasificados según la naturaleza química del compuesto.

Pico	RT (min)	Fórmula	Especies	m/z	Error (ppm)	P	MS/MS Picos del espectro (intensidad relativa)	Compuesto propuesto	NQ	Referencia
1	2.701	-	-	272.9574	-	-	158.9765 (100), 114.9868 (16.55)	Desconocido	-	
2	3.019	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	(M-H) ⁻	131.0463	-0.52	99.95	-	L-Asparagina	Aminoácido	Ziemichód, et al., 2019
3	3.091	C ₄ H ₇ NO ₄	(M-H) ⁻	132.0298	2.98	98.97	115.0025 (100)	Ácido L-aspartico	Aminoácido	Olivos-Lugo et al, 2010; Pastell et al., 2019
4	3.186	C ₂₄ H ₄₂ O ₂	(M-H) (M+Cl) (M+COO H) ⁻	665.2153 701.1920 711.2192	-0.67	98.99	179.0543 (100), 665.2119 (41.13), 101.0231 (35.57), 119.0332 (25.79), 221.0643 (22.52), 161.0427 (21.21)	Estaquirosa	Azúcar	De Falco et al, 2017
5	3.281	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	(M-H) (M+Cl) (M+COO H) ⁻	503.1642 539.1411 549.1699	-4.51	89.54	503.1593 (100), 539.1364 (50.51), 179.0544 (14.76), 119.0335 (4.15)	Isomero de rafinosa 1	Azúcar	Pastell et al., 2019; De Falco et al., 2018
6	3.351	C ₂₅ H ₃₈ O ₂₂	(M-H) ⁻	689.1802	-2.5	91.35	185.0206 (100)	Desconocido	-	-
7	3.511	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	(M-H) ⁻ (M+COO H) ⁻	341.1086 387.1140	1.29	98.13	-	Sacarosa *	Azúcar	Pastell et al., 2019; De Falco et al., 2018)
8	3.565	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	(M-H) ⁻ (M+Cl) ⁻ (M+COO H) ⁻	503.1628 539.1383 549.1685	-0.18	99.46	209.0672 (100), 503.1656 (85.25), 179.0566 (19.31)	Isomero de rafinosa 2	Azúcar	Pastell et al., 2019, De Falco et al., 2017
9	4.22	C ₄ H ₆ O ₅	(M-H) ⁻	133.0145	-1.98	99.52	115.0026 (100), 107.0357 (43.12), 133.0109 (24.5)	Ácido málico	Ácido orgánico	De Falco et al., 2018
10	6.623	C ₆ H ₈ O ₇	(M-H) ⁻	191.0196	0.71	99.52	111.0062 (100), 191.0153 (28.29), 129.0161 (8.26)	Ácido cítrico*	Ácido orgánico	Oliveira-Alves et al., 2017; Pastell et al., 2019; De Falco et al., 2018

11	7.458	$C_9H_{12}N_2O_6$	(M-H) ⁻ (M+Cl) ⁻ (M+COOH) ⁻	243.0622 279.0383 289.0672	0.41	99.87	110.0246 (100), 200.0572 (57.92), 243.0623 (55.74), 140.0357 (23.12), 152.0348 (21.31)	Uridina	Nucleósido de pirimidina	Xiang et al., 2018
12	7.677	$C_{23}H_{32}O_{19}$	(M-H) ⁻	611.1443	4.98	73.97	306.0776 (100), 611.1493 (65.81), 272.0894 (26.19), 338.0497 (12.97)	Desconocido	-	-
13	8.06	$C_9H_{11}NO_3$	(M-H) ⁻	180.0667	-0.35	99.65	119.0507 (100), 163.0405 (30.56)	L-Tirosina *	Aminoácido	Olivos-Lugo et al., 2010; Coelho y Salas-Mellado et al., 2018; Gómez-Favela et al., 2017
14	9.307	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	(M-H) ⁻ (M+Cl) ⁻ (M+COOH) ⁻	266.0890 302.0656 312.0949	0.2	99.5	134.0473 (100), 266.0915 (13.86)	Adenosina	Nucleósido de pirimidina	Xiang et al., 2018
15	10.279	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	(M-H) ⁻	282.0849	-1.86	97.24	133.016 (100), 108.0206 (93.79), 150.0424 (32.97)	Guanosina	Nucleósido de pirimidina	Xiang et al., 2018
16	12.063	$C_{12}H_{15}NO_{17}$	(M-H) ⁻	840.3096	-0.65	90.76	840.3184 (100), 241.004 (5.54)	Desconocido	-	-
17	12.7	$C_9H_{11}NO_2$	(M-H) ⁻	164.0716	0.9	99.68	103.0551 (100), 147.0452 (34.09)	L-Fenilalanina *	Aminoácido	Olivos-Lugo et al., 2010; Coelho y Salas-Mellado et al., 2018; Amato et al., 2015; De Falco y Fiore, 2018
18	13.549	$C_8H_8O_4$	(M-H) ⁻	167.0346	2.6	98.72	123.0448 (100), 121.0294 (73.95), 109.0291 (33.23), 137.0243 (23.82)	Ácido dihidroxifenilacético	Ácido fenólico	Hamrouni-Sellami et al., 2013
19	13.937	$C_{13}H_{16}O_9$	(M-H) ⁻	315.0714	2.59	97.69	152.0116 (100), 108.0215 (70.99), 153.0191 (52.14), 109.0294 (37.98)	Glucósido de dihidroxibenzoilo	Ácido fenólico	Shen et al., 2018
20	14.407	$C_9H_{10}O_5$	(M-H) ⁻	197.0448	3.87	96.9	179.0359 (100), 135.0456 (57.62), 123.0456 (55.32)	Ácido salviánico A	Ácido fenólico	Oliveira-Alves et al., 2017; De Falco y Fiore, 2018
21	14.829	$C_{14}H_{18}O_9$	(M-H) ⁻ (M+Cl) ⁻	329.0888 365.0649	-2.65	96.17	167.0355 (100), 123.0455 (5.58)	Glucósido de ácido vanílico	Ácido fenólico	Shen et al., 2018

22	16.284	$C_{10}H_{12}O_5$	(M-H) ⁻	211.0614	-0.9	99.34	181.0509 (100), 163.0397 (57.5)	Oresbiasina A	Catequina	Chen et al., 2011
23	16.887	$C_{57}H_{99}N_5O_{21}$	(M-H) ⁻	1148.363	0.33	98.46	822.305 (100), 1048.3322 (90.14), 241.0041 (4.03)	Desconocido	-	-
24	16.902	$C_{13}H_{12}O_9$	(M-H) ⁻	311.0393	5.38	90.4	149.0086 (100), 179.0345 (98.75), 135.0442 (10.77)	Ácido caftárico	Ácido fenólico	Musa Özcan et al., 2019
25	17.082	$C_{18}H_{24}O_{13}$	(M-H) ⁻	447.1142	0.63	99.01	152.0115 (100), 108.0214 (38.37), 109.0292 (16.72)	Ácido dihidroxibenzoico anisil elucósido	Ácido fenólico	Gahfoor et al., 2018
26	18.051	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	(M-H) ⁻	203.0828	-0.77	99.54	116.0502 (100), 142.0657 (26.79)	L-Triptófano	Aminoácido	Gómez-Favela et al., 2017; Amato et al., 2015; Beltrán-Orozco y Martínez-Olguín, 2020
27	18.46	$C_{19}H_{26}O_{13}$	(M-H) ⁻	461.1291	2.21	97.26	137.0248 (100), 461.133 (57.96), 239.0571 (22.15)	Sibiricosina A3	Ácido fenólico	Wu et al., 2015
28	18.911	$C_7H_6O_3$	(M-H) ⁻	137.0247	-1.61	99.53	108.0213 (100)	Dihidroxibenzald ehió isómero 1	Fenol	Li et al., 2021
29	19.74	$C_{17}H_{22}O_{11}$	(M-H) ⁻	401.1081	2.18	97.34	267.0734 (100), 401.1126 (95.86), 249.0633 (69.13), 151.0407 (65.01),	Desconocido	-	-
30	20.713	$C_{21}H_{28}O_{14}$	(M-H) ⁻ (M+Cl) ⁻	503.1404 539.1169	0.56	99.53	503.1465 (100), 161.0255 (33.26), 323.08 (13.1), 281.068 (11.53)	Gentiobiosa de cafeína	Ácido fenólico	Llorent-Martinez et al., 2019
31	21.13	$C_{20}H_{34}O_{11}$	(M-H) ⁻	449.202	1.98	98.03	112.9853 (100), 449.2049 (39.63), 248.9621 (46.98), 167.1072 (37.07), 180.9744 (29.26)	Desconocido	-	-
32	21.279	$C_{15}H_{18}O_9$	(M-H) ⁻	341.087	2.46	97.68	179.0355 (100), 135.0451 (24.28)	Glucósido de cafeína	Ácido fenólico	Chen et al., 2011
33	21.353	$C_{14}H_{14}O_9$	(M-H) ⁻	325.0545	6.48	86.2	-	Ácido férrico	Ácido fenólico	Pigni et al., 2020

46	24.411	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	(M-H) ⁻	313.0706	3.92	94.39	161.0245 (100), 295.2296 (28.77), 313.0733 (9.18), 151.04 (7.05)	Ácido salvianólico F	Ácido fenólico	Cvetkovikj et al., 2013
47	24.74	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	(M-H) ⁻	329.0652	4.74	92.22	299.02 (100), 314.0432 (74.91)	Jacosidina	Flavonoide	Qiao et al., 2009
48	25.718	C ₂₁ H ₃₂ O ₇	(M-H) ⁻	395.2091	-3.16	88.6	-	Desconocido	-	-

Se describen los compuestos identificados en los extractos de semillas de chía. Se indican el tiempo de retención (RT) y el número de pico consecutivo correspondiente a la Figura 1. La fórmula molecular propuesta, m/z experimental, error (ppm), puntuación, picos del espectro MS/MS (intensidad relativa), compuesto propuesto y naturaleza química. P: puntuación; NQ: naturaleza química *Identificación confirmada utilizando estándares comerciales.

La Tabla 19 resume las concentraciones de los compuestos del extracto por interpolación en la curva de calibración correspondiente. La sacarosa, el ácido cítrico, la tirosina y el ácido rosmarínico se cuantificaron utilizando su correspondiente curva estándar, ya que se disponía de sus estándares, mientras que el resto de los compuestos se cuantificaron tentativamente en base a los demás estándares de estructura similar, tal y como se indica en la Tabla 5. Hay que tener en cuenta que la respuesta de los estándares puede diferir de la de los analitos presentes en el extracto, por lo que la cuantificación de estos compuestos es sólo una estimación de sus concentraciones reales. En cualquier caso, pueden considerarse una aproximación útil.

Tabla 19. Concentración de los principales compuestos en las semillas de chía.

Pico	Compuesto	Curva de calibración utilizada	Concentración media \pm SD ($\mu\text{g/g}$ semillas)
7	Sacarosa	Sacarosa	$5.1 \cdot 10^3 \pm 0.8 \cdot 10^3$
10	Ácido cítrico	Ácido cítrico	503.9 ± 82.1
13	L-Tirosina	L-Tirosina	33.8 ± 1.7
17	L-Fenilalanina	L-Fenilalanina	51.0 ± 11.9
18	Ácido dihidroxifenilacético	Ácido protocatéuico	$22.8 \pm 0.004.7$
19	Glucósido de dihidroxibenzoilo	Ácido gentísico	189.6 ± 32.4
20	Ácido salvianólico A	Ácido protocatéuico	40.1 ± 6.7
21	Glucósido de ácido vanílico	Ácido vanílico	165.7 ± 29.1
22	Oresbuisina A	Ácido protocatéuico	15.0 ± 2.5
24	Ácido caftárico	Ácido cafeico	7.5 ± 2.4
25	Glucósido de dihidroxibenzoico- apiosil	Ácido gentísico	80.5 ± 6.1
28	Dihidroxibenzaldehido	Ácido gentísico	56.3 ± 2.1
30	Gentiobiosa de cafeína	Ácido cafeico	4.0 ± 0.4
32	Glucósido de cafeína	Ácido cafeico	9.5 ± 1.7
33	Ácido férrico	Ácido ferúlico	15.8 ± 3.7
34	Ácido dihidroxibenzoico	Ácido gentísico	<LOQ *
38	Ácido salvianólico B/E	Ácido rosmarínico	61.6 ± 13.5
40	Glucósido de ácido rosmarínico	Ácido rosmarínico	$3.9 \cdot 10^3 \pm 0.7 \cdot 10^3$
41	Ácido rosmarínico	Ácido rosmarínico	$1.2 \cdot 10^3 \pm 0.1 \cdot 10^3$
43	Metil rosmarinato	Ácido rosmarínico	13.5 ± 0.5
47	Jaceosidina	Luteolina	0.7 ± 0.1

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. *LOQ: límite de cuantificación

Discusión

Las semillas de chía se consideran una buena fuente de diferentes nutrientes, pero su composición varía en función de la variedad, las condiciones agronómicas del cultivo y de factores ambientales. En este trabajo se ha realizado un análisis fitoquímico de los componentes de la semilla de chía oscura *Salvia hispánica* L. procedente de México, con el objetivo de conocer su composición, y poder deducir sus potenciales beneficios para la salud humana, así como sus posibles aplicaciones nutraceuticas. Nuestros resultados describen que los principales componentes con actividades nutricionales y funcionales son la fibra, el ácido linolénico, algunos aminoácidos esenciales, nucleósidos y compuestos fenólicos, lo que refuerza el concepto de que la chía puede ser considerada como un alimento completo con actividad funcional (Zettel y Hitzmann, 2018).

Se considera que las semillas de chía tienen un alto valor nutricional, especialmente por su alto contenido en fibra alimentaria. Ésta oscila entre el 30.2% (Jin *et al.*, 2012) y el 34.4% (Kulczynski *et al.*, 2019). Nuestros datos muestran que las semillas de chía oscura de Jalisco contienen 35.1% de fibra, lo cual es ligeramente superior al 32.6% encontrado para una variedad de chía oscura de Sinaloa (Coates, 2011). La composición de la fibra no sólo depende de la variedad (Muñoz *et al.*, 2013), sino también de otros factores ambientales (Reyes-Caudillo *et al.*, 2008). Las múltiples funciones y beneficios de la ingesta de fibra dietética incluyen la reducción del riesgo de enfermedades coronarias y la reducción del índice glucémico. Su ingesta reduce el riesgo de diabetes de tipo 2 y algunos tipos de cáncer, y también puede ejercer un efecto saciante que puede ayudar al control de la obesidad (Barber *et al.*, 2020). Estas propiedades de la fibra justifican las actuales ingestas diarias recomendadas (IDR): 25-30 g/d. (OMS, 2021). Según el Real Decreto 1334/1999, para ser considerado un alimento "rico en fibra", el producto debe contener al menos 6 g de fibra por cada 100 g de alimento, o al menos 3 g de fibra por cada 100 calorías. Por tanto, la chía es un alimento rico en fibra cuya incorporación a la dieta es una buena opción para alcanzar dichas recomendaciones (Stephen *et al.*, 2017).

Además, la fibra puede tener diferentes aplicaciones en la industria alimentaria. Las gomas de fibra se extraen de las semillas de chía y se utilizan como aditivo para controlar la viscosidad, estabilidad, textura y consistencia de los alimentos elaborados (Campos *et al.*, 2016). Otros autores han descrito que el mucílago de chía contiene polisacáridos, que actualmente se utilizan para el recubrimiento funcional de algunos alimentos, sustituyendo los envases sintéticos y contribuyendo a la sostenibilidad medioambiental (Dick *et al.*, 2015).

Otros carbohidratos importantes que se encuentran de forma natural en la chía son los oligosacáridos, que pueden ser utilizados como moléculas altamente energéticas, pero que también pueden ejercer beneficios para la salud. Según nuestros resultados, dentro de este tipo de moléculas, las semillas de chía oscura contienen estaquiosa (tetrasacárido) y dos isómeros de rafinosa (trisacáridos). Estos oligosacáridos se utilizan habitualmente como sustituto del azúcar, con el fin de disminuir el índice glucémico de los alimentos manufacturados (Hernández y Pozo, 2010). Además, se ha descrito que los trisacáridos pueden

contribuir a la formación de fenoles antioxidantes naturales, lo que sugiere otro potencial beneficio de estos componentes de las semillas de chía que deben ser demostrados en estudios experimentales y clínicos (Muñoz-González *et al.*, 2019).

Estudios previos han descrito que las semillas de chía oscura contienen alrededor de un 86% de grasas insaturadas, principalmente un 59% de ácido linolénico, un 19% de ácido linoleico y un 8% de ácido oleico (Ayerza y Coates, 2005; Peiretti, 2009; Ciftci *et al.*, 2012; Muhammad *et al.*, 2016). Esta proporción de ácido linolénico es considerablemente mayor que la presente en otros cereales como el arroz (2.1%), el maíz (1%), el trigo (0.08), la quinoa (6.7%) y el amaranto (1.0%), y hace que la chía sea la mejor fuente alimentaria de ácido linolénico (Martirosyan *et al.*, 2007; Pasko *et al.*, 2008; Noshe y Al-Bayyar, 2017; Singh *et al.*, 2019). Sin embargo, esta presencia de ácidos grasos puede variar según factores ambientales, como la ubicación geográfica, los cambios de temperatura, la composición del suelo, entre otros. Por ejemplo, el contenido de ácidos grasos insaturados omega-3 aumenta con temperaturas bajas de cultivo (Mohd Ali *et al.*, 2012; Segura-Campos *et al.*, 2016), pudiendo alcanzar hasta un 68% de ácido linolénico (Ayerza *et al.*, 2002). La ingesta de ácido linolénico ha demostrado tener efectos beneficiosos para la salud, ya que es el precursor de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3, el eicosapentaenoico y el docosahexaenoico, dos ácidos grasos antiinflamatorios, que pueden modular el comportamiento del sistema inmunológico, y ejercer efectos cardioprotectores (Sierra *et al.*, 2015), antidiabéticos (Creus *et al.*, 2017), hepatoprotectores (Rossi *et al.*, 2017) y anticancerígenos (Mohd Ali *et al.*, 2012). La relación omega-6/omega-3 en las semillas de chía es de 3.02, y los índices aterogénico y trombogénico calculados son bajos, debido a las altas cantidades de ácidos grasos con propiedades antiaterogénicas encontrados en las semillas de chía (Castejón *et al.*, 2020). Por lo tanto, la inclusión de semillas de chía en la dieta puede disminuir su relación omega-6: omega-3, y contribuir a una dieta equilibrada y con actividad antiinflamatoria asociada a la presencia de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3.

La especie vegetal y los factores ambientales y agronómicos también influyen en el contenido de proteínas de la chía (Ayerza, 2009). Las semillas de chía se consideran una buena fuente de proteína vegetal, que representa entre el 18 y el 24% de la masa total en la variedad oscura (Vázquez-Ovando *et al.*, 2010; Kulczynski *et al.*, 2019), como hemos descrito en el presente trabajo. Esta cantidad es superior a la presente en cereales y oleaginosas comunes, como el trigo (14%), la cebada (9.2%) (Vázquez-Ovando *et al.*, 2010) la avena (15.3%), el maíz (14%) y el arroz (8.5%) (Monroy-Torres *et al.*, 2008). Además, se ha descrito de que la calidad de esta proteína es alta (Capitani *et al.*, 2012). La calidad de la proteína se determina por la cantidad de proteína en el alimento, la cantidad de aminoácidos esenciales y la digestibilidad de la proteína (Rutherford *et al.*, 2014). Nuestro análisis de los aminoácidos específicos presentes en la chía confirma la presencia de cinco aminoácidos principalmente: L-asparagina, L-ácido aspártico, L-tirosina, L-fenilalanina y L-triptófano, coincidiendo con lo descrito previamente (Sandoval-Oliveros y Paredes-López, 2013). Dentro de estos aminoácidos, el triptófano y la fenilalanina son dos aminoácidos esenciales que escasean en los alimentos. Estos aminoácidos desempeñan un papel importante

en el organismo. El triptófano es un precursor de la serotonina y la melatonina que interviene en la regulación de los ritmos circadianos, así como en la regulación del apetito y el estado de ánimo, mientras que la fenilalanina es un precursor de la dopamina, una hormona que genera bienestar, placer, euforia y felicidad (Din *et al.*, 2021). La cantidad de fenilalanina en las semillas de chía (alrededor de 1.02 g/100 g) hace de este cereal una buena fuente de este aminoácido esencial, al igual que las almendras (1.13 g), los pistachos (1.09 g), las semillas de lino (0.96 g), las semillas de sésamo (0.94 g) y las semillas de calabaza (0.92 g). Otros alimentos aportan cantidades menores, como las nueces (0.71 g); cereales como la avena (0.89 g), el centeno (0.43 g) y el trigo (0.46 g); y legumbres como las alubias (0.47 g), la soja (0.56 g) y las lentejas (0.44 g); sólo las semillas de cáñamo aportan cantidades mayores (2.77 g) (Plimmer, 1908; FAO, 1970; Enríquez y Sofía, 2021). De esta manera, en base a nuestros resultados, podemos decir que la presencia de estos dos aminoácidos esenciales en las semillas de chía justifica su elevado valor biológico, y por lo tanto la chía puede considerarse una buena fuente dietética de proteína de calidad, como se ha descrito anteriormente (Pastell *et al.*, 2019). Por otro lado, la ausencia de gluten hace que las semillas de chía sean muy apreciadas por los pacientes que padecen la enfermedad celíaca, ya que no constituyen ningún riesgo para ellos. Finalmente, las proteínas aisladas de las semillas de chía pueden ser un ingrediente útil para enriquecer diferentes alimentos manufacturados (Segura-Campos *et al.*, 2013).

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que describe la presencia de nucleósidos, adenosina, guanosina y uridina en las semillas de chía, lo que supone una novedad nutricional que debe ser investigada. La ingesta de estas moléculas ha demostrado beneficios para la prevención de diferentes patologías y en la activación de la respuesta inmunológica, principalmente en lactantes y adultos frágiles (Niers *et al.*, 2007). Estos beneficios han llevado a su incorporación en diferentes tipos de alimentos, como fórmulas infantiles, fórmulas enterales para adultos (Di Caro *et al.*, 2019) y complementos alimenticios (Boehm *et al.*, 2002; Gibson *et al.*, 2004). Se han realizado varios estudios de intervención para confirmar el beneficio de los nucleósidos, que han sido relacionados con la estimulación y modulación del sistema inmunológico (Lerner y Raanan, 2002). Están implicados en la proliferación, maduración y activación de los linfocitos, en la estimulación de la función fagocítica de los macrófagos y en la modulación de las respuestas a trasplantes, tumores, infecciones, hipersensibilidad retardada y producción de inmunoglobulinas (Fontana *et al.*, 2017). Por otro lado, la EFSA ha declarado que los nucleósidos son nutrientes condicionalmente esenciales, ya que contribuyen al desarrollo y crecimiento de nuevas células, promoviendo el bienestar general, mejorando la inmunidad del organismo y ayudando a promover una adecuada actividad intestinal (EFSA, 2011). Por lo tanto, la inclusión de la chía en la dieta puede contribuir a alcanzar estas recomendaciones específicas, y son necesarios nuevos estudios clínicos para determinar los posibles beneficios de la suplementación con nucleósidos de la chía.

Centrándonos en el contenido fenólico, y según nuestros resultados, se identificaron los siguientes fenoles ácido salvianólico F, dos isómeros de dihidroxibenzaldehído, rosmarinato de metilo, ácido rosmarínico, glucósido de ácido rosmarínico, ácido salvianólico B/E, ácido dihidroxibenzoico, ácido

fertárico, glucosido de cafeína, gentiobiosa de cafeína, sibiricosa A3, ácido dihidroxibenzoico apiosil glucósido, ácido caftárico, oresbiusina A, y en menor concentración glucósido de ácido vanílico, ácido salviánico, glucósido de dihidroxibenzoilo y ácido dihidroxifenilacético. La presencia en la chía de la mayoría de ellos ha sido descrita anteriormente (Pastell *et al.*, 2019), sin embargo, hasta la fecha no se había documentado la presencia de glucósido de ácido tuberónico, saliandulina, metiltanshinonato y jaceosidina.

Nuestros datos confirman específicamente que el ácido rosmarínico, un derivado del ácido caféico, es uno de los compuestos más abundantes en las semillas de chía negra. Estos datos concuerdan con los reportados por otro estudio donde la cuantificación del ácido rosmarínico fue de 0.92 mg/g (Martínez Cruz y Paredes López, 2014). Los resultados de nuestro estudio mostraron una concentración de 3,9 mg/g, específicamente glucósido de ácido rosmarínico y 1,2 mg/g de ácido rosmarínico. La presencia de este ácido es de suma importancia, ya que posee propiedades antioxidantes, astringentes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimutagénicas, antibacterianas y antivirales (Oleszek, 2002; Dimitric- Markovic, 2007; Krzyzanowska *et al.*, 2012).

Por otra parte, hasta la fecha, no se ha descrito la presencia de ácidos salvianólicos (un dímero del ácido cafeico) en las semillas de chía, así como la ausencia de ácido cafeico. Otros trabajos han observado la presencia de trímeros y tetrameros del ácido cafeico. Esta molécula es la molécula de partida de una gran variedad de metabolitos encontrados en distintas especies del género *Salvia* (como *S. miltiorhiza*, *S. Officinalis*, *S. cavaleriei*, *S. flava*, *S. chinensis*), que se componen de múltiples productos de condensación, y dan lugar a una variedad de oligómeros, incluyendo el ácido salvianólico A-K y el ácido litospermico (Ai y Li, 1992; Lu y Foo, 2002; Hanafy *et al.*, 2020). De hecho, se han identificado las sales A y B como los compuestos más abundantes entre los ácidos salvianólicos de la chía (Chen *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2017). Sin embargo, nuestros resultados muestran la presencia de ácido salvianólico, ácido salvianólico B/E y ácido salvianólico F específicamente en las semillas de chía oscura de Jalisco. Entre las propiedades beneficiosas de estos compuestos, destacan los efectos antiinflamatorios y antioxidantes, concretamente para eliminar radicales libres (Zhao *et al.*, 2010). La actividad antioxidante de los ácidos salvianólicos está mediada por el aumento de la expresión de las enzimas antioxidantes, mientras que disminuye la expresión de las enzimas pro-antioxidantes (Du *et al.*, 2016). Además, estudios recientes muestran que los ácidos salvianólicos tienen efectos beneficiosos en algunas enfermedades fibróticas crónicas, especialmente la fibrosis hepática y pulmonar, y también tiene posibles efectos anticancerígenos (Zhang *et al.*, 2014). Sin embargo, se necesitan más estudios de investigación para evaluar potenciales mecanismos de acción de estos compuestos y su posible utilidad en el tratamiento de otras enfermedades.

Por último, además de los posibles beneficios nutricionales y funcionales descritos, las semillas de chía no contienen otros componentes que puedan ejercer efectos nocivos para la salud, como el gluten u otros alérgenos, o incluso micotoxinas (Melo *et al.*, 2019; Katunzi-Kilewela *et al.*, 2021; Rajput *et al.*, 2021), lo

que permite su utilización como ingrediente/complemento en diferentes tipos de alimentos destinados a toda la población (Menga *et al.*, 2017).

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la chía oscura de Jalisco es un alimento rico en fibra, que contiene ácidos grasos poliinsaturados omega-3, aminoácidos esenciales (fenilalanina y triptófano), nucleósidos (adenosina, guanidina y uridina), y además en compuestos fenólicos antioxidantes, principalmente metabolitos del ácido cafeico, confirmando su potencial uso como ingredientes para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales y suplementos dietéticos.

Conclusión

Nuestros hallazgos indican que las semillas de chía son ricas en fibra dietética y oligosacáridos, ácidos linolénicos poliinsaturados omega-3, proteínas de alta calidad que contienen L-fenilalanina y L-triptófano. También son una buena fuente de antioxidantes, en particular polifenoles. Además, la variedad específica de chía oscura de Jalisco contiene también nucleósidos: adenosina, guanosina y uridina, mejorando su valor nutricional. Por tanto, es el conjunto de sus nutrientes y compuestos bioactivos el que determina su estatus como alimento funcional.

**LECHE Y
PRODUCTOS
LÁCTEOS**

Sección V. Leche y productos lácteos como vehículos de calcio y vitamina D: papel de las leches enriquecidas

La leche y sus derivados son alimentos básicos dentro de una dieta occidental equilibrada, como la Dieta Mediterránea, ya que aportan nutrientes fundamentales durante todas las etapas de la vida. En las últimas décadas, su consumo ha disminuido notablemente y de forma paralela se ha detectado un aumento de algunas alteraciones provocadas por la carencia de micronutrientes presentes en los productos lácteos, principalmente calcio y vitamina D. Esta tendencia está derivando en un grave problema de salud pública en determinados grupos de población. Para intentar solucionar estos problemas, se han incorporado al mercado alimentos enriquecidos con estos componentes, entre los que destacan los productos lácteos porque proporcionan mejor biodisponibilidad del calcio y vitamina D, y por tanto son los más recomendables. Se han realizado diversas investigaciones que demuestran el beneficio que supone la suplementación con leche enriquecida en calcio y vitamina D en grupos vulnerables, como los adultos mayores y las mujeres posmenopáusicas, en los que mejora sustancialmente el recambio óseo y aumenta la densidad y la fuerza de los huesos.

Objetivos específicos

- Revisar la importancia que tiene el consumo del calcio de la leche
- Revisar las recomendaciones actuales de ingesta
- Analizar la utilidad de las leches enriquecidas con calcio para determinados grupos de población como alternativa para aumentar las ingestas de este mineral y también de vitamina D.
- Clarificar los errores y mitos que han surgido recientemente con relación a determinados alimentos que pretenden sustituir a la leche y sus derivados, basándonos en sus diferencias de composición, biodisponibilidad y efectos sobre la salud.

Introducción

La leche es un alimento insustituible en todas las etapas de la vida dentro de una dieta equilibrada. Numerosas investigaciones han demostrado el papel que desempeñan la leche y sus derivados como vehículos de nutrientes esenciales para el adecuado funcionamiento del organismo (Fernández-Fernández *et al.*, 2015; Marangoni *et al.*, 2018). La leche es una fuente esencial de proteínas, grasas, minerales y vitaminas, así como de nucleótidos y poliaminas, entre otros micronutrientes. Dentro de estos destacan el calcio y la vitamina D, que, por su elevada presencia y su alta biodisponibilidad, no igualada por ningún otro alimento, permite garantizar las ingestas diarias recomendadas (IDR) (FEN, 2015). Estos dos micronutrientes están vinculados con el desarrollo y mantenimiento de procesos fisiológicos tales como el

crecimiento y mantenimiento óseo, la coagulación sanguínea, el metabolismo energético y neuromuscular, la función de enzimas digestivas, la división neuromuscular y la diferenciación celular (FEN, 2015; Yackobovitch *et al.*, 2017; Reid *et al.*, 2017; Gil *et al.*, 2018). Por estos motivos, el consumo de leche y sus derivados resulta fundamental, no solo durante el crecimiento y el desarrollo, sino en todas las etapas de la vida. Sin embargo, en la actualidad existe una controversia generalizada sobre los posibles efectos perjudiciales que la leche y sus derivados pueden ocasionar sobre la salud, que no está respaldada por la evidencia científica. A consecuencia de dicha “moda alimentaria”, tanto en España como en los países occidentales se ha observado que el consumo de leche ha disminuido notablemente (MAGRAMA, 2014), lo que ha dado como resultado una reducción preocupante en la ingesta de calcio y vitamina D, con las consecuencias que su carencia puede ocasionar para la salud (Fernández-Fernández *et al.*, 2015; Marangoni *et al.*, 2018; FEN, 2015). El impacto que tienen las redes sociales y los medios de comunicación sobre el comportamiento de la población ha contribuido en gran medida a aumentar las dudas y mitos sobre el consumo de leche, que ha sido catalogada como nociva para la salud. Son alarmantes algunos titulares encontrados en estos medios, del tipo “La leche es un veneno”. Por supuesto, hay que incidir en la importancia de una adecuada educación nutricional para que la población pueda tomar decisiones bien informadas y, dentro de ésta, las campañas de promoción del consumo de lácteos (basadas en evidencia científica) son muy necesarias. Concretamente, el descenso en el consumo de leche en determinados grupos de población hace interesante la incorporación a la dieta de leches enriquecidas con estos micronutrientes, que permitan la ingesta de las cantidades adecuadas de los mismos aun con un menor consumo productos lácteos.

Consumo de leche y derivados lácteos. Situación actual respecto a los requerimientos en España

La búsqueda del alimento siempre ha sido un medio de supervivencia para el ser humano, y la leche ha sido, y sigue siendo, un alimento fundamental en su dieta, como es en la Dieta Mediterránea. El desarrollo evolutivo trascendió con la invención de la agricultura y la ganadería, que permitió disponer de carne y leche en cantidades suficientes para poder cubrir las necesidades energéticas para mejorar el crecimiento y desarrollo, así como los mecanismos de defensa contra enfermedades y, con ello, aumentar las expectativas de vida (Eaton y Iannotti, 2017). El *Homo sapiens* se adaptó genéticamente y pudo ingerir y tolerar de adulto la leche gracias a la persistencia de la expresión de lactasa, una enzima que metaboliza el principal carbohidrato de este alimento. La persistencia de la lactasa, que apareció hace unos 7500 años, es un ejemplo de evolución genética. El patrón moderno de diversidad en este *locus* en Europa es el resultado de la interacción de un gran número de factores fisiológicos, genéticos, demográficos, migratorios, de estructuración social y de contacto de culturas (Itan *et al.*, 2009). Esta adaptación proporcionó una fuerte ventaja genética. De hecho, las estimaciones del coeficiente de selección del alelo de persistencia de lactasa producen hasta un 19% más de descendencia fértil que las que no lo portan (Itan *et al.*, 2009).

A partir de los años cincuenta, el consumo de leche y derivados aumentó progresivamente en paralelo al incremento del nivel de formación y a la capacidad adquisitiva de la población (AESAN, 2014). En 1958, se establecieron las normas relativas a la producción y comercialización de leche higienizada. Los avances en los procesos de higienización permitieron una mayor disponibilidad de estos productos, lo que dio lugar al incremento en su consumo con el paso de los años, el cual se asoció a una menor prevalencia de enfermedades infecciosas y a la mejora del estado nutricional de la población. De esta manera, el consumo de leche ha permitido un gran avance en la nutrición humana, no solo desde el punto de vista de seguridad alimentaria, sino también como un vehículo de nutrientes de alta calidad biológica y nutricional, ya que es un alimento asequible y disponible para la población en general. Se podría decir que, hoy en día, la leche y otros productos lácteos proporcionan una variedad de nutrientes de muy buena calidad, y son menos costosos que otros alimentos derivados de animales (FEN, 2012). Sin embargo, en las últimas décadas su consumo ha disminuido notablemente debido a que algunos medios de comunicación y redes sociales han catalogado a la leche y a sus derivados como nocivos para la salud, hecho que no ha sido demostrado científicamente (Guo *et al.*, 2017; Larsson *et al.*, 2015). En un principio, la leche se consideró como un alimento rico en grasa y se asoció con el desarrollo de patologías como el sobrepeso, la obesidad y sus patologías asociadas, como las cardiovasculares. Es importante mencionar que muchos profesionales de la salud recomiendan la disminución del consumo de grasa láctea por debajo del 10% de la energía total ingerida. Esta recomendación no está del todo justificada, especialmente porque se ha demostrado que los ácidos grasos presentes en la leche no son perjudiciales a nivel cardiovascular (Soedamah-Muthu y de Goede, 2018). A pesar de esto, y ante la necesidad de disminuir la ingesta de grasa total de la dieta, la industria láctea reaccionó incorporando al mercado leches con un contenido reducido de grasa. Posteriormente, el incremento de las intolerancias y alergias alimentarias, algunas auto diagnosticadas de forma errónea, ha llevado a ciertos sectores de la población mal informados a evitar el consumo de lactosa, para lo que la industria también ha desarrollado productos sin lactosa, y proteína de leche, por considerarlos responsables de estos problemas. Finalmente, y no por ello menos preocupante, se han atribuido otras propiedades perjudiciales a la leche que no han podido ser demostradas científicamente (Yang *et al.*, 2014; Thorning *et al.*, 2016). Sin embargo, y a pesar de la falta de evidencia científica, muchos consumidores han optado por eliminarla de sus dietas e incluir productos que, aunque no pueden ser catalogados como leches, han sido lanzados como sus sustitutos, y tienen el gran problema de que no aportan las mismas cantidades de nutrientes que la leche, principalmente proteínas, calcio y vitamina D. Como consecuencia de esta “moda alimentaria”, tanto en España como en otros países, el consumo de calcio ha disminuido a una media de 803 mg/persona/día, mientras que la ingesta de vitamina D se encuentra en 4.4 µg/persona/día. Estas ingestas están por debajo de las ingestas diarias recomendadas (IDR) para dichos nutrientes (1200 mg/persona/día y 15 µg/persona/día para el calcio y la vitamina D, respectivamente), lo que está provocando carencias nutricionales y, como consecuencia, importantes problemas de salud (ANIBES, 2015). En 2012, un estudio realizado en población española mostró que la ingesta media de calcio fue

inferior a la IDR en el 78.4% de los participantes (70% hombres, 86% mujeres), con ingestas por debajo del 67% de la recomendación en el 33.7% de los participantes (25.5% hombres, 40.9% mujeres). En este estudio se describe que la principal fuente de calcio fueron productos lácteos (53.1%), y los resultados señalaron que los individuos que alcanzaban la IDR de calcio consumían más productos de este tipo que los que no la alcanzaban (551.3 ± 240.4 g/día vs 305.0 ± 150.3 g/día, respectivamente) (Estaire *et al.*, 2012).

Requerimientos nutricionales de calcio y vitamina a lo largo del ciclo de la vida

El calcio es un elemento esencial e imprescindible para la salud del ser humano. Representa el 2% del peso corporal total y desempeña un papel importante para la estructura y regulación del organismo. Su absorción está influenciada por la presencia de vitamina D, entre otros factores. La IDR de calcio ha aumentado desde el 2001 (Fig. 1). Los datos más recientes, de 2016, recomiendan la ingesta de 800-1200 mg/día para el grupo de edades comprendidas entre 4-8 años, lo que significa un aumento del 50% si se compara con las recomendaciones de 2001, mientras que en el grupo de 9-24 años la IDR es de 1200-1500 mg/día, que supone un aumento del 15.4% hasta la edad de 18 años y un aumento del 50% entre las edades de 19-24 respecto a 2001 (NAP, 2001, 2004; Moreiras *et al.*, 2016). En las mujeres embarazadas se recomienda una IDR de 500 mg/días adicionales a la IDR correspondiente a esa edad, lo que también resulta una variación de más del 50% en comparación con 2001. Por otro lado, en personas mayores de 60 años, la IDR se ha incrementado un 25%, hasta 1.500 mg/día de calcio, mientras que para edades comprendidas entre 50-65 años, los valores de IDR han disminuido de 1200 a 1000 mg/día (Moreiras *et al.*, 2016). Estas modificaciones de las IDR están basadas en las conclusiones aportadas por varios estudios que revisan la importancia del calcio en la salud ósea (EFSA, 2010; Bresson *et al.*, Wahlqyist, 2013; Ortega *et al.*, 2014).

Al igual que ocurre con el calcio, las IDR de vitamina D han aumentado desde 2001 debido a la importancia que tiene un suministro adecuado para el correcto funcionamiento del organismo y para la prevención de algunas enfermedades (EFSA, 2010; Wahlqyist, 2013; Ortega *et al.*, 2014; NIH, 2015). El aumento propuesto para la IDR en España ha sido el 100% (de 5 µg/día a 10 µg/día) desde el nacimiento hasta la edad de 50 años en mujeres embarazadas y en lactantes; los valores para personas de entre 50-70 años han permanecido sin cambios, mientras que en población mayor los valores recomendados alcanzan los 20 µg/día (un aumento de 33.3%), ya que en estas personas la producción y la síntesis renal se reducen considerablemente (Varela-Moreiras, 2013). Este aumento de las IDR de vitamina D se justifica tras múltiples estudios que relacionan una ingesta más alta con la prevención de diversas enfermedades, entre las que destaca el raquitismo en niños de hasta cuatro años de edad, al igual que para prevenir las fracturas óseas en mujeres de entre 50-70 años y en hombres mayores de 70 años, y para prevenir el nacimiento de niños de bajo peso en mujeres embarazadas (Mendoza, 2012).

Finalmente, destacamos que el Consenso Global sobre Prevención y Manejo de Raquitismo Nutricional reconoció la contribución igualitaria de la vitamina D y el calcio dietético como causas de la carencia de calcio, y recomendó la ingesta de 10 µg/día (400 UI) diarias para todos los bebés desde el nacimiento hasta el año de vida y 15 µg/día (600 UI) durante el embarazo y en individuos de riesgo. Incluso, se recomienda que las poblaciones de alto riesgo reciban suplementos de por vida y fortificación de alimentos con vitamina D o calcio (Munns *et al.*, 2016).

Importancia de los nutrientes procedentes de productos lácteos en el funcionamiento del organismo

Los minerales juegan un papel multifuncional en la salud humana. Además de participar en la formación de la estructura ósea y los dientes, son necesarios para procesos metabólicos tales como la producción de energía, la absorción de nutrientes y la formación de proteínas, entre otros (Rodríguez-Rodríguez, 2010). Concretamente, el calcio es el principal componente de los huesos, los cuales actúan como reservorio de dicho mineral, lo que permite que se mantengan sus niveles en la sangre y en las células, donde actúa como segundo mensajero en la transducción de señales, e interviene en procesos como la coagulación sanguínea, la contracción muscular y la transmisión del impulso nervioso, además de ser cofactor de algunas enzimas y de ayudar al mantenimiento de la integridad y de la funcionalidad de membranas (Reid *et al.*, 2017). La vitamina D regula la homeostasis del calcio y la mineralización ósea, además de activar un factor de transcripción nuclear conocido como receptor de vitamina D (RVD), implicado en los procesos de diferenciación celular, inmunitarios y neuroprotectores, así como en la regulación de la presión arterial (Gil *et al.*, 2018). Dichas funciones los convierten en nutrientes esenciales y justifican la necesidad de su ingesta a través de los alimentos, entre los que destacan los productos lácteos porque mejoran su biodisponibilidad.

Además, es importante mencionar también otros micronutrientes que encontramos en la leche, aunque no sean tan abundantes, pero que son necesarios para el correcto funcionamiento del organismo (Baró y Plaza-Díaz, 2017). Un litro de leche suministra: 120 mg de magnesio, lo que corresponde al 29% de la IDR para este mineral, cuyo equilibrio es dinámico entre la fase acuosa y micelar (Gaucheron *et al.*, 2011); de 3 a 4 mg de zinc, que está en su mayoría presente en la fase micelar asociado con la caseína; así como 30 mg de selenio, que representa alrededor del 67% de la IDR para este oligoelemento (Gaucheron *et al.*, 2011; IOM, 2012). Por otro lado, otros componentes de la leche, como las proteínas, los lípidos y los hidratos de carbono, como la lactosa, los oligosacáridos libres y los glucósidos o glicoconjugados enlazados, son capaces de modificar la microbiota intestinal, y contribuye a facilitar una utilización más eficiente de los alimentos (O’Riordan *et al.*, 2014). Karav *et al.* (2016) han mostrado un efecto específico de los oligosacáridos liberados de las glicoproteínas de la leche y de la fracción de caseína y suero sobre el crecimiento bacteriano. Además, algunos trabajos han demostrado que las bacterias intestinales expresan

numerosas enzimas, hasta ahora desconocidas, que posiblemente estén relacionadas con la mejor utilización de los nutrientes de los alimentos (Karav *et al.*, 2016)

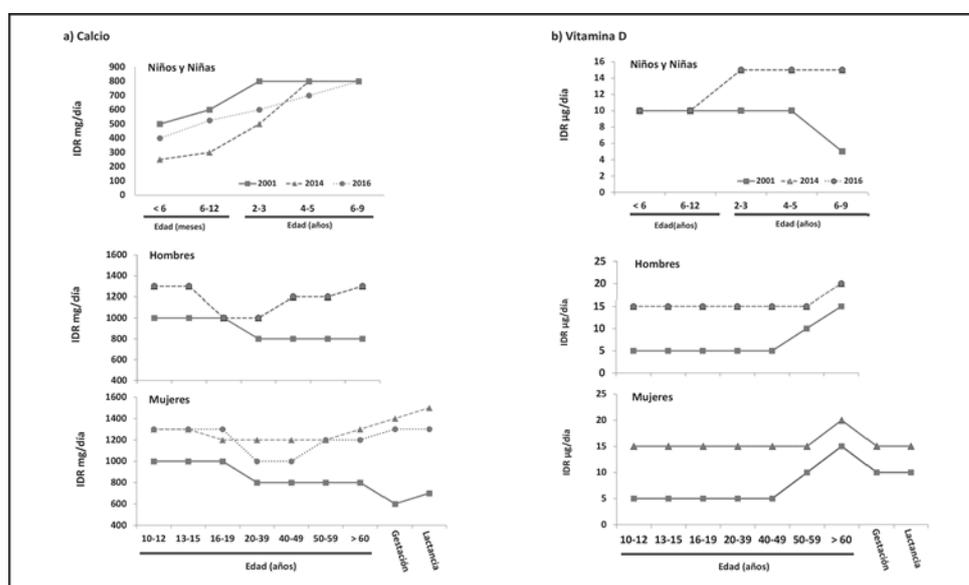


Figura 15. Comparativa IDR de calcio y vitamina D en etapas de la vida.

Las recomendaciones de cualquier nutriente se establecen siempre de acuerdo a la edad y a las necesidades específicas de cada individuo. En este sentido, garantizar las necesidades del organismo dependerá no solo de la cantidad sino, además, de la calidad y biodisponibilidad del nutriente que se ingiere. Los momentos clave donde hay mayor necesidad de calcio son los primeros años de vida, la pubertad y la vejez. La leche materna es sin duda el alimento completo e ideal para los primeros seis meses de vida y, a partir de este momento, junto con la alimentación complementaria, sigue siendo la principal fuente de proteínas biodisponibles hasta los dos años de vida; por tanto, la lactancia materna es la más recomendable durante este periodo. De no continuar con la leche materna, a partir del primer año de vida se puede incorporar la leche de vaca en la dieta del niño. Durante la pubertad se produce un crecimiento intenso y se inicia la densificación de los huesos, que permitirá en el caso de las mujeres la tolerancia a las pérdidas características del embarazo, la lactancia y el climaterio al llegar a la vida adulta. Alcanzar el desarrollo superior de masa ósea es fundamental, ya que se ha estimado que un aumento del 10% de dicha masa ósea óptima podría disminuir el riesgo de fracturas osteoporóticas durante la edad adulta en un 50% (Farré Rovira, 2015; Rizzoli, 2014). Es importante hacer hincapié en que si la ingesta de calcio disminuye, el organismo utiliza el calcio óseo para mantener las concentraciones plasmáticas necesarias para su correcto funcionamiento, lo que disminuye la densidad mineral ósea y debilita los huesos, que serán más susceptibles a sufrir fracturas.

En 2016, la Fundación Nacional de Osteoporosis de Estados Unidos realizó una revisión sistemática sobre los predictores de la masa ósea máxima (Weaver *et al.*, 2016). Dicha revisión muestra fuerte

evidencia sobre la relación entre la ingesta total de calcio y la masa ósea, y destaca la relación entre ésta y la ingesta de lácteos como principal fuente de calcio. Dentro de los ensayos clínicos revisados, el que mostró el mayor beneficio de los lácteos fue un estudio realizado en niñas chinas que consumieron una media de 455 mg de calcio/día que demostró que un aumento en la ingesta de calcio durante la infancia, adolescencia y juventud se relaciona con una mayor ganancia de masa ósea (Du X *et al.*, 2002; 2004), al igual que otro estudio posterior realizado en 350 hombres y mujeres de entre 20 y 45 años de edad que evaluó el consumo de calcio y estilos de vida tanto en la densidad mineral ósea como en los índices de metabolismo óseo concluyendo que el bajo consumo de calcio tienen un papel en la densidad mineral ósea y pronóstico de la osteoporosis en adultos jóvenes (Alghadir *et al.*, 2015).

La densidad de masa ósea se correlaciona positivamente con la ingesta de proteína de la leche, que es más beneficiosa para la masa ósea del cuello femoral que la proteína de carne roja o de alimentos procesados (Mangano *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha demostrado que un alto consumo de leche suprime la secreción de hormona paratiroidea (PTH) y disminuye los niveles de marcadores de resorción ósea, a la vez que mejora el crecimiento óseo en niños y adolescentes, que normalmente tienen un ritmo acelerado de recambio óseo para satisfacer las necesidades del crecimiento esquelético, mientras que una alta ingesta de carne no comparte estos efectos (Budek *et al.*, 2007). Todas estas evidencias demuestran que el consumo de productos lácteos juega un papel primordial en el correcto desarrollo óseo del individuo y ayuda a prevenir deficiencias en la vida adulta, que no tienen otras alternativas para ser solucionadas (Victora *et al.*, 2008).

En cuanto a la población adulta, aunque la masa ósea se ha formado en un 90% a los 18 años, no se alcanza el máximo hasta los 25-30 años, por lo que tener una ingesta adecuada de calcio durante esta etapa sigue siendo importante para obtener una salud ósea óptima, sobre todo en las mujeres que están en edad fértil (Cashman, 2007). En mujeres posmenopáusicas sanas, en las que la densidad de masa ósea se correlaciona positivamente con la ingesta de leche durante la infancia y la adolescencia, la suplementación con leche también reduce los niveles de marcadores de recambio óseo (Wlodarek *et al.*, 2014). Finalmente, una dieta rica en leche baja en grasa también se ha asociado con la preservación de la masa ósea en personas mayores (Zheng *et al.*, 2012). El efecto de la leche o cualquier otra fuente de calcio en la ralentización del recambio óseo es particularmente marcado en las poblaciones en las que la ingesta de calcio en la dieta es baja, como por ejemplo en las personas mayores que residen en los países asiáticos (Kruger *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2015; Sato *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016). Para este tipo de poblaciones, es importante considerar la utilización de productos enriquecidos, que aportan una mayor cantidad de calcio y, por lo tanto, permiten una ingesta más adecuada sin necesidad de modificar la dieta de forma significativa.

En 2014, una revisión sistemática concluyó que la suplementación con vitamina D y calcio puede prevenir las fracturas en hombres mayores y mujeres posmenopáusicas, tanto las de cadera como las fracturas nuevas no vertebrales. Sin embargo, estos autores encontraron una mayor incidencia de síntomas

gastrointestinales y enfermedad renal asociados a la suplementación con vitamina D y calcio, pero no una mayor mortalidad en los sujetos suplementados (Avenell *et al.*, 2014).

Efecto de la leche y de los productos lácteos sobre el crecimiento en la infancia

Como se ha descrito previamente, los componentes de la leche, como las vitaminas, los minerales y los compuestos bioactivos, juegan un papel importante en el crecimiento, más allá de los macronutrientes que aporta. El consumo de los productos lácteos, y en particular de las proteínas de la leche, ejerce efectos positivos en el crecimiento lineal no solo en los primeros años de vida, sino también en niños mayores, tanto sanos como durante la recuperación de una situación de malnutrición (Hoppe *et al.*, 2006), lo que reafirma la importancia de vigilar el consumo de leche y productos lácteos en la infancia. En 2009, un estudio prospectivo de cohortes de niñas premenárquicas observó que, tras ocho años de seguimiento, las niñas que bebían más de 750 ml de leche al día (tres vasos) desde los diez años hasta la edad adulta tuvieron un aumento neto en la altura adulta de 2.3 cm más que las niñas que bebían menos de 250 ml de leche al día (un vaso) (Berkey *et al.*, 2009). En 2012, un metaanálisis que incluyó 12 estudios clínicos aleatorizados realizados en niños de 3-13 años de distintas razas y culturas, encontró un efecto positivo de la ingesta de productos lácteos en el crecimiento lineal (0.4 cm/año por ración diaria de 245 ml de leche) (De Beer, 2012). Este trabajo concluyó que la leche *per se* podría tener un efecto mayor sobre el crecimiento que otros productos lácteos. Además, otros factores, como tener una menor estatura que la correspondiente a la edad y ser adolescente, también aumentaron el efecto de la leche en la ganancia de talla. Así pues, tanto los estudios observacionales como los experimentales han evidenciado que los productos lácteos afectan positivamente al crecimiento lineal. Este efecto se ha atribuido a la presencia no solo de calcio, sino también de otros minerales, como el zinc o los péptidos bioactivos, que se encuentran asociados a la caseína y en el suero, y al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), presente exclusivamente en la leche y sus derivados (Baró y Plaza-Díaz, 2017).

Biodisponibilidad del calcio en la leche y otros alimentos

La concentración del calcio en los alimentos tiene un amplio rango de valores. La principal fuente de calcio en la dieta es la leche y sus derivados y, en segundo lugar, las verduras de hoja verde, frutas y legumbres. La leche líquida contiene una media de 124 mg/100 g, los quesos contienen más de 1 g de calcio por 100 g de alimento y la mantequilla es el alimento derivado de la leche que presenta un contenido menor de calcio (15 mg/100 g) (Baró y Plaza-Díaz, 2017). Las verduras de hoja verde son una fuente importante de calcio, que aportan 400 mg/100 g de alimento junto con otros nutrimentos esenciales para el adecuado funcionamiento del organismo. Existen diferentes hierbas aromáticas con alto contenido de calcio, tales como la albahaca, el tomillo y el eneldo, así como especias como la canela; sin embargo, éstas se consumen en pocas cantidades y contribuyen poco a satisfacer las IDR. Además, existen alimentos de

origen vegetal, como los frutos secos (almendras, avellanas) y algunas verduras (col rizada y espinacas, entre otras) y leguminosas (alubias) con un alto aporte de calcio, que también son consumidas en pequeñas raciones, por lo que por sí solas no pueden satisfacer las IDR de calcio (Martínez de Victoria, 2016). Asimismo, no debemos olvidar que el agua y los complementos alimenticios también pueden aportar pequeñas cantidades de calcio. Finalmente, en el mercado podemos encontrar algunos alimentos fortificados o enriquecidos con calcio, como la leche y los cereales, cuyo objetivo es lograr un mayor aporte de calcio en la dieta sin modificarla sustancialmente, y sin incrementar la ingesta de otros macronutrientes, ni la ingesta calórica.

Por otro lado, para cubrir las recomendaciones de calcio, no solo se requiere de alimentos que contengan este mineral, sino que, además, el calcio debe estar biodisponible, es decir, que pueda ser absorbido en el intestino y, por lo tanto, ser utilizado para las funciones fisiológicas. La absorción intestinal del calcio dietético puede oscilar entre el 20% y el 75%, dependiendo de la cantidad, de la forma química en la que se encuentre, de la matriz del alimento y de la presencia de otros componentes en el alimento como la lactosa y ciertos aminoácidos que facilitan su absorción; además, la edad del individuo también afecta esta biodisponibilidad (Fardet *et al.*, 2018). Otros agentes que favorecen la absorción de calcio son: la vitamina D (Kaushik *et al.*, 2014), algunas hormonas como los estrógenos y la hormona de crecimiento, así como la actividad física regular, la cual debe tenerse en cuenta al establecer las IDR de este mineral (Weaver *et al.*, 199). Dentro de los factores que limitan la absorción de calcio se pueden mencionar la deficiencia de vitamina D; la presencia de oxalatos, fitatos, fosfatos y grasas no absorbidas, entre otros componentes que forman sales insolubles en la luz intestinal; una inadecuada relación calcio/fósforo en la dieta (la correcta en el adulto es de entre 2/1 y 1/1); el exceso de sodio; y el consumo de café mayor a 90 mg/día (sobre todo en adolescentes) y de otras bebidas con elevado contenido de bases xánticas, que provocan hipercalciuria y aumentan la eliminación fecal de calcio (Kaushik *et al.*, 2014; Baró y Plaza-Díaz, 2017; Fardet *et al.*, 2018).

La leche es una excelente fuente de calcio no solo por la cantidad contenida, sino también porque su composición en nutrientes favorece su absorción, ya que algunos generan sinergia con el calcio y favorecen su absorción. Entre ellos la vitamina D, también presente en este alimento, es necesaria para su absorción intestinal por transporte activo, y la lactosa de la leche también facilita dicha absorción (O'riordan *et al.*, 2014; Karav *et al.*, 2016; Baró y Plaza Díaz, 2017), mientras que los caseína-fosfopéptidos formados por digestión proteolítica de la caseína láctea aumentan la absorción intestinal de calcio al formar complejos solubles. Considerando estos factores de composición, se concluye que los lácteos constituyen una excelente fuente de calcio, con mejor biodisponibilidad que el resto de los alimentos (Kaushik *et al.*, 2014; Fardet *et al.*, 2018). Otros datos ponen de manifiesto las diferencias entre el valor de distintos alimentos vegetales como fuentes de calcio; es decir, mientras que algunos frutos secos son capaces de proporcionar calcio con buena biodisponibilidad, otros alimentos vegetales la dificultan por la presencia de oxalatos que forman oxalatos cálcicos poco solubles y, en consecuencia, poco absorbibles (Weaver *et al.*, 1999).

La dieta también ofrece otros alimentos que contienen calcio en distintas cantidades y con distinta biodisponibilidad. La tabla 20 resume los alimentos que contienen más cantidad de calcio y su fracción absorbible, así como las raciones (los gramos y las calorías contenidas) de dichos alimentos que necesitaríamos ingerir para conseguir el mismo aporte de calcio que nos facilita una ración de leche. Por ejemplo, en una dieta sin consumo de productos lácteos en la que se quisiera cubrir la IDR (1000 mg/día) con frutos secos se requerirían aproximadamente 412 g de almendras tostadas, las cuales nos aportarían 2430 kcal, que además de ser suficientes para cubrir la IDR de energía total en un adulto, que oscila entre 2400 y 3000 kcal/día, nos aportarían 218 g de grasa, lo que supera el 30% de lo recomendado en una dieta equilibrada. Esto generaría un desequilibrio energético que podría aumentar el riesgo de padecer sobrepeso y obesidad (SENC, 2001). Se precisaría un gasto energético adicional de actividad física intensa de cuatro horas para lograr eliminar ese exceso de energía consumida.

Considerando la biodisponibilidad del calcio en cada alimento podemos evidenciar la relevancia de la calidad y cantidad de este elemento. La biodisponibilidad del calcio está determinada por la relación ácido oxálico/calcio, siendo esta especialmente desfavorable en alimentos como el ruibarbo, las espinacas, las patatas y el té. Por ejemplo, las hojas verdes de espinaca contienen calcio menos biodisponible, ya que la presencia de ácido oxálico disminuye su absorción hasta un 5-10% (Weaver *et al.*, 1999; SENC, 2001). Si quisiéramos cubrir la recomendación de calcio (1000 mg/día) solo con este tipo de alimento, un adulto tendría que ingerir aproximadamente 7 kg de espinacas en un día. Por otro lado, las leguminosas, los cereales y las oleaginosas contienen calcio junto con ácido fítico, un éter hexafosfórico del ciclohexanol que forma sales al interactuar con diversos metales. Si el metal es divalente, como el calcio, da lugar a sales insolubles que lo secuestran (un gramo de ácido fítico secuestra un gramo de calcio), lo que provoca la pérdida de calcio por las heces y disminuye su biodisponibilidad. Por estos motivos, resulta realmente difícil alcanzar una ingesta suficiente de calcio a partir de una dieta vegetariana de tipo occidental (Weaver *et al.*, 1999), a no ser que sea diseñada de manera muy específica y se utilicen alimentos enriquecidos o suplementos alimenticios. Por tanto, lo más adecuado es ingerir una dieta equilibrada en la que se incluya la leche, y que permita consumir las IDR tanto de micronutrientes como de macronutrientes requeridos por el organismo. Para el caso de los grupos de población en los que la ingesta de productos lácteos o de alimentos en general es baja, se recomienda la ingesta de productos enriquecidos para evitar carencias, entre los cuales el más adecuado para el caso del calcio es la leche enriquecida, por sus beneficios sobre la biodisponibilidad de este mineral. De hecho, en una revisión sistemática y metaanálisis, en la que se incluyen 20 estudios con 37124 participantes, se demuestra un aumento de fracturas en veganos y pérdida de densidad ósea en vegetarianos en comparación con omnívoros (Iguacel *et al.*, 2019). Este estudio pone de manifiesto la dificultad que entraña alcanzar una absorción de calcio apropiada en base a alimentos vegetales ricos en calcio, sin obtener manifestaciones negativas funcionales.

Tabla 20. Fuentes dietéticas de calcio, proporción absorbible por ración de alimento y raciones equivalentes que aportan la cantidad de calcio absorbido de una ración de leche

Alimento	Ración (g)	Contenido de Ca (mg)	mg de Ca absorbible estimado (% absorbible)	Gramos de alimento que aportan la cantidad de calcio absorbible de una ración de leche (ración equivalente)	kcal por ración equivalente
<i>Leche de vaca</i>					
Entera	250	312,5*	96.3 (32.1%)	250 g (1 ración)	162.5
Entera enriquecida	250	400*	12.4 (32.1%)	187.5 g (0.78 raciones)	162.5
Semidesnatada	250	312.5*	96.3 (32.1%)	250 g (1 ración)	87.75
Semidesnatada enriquecida	250	400*	128.4 (32.1%)	187.5 g (0.78 raciones)	87.75
Desnatada	250	312.5*	96.3 (32,1%)	250 g (1 ración)	66.3
Desnatada enriquecida	250	400*	128.4 (32.1%)	187.5 g (0.78 raciones)	66.3
Queso <i>cheddar</i>	42	303	97.2 (32,1%)	42 g (1 ración)	170
Yogur natural desnatado	240	336	96.3 (32.1%)	240 g (1 ración)	110.4
Tofu con calcio	126	258	80.0 (31,0%)	151 g (1.2 raciones)	179.7
Almendras tostadas	85	206	43.0 (21.0%)	196 g (2.3 raciones)	1156.4
Col rizada	85	61	30.1 (49.3%)	272 g (3.2 raciones)	92.5
Alubia blanca	110	113	24.7 (21.8%)	429 g (3.9 raciones)	1166.8
Brócoli	71	35	21.5 (61.3%)	320 g (4.5 raciones)	83.2
Sésamo	59	89	19.0 (21.0%)	312.7 g (5.3 raciones)	1757.3
Pan integral	28	20	17.0 (82.0%)	162.4 g (5.8 raciones)	407.6
Alubia pinta	86	44	11.9 (26.7%)	696.6 g (8.1 raciones)	330.2
Alubia roja	172	40	9.9 (24.4%)	1668.4 g (9.7 raciones)	660.5
Boniato	164	44	9.8 (22.2%)	1607.2 g (9.8 raciones)	1623.2
Cereal de salvado de trigo	28	20	8 (38.0%)	358.4 g (12.8 raciones)	956.9
Espinacas	85	115	5.9 (5.1%)	1385.5 g (16.3 raciones)	304.8

*Los valores están expresados en mg/250 ml de producto, que equivale a una taza de leche (una porción). Fuente: tabla de composición de alimentos. Ortega *et al.*, 2014.

Composición de bebidas sustitutivas de leche

De forma paralela a la disminución del consumo actual de leche, han surgido otras bebidas vegetales, mal llamadas “leches vegetales”, como sustitutivos de la leche animal, que no son capaces de igualarla en cuanto a composición nutricional, pero que la población ha asumido como tal y ha optado por consumir en lugar de la leche de origen animal. A no ser que sean preparados enriquecidos, estos productos contienen menos cantidad de calcio, pero, además, hay que tener en cuenta que éste se encuentra en una forma menos biodisponible que el presente en la leche de origen animal. De hecho, el consumo de este tipo de productos ha dado lugar a la disminución de la ingesta de calcio y vitamina D y, como consecuencia, al aumento de enfermedades hormonales ocasionadas por la deficiencia de estos micronutrientes (Ismail *et al.*, 2015).

En el caso de estas bebidas vegetales, la gran mayoría del calcio es añadido y no está asociado a proteínas, por lo que su biodisponibilidad es muy inferior. Por otro lado, estas bebidas no siempre están enriquecidas con vitamina D, que facilitaría la absorción del calcio, algo que sí es habitual en la leche, sobre todo en la desnatada y semidesnatada, que normalmente están enriquecidas con esta vitamina a una concentración que oscila entre 0.75 y 1.5 µg/100 ml. Además, tampoco contienen lactosa, otro de los componentes de la leche que favorece la biodisponibilidad del calcio (Ismail *et al.*, 2015). Finalmente, como se ha mencionado anteriormente, algunos vegetales, como las leguminosas, pueden contener fitatos, que disminuyen la biodisponibilidad del calcio y que estarán presentes en esas bebidas vegetales, por lo que no pueden ser equiparables a la leche como fuente dietética de calcio (Israr *et al.*, 2013).

Leches enriquecidas con calcio

Los alimentos enriquecidos son productos en los cuales se modifica la composición mediante la adición de un nutriente o componente no contenido inicialmente en el alimento, o contenido en cantidades menores (Carou y Nogués, 2012). Concretamente, la leche es un excelente vehículo de nutrientes que permite ser enriquecida fácilmente gracias a sus propiedades físico-químicas (FEN, 2017). Como se ha mencionado previamente, es difícil alcanzar las IDR de calcio y vitamina D únicamente con fuentes dietéticas habituales (AESAN, 2014; FEN, 2015), y este déficit es especialmente preocupante en determinados grupos de población en los que las recomendaciones son más altas (Ortega *et al.*, 2012, 2013). En este sentido, una de las propuestas de la industria alimentaria ha sido el enriquecimiento de los alimentos en estos micronutrientes como posible solución a la hora de aportar más calcio en la dieta. De acuerdo a la información procedente del Panel de Consumo Alimentario del Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (Mapama) (MAGRAMA, 2013) y la valoración nutricional que conjuntamente realiza la Fundación Española de Nutrición (FEN) (FEN, 2012) con respecto a la disponibilidad y el consumo de alimentos en la población española, los productos lácteos son los que representan el mayor porcentaje de alimentos enriquecidos en calcio y vitamina D tanto en el mercado

español como en el mercado internacional. La tabla 21 incluye la cantidad de calcio y vitamina D aportada por las principales leches enriquecidas del mercado español. La tabla 22 compara la contribución (%) a la ingesta diaria de calcio por ración de leche de vaca semidesnatada y de leche semidesnatada enriquecida a las IDR de calcio por edades y según autores. Estos productos proporcionan un efecto beneficioso para la salud, intentando mantener una dieta equilibrada, saludable y preventiva y adaptándose a las necesidades de la sociedad actual, por lo que podrían ser consideradas como un alimento funcional (López-Huertas *et al.*, 2006; Vidal Carou y Veciana Nogués, 2012; Ortega *et al.*, 2012; 2013; FEN, 2017). En la actualidad, en la mayoría de los casos, el calcio adicionado a las leches enriquecidas es de origen lácteo, lo que se conoce como “calcio natural”, que facilita una absorción más adecuada de este mineral y, por tanto, un mayor efecto sobre la salud. A pesar de que todas estas leches están enriquecidas con calcio y vitamina D, se aprecian grandes variaciones en las cantidades añadidas (Tabla 21). Además, es interesante indicar que no todas las formas de enriquecer la leche permiten la misma biodisponibilidad de este mineral.

Tabla 21. Aporte de calcio y vitamina D por ración de 250 ml de las distintas leches semidesnatadas y desnatadas enriquecidas con calcio más consumidas en España

Marca	Leche semidesnatada enriquecida		Leche desnatada enriquecida	
	Calcio (mg/250ml)	Vitamina D (μ g/250 ml)	Calcio (mg/250 ml)	Vitamina D (μ g/250 ml)
Asturiana	400	2.5	400	2.5
Auchan (Alcampo)	400	nd	400	nd
Buen Pastor	400	nd	400	nd
Carrefour	400	1.87	400	1.87
Covap	400	1.87	400	1.87
DÍA	400	1.87	275	2
El Corte Inglés	400	2	275	2
Gaza	400	1.87	300	nd
Hacendado	400	1.87	275	1.87
Kaiku	400	1.87	275	1.87
Leyma	375	nd	nd	nd
Milbona (Lidl)	375	1.87	400	1.87
Milsani (Aldi)	300	nd	nd	nd
Pascual	400	2	400	2
Puleva	450	3.75	450	3.75

nd: no declarado.

Tabla 22. Comparativa de la contribución (%) a la ingesta diaria de calcio por ración de leche de vaca semidesnatada y de leche semidesnatada enriquecida a las IDR de calcio por edades y autores

IDR (Moreiras y cols., 2016)			IDR (EFSA, 2016)		
Edad	Leche clásica	Leche enriquecida	Edad	Leche clásica	Leche enriquecida
Niños y niñas					
0-6 meses	78.1%	100%			
7-12 meses	59.5%	76.19%	7-11 meses	69.4%	88.8%
2-3	52%	66.6%	1-3	39.06%	50%
4-5	64%	57.14%	4-10	39.06%	50%
6-9	39%	50%			
Hombres					
10-12	24.03%	30.76%			
13-15	24.03%	30.76%			
16-19	24.03%	30.76%	18-24 años	31.25%	40%
20-39	31.25%	40%	≥ 25 años	32.8%	42.10%
40-49	31.25%	40%			
50-59	31.25%	40%			
60 y más	31.25%	40%			
Mujeres					
10-12	24.03%	30.76%			
13-15	24.03%	30.76%			
16-19	24.03%	30.76%	18-24 años*	31.25%	40%
20-39	31.25%	40%	≥ 25 años*	32.8%	42.10%
40-49	31.25%	40%			
50-59	26.04%	33.33%			
≥ 60	26.04%	33.33%			
Embarazo (2. ^a mitad)	26.04%	30.76%	Embarazo	31.25%	40%
Lactancia	26.04%	30.76%	Lactancia	31.25%	40%

*Incluye embarazo y lactancia; se asume una síntesis cutánea mínima de vitamina D. Fuente: adaptado de EFSA, 2012; EFSA, 2015; EFSA, 2016.

Hasta la fecha, se han realizado diversos estudios para evaluar el efecto del enriquecimiento de calcio y vitamina D en diferentes grupos poblacionales. En primer lugar, se evaluó la absorción del calcio de una leche control (semidesnatada) comparándola con distintas leches enriquecidas con calcio en adultos. Este estudio comparó una leche enriquecida con calcio procedente de sólidos lácteos y fosfato tricálcico, una leche enriquecida con calcio procedente de leche concentrada, una leche semidesnatada a la que se le añadieron fructooligosacáridos y una leche semidesnatada a la que se le añadieron fosfopéptidos de caseína. Los resultados mostraron una mayor absorción de calcio en la leche enriquecida con fosfato tricálcico en comparación con el grupo control, mientras que la adición de fructooligosacáridos y caseína-fosfopéptidos no influyó significativamente en la absorción de este mineral (López-Huertas *et al.*, 2006).

En 2016, Whiting *et al.* revisaron los resultados de los 15 estudios realizados hasta ese momento para evaluar el impacto del consumo de alimentos fortificados y sus posibles efectos beneficiosos sobre la salud ósea (Whiting *et al.*, 2016). La mayoría de los estudios utilizan como alimentos fortificados leche o derivados lácteos, que se consideran la mejor vía de administración de calcio. Estos autores encontraron evidencias que demuestran que la fortificación con calcio y vitamina D mejora sustancialmente el recambio óseo, aumentando la densidad y la fuerza de los huesos en adultos mayores y en mujeres posmenopáusicas, mientras que el efecto no resultaba significativo en adultos menores de 50 años. Además, el enriquecimiento con otros nutrientes no provocaba los mismos efectos beneficiosos. Estos efectos pueden interpretarse como beneficiosos para la prevención de osteoporosis y fracturas ocasionadas por el aumento de la fragilidad durante el envejecimiento. Sin embargo, dada la disparidad en cuanto a los diseños experimentales, se necesitan más estudios para examinar los efectos de la adición de calcio y vitamina D para la salud ósea (Whiting *et al.*, 2016).

Posteriormente, el estudio EFICALCIO ha evaluado el efecto del consumo diario de 500 ml de leche enriquecida en calcio y vitamina D con o sin fructooligosacáridos durante un año y su efecto sobre las concentraciones plasmáticas de vitamina D, parámetros óseos y riesgo metabólico y cardiovascular en mujeres posmenopáusicas sanas. Este estudio concluyó que la intervención nutricional con dos vasos de leche enriquecida con 1800 mg/l de calcio y 1200 UI/l de vitamina D₃ mejora las concentraciones plasmáticas de vitamina D e induce cambios favorables en la masa ósea, en el perfil lipídico y en la homeostasis de la glucosa (Reyes-García *et al.*, 2018).

Por lo tanto, las investigaciones realizadas hasta la fecha demuestran los beneficios de la suplementación con leche enriquecida en grupos de población vulnerables, como las personas mayores y mujeres posmenopáusicas, ya que, como se ha mencionado anteriormente, la deficiencia de calcio puede traer consigo diversas consecuencias para la salud. Sin embargo, es necesario realizar más estudios en este campo que incluyan a otros grupos poblacionales y otras patologías asociadas a la deficiencia de calcio para demostrar la importancia de incorporar productos lácteos enriquecidos en calcio y vitamina D en personas con bajas ingestas de estos alimentos.

Alteraciones ocasionadas por la ingesta de leche. Mitos y realidades

A pesar del gran volumen y calidad de estudios científicos que avalan los beneficios para la salud del consumo de leche y derivados lácteos, la gran controversia que existe actualmente sobre los efectos negativos del consumo de leche de vaca se basa en que cada vez más personas afirman que el cuerpo humano no está diseñado para manejar una dieta con un alto contenido de calcio, que no hay una adaptación fisiológica para el consumo de leche de vaca y que, además, somos los únicos mamíferos que continuamos consumiendo leche después del destete. Estos argumentos pierden todo su valor al considerar que la dieta actual está compuesta por alimentos que, en su mayoría, los antepasados prehistóricos desconocían y que, además, ningún otro animal aprendió a domesticar y ordeñar a las vacas. La incorporación de la leche de vaca en la dieta humana ha permitido, junto con otros factores, como el desarrollo de medicamentos, mejorar la calidad y la esperanza de vida, y no existe evidencia científica que valide la eliminación de un alimento ampliamente consumido como es la leche de vaca, principalmente en los grupos vulnerables como los niños, adolescentes, personas mayores y mujeres en climaterio.

Recientemente, se han publicado dos estudios que comparan la ingesta de nutrientes en personas vegetarianas y no vegetarianas (Davey *et al.*, 2003; Rizzo *et al.*, 2013), aunque los resultados no son del todo coincidentes. Dentro del estudio Investigación Europea sobre el Cáncer y la Nutrición (Estudio EPIC), se examinó la ingesta de 33883 individuos carnívoros, 10110 individuos que comían pescado, 18840 vegetarianos y 2596 veganos en el Reino Unido. Este estudio concluye que los individuos veganos tuvieron la ingesta más alta de vitamina C y magnesio y más baja de vitamina B₁₂, vitamina D, calcio y zinc (Davey *et al.*, 2003). El segundo estudio comparó la ingesta de nutrientes de diferentes grupos de adultos de Estados Unidos y Canadá e incluyó 33634 carnívoros, 21799 lactoovovegetarianos y 5694 veganos. El estudio concluyó que la ingesta de nutrientes no solo está definida por el patrón alimentario, sino también por el lugar de origen y varía mucho entre distintos grupos de población, y observó que los lactoovovegetarianos no tienen déficit de vitamina D; sin embargo, los veganos sí tuvieron una ingesta significativamente menor de vitamina D (Rizzo *et al.*, 2013), lo que puede conducir a una carencia. De hecho, a pesar de que los factores dietéticos y la concienciación de muchos vegetarianos a llevar un estilo de vida activo puede promover la salud ósea, hay evidencia de que el vegetarianismo está asociado con varios factores que pueden tener un impacto perjudicial sobre la salud ósea, es decir, un IMC menor (Spencer *et al.*, 2003) y una ingesta potencialmente baja de vitamina B₁₂ (Pawlak *et al.*, 2013), calcio (Davey *et al.*, 2003; Spencer *et al.*, 2003) y vitamina D (Chan *et al.*, 2009; Crowe *et al.*, 2011; Appleby y Key, 2016). Por tanto, es importante considerar las posibles deficiencias que podrían ocasionar este tipo de dietas en la población y las posibles complicaciones de la salud asociadas.

La composición de la leche es muy compleja y contiene moléculas inmunológicamente activas, oligosacáridos, metabolitos y vitaminas, así como una microbiota asociada. Algunos estudios sugieren que

la modulación de la composición de la leche tiene potencial para prevenir enfermedades alérgicas, aunque también puede ser causa del desarrollo de las mismas (Visioli y Strata, 2014). Una de estas es la intolerancia a la lactosa, originada por la falta de producción de la enzima lactasa secretada por el intestino delgado, y se traduce en una insuficiente capacidad para digerir la lactosa (Pal *et al.*, 2015). La lactosa es el principal carbohidrato en la leche humana de los mamíferos y requiere de su hidrólisis enzimática por lactasa antes que pueda ser absorbida como D-glucosa y D-galactosa. En muchas poblaciones donde la dieta no incluye lácteos, los niveles de lactasa disminuyen después del destete. La intolerancia a la lactosa afecta al 70% de la población adulta, no obstante, este valor disminuye dependiendo de cada población concreta (Pal *et al.*, 2015). En las zonas geográficas en las que tradicionalmente la ingesta de leche es mayor, predominan los genotipos de la lactasa que facilitan su digestión, mientras que en las zonas donde la leche no forma parte de la dieta de manera habitual, predominan las variantes génicas que codifican una enzima poco eficaz y predisponen a la intolerancia (Szilagyi *et al.*, 2016). Este problema provoca una serie de síntomas gastrointestinales como dolor abdominal y diarrea, entre otros, que también son característicos de otras patologías, lo que puede llegar a confundir y a que no se identifique correctamente. Esta confusión ha dado lugar a que muchas personas “mal informadas” se autodiagnostiquen, y dejen de consumir leche o consuman leche sin lactosa sin un motivo adecuado. Recientemente, se ha puesto de manifiesto que algunas intolerancias no se deben ni al gluten ni a la lactosa, sino a otras moléculas como los fructanos (Skodje *et al.*, 2017). Otro problema añadido es que los sujetos sin intolerancia que dejan de consumir leche podrían desarrollar este problema al no persistir el estímulo y disminuir la expresión de los genes codificadores de la enzima (Szilagyi *et al.*, 2016). Además, se ha demostrado que sujetos con intolerancia podrían consumir hasta 100 ml de leche sin desarrollar síntomas de la enfermedad (Pal *et al.*, 2015). En este tipo de personas las leches enriquecidas son importantes, ya que podrían aportarles más cantidad de calcio y vitamina D y contribuir a su buen estado de salud ósea. De hecho, la ingesta de 100 ml de estas leches les aportaría 160 mg de calcio (o más, en algunos casos), sin llegar a ocasionarles ninguna sintomatología. Asimismo, hay que mencionar que actualmente existen en el mercado lácteos sin lactosa enriquecidos en calcio para aquellos que presenten intolerancia total.

Un tema de constante discusión en la actualidad es la creencia de que el consumo de leche aumenta el riesgo de sufrir cáncer. En este sentido, los investigadores de la American Cancer Society realizaron un análisis de los datos obtenidos en una cohorte y observaron que una mayor ingesta de calcio, vitamina D y productos lácteos se asociaba con una menor incidencia de cáncer colorrectal (Yang *et al.*, 2014). Es de destacar que los pacientes en el cuartil más alto de la ingesta total de calcio en este análisis tenían más probabilidades de tener un IMC normal, ser más activos físicamente, consumir menos calorías, y comer más frutas y verduras, alimentos ricos en folato, granos integrales y menos carne roja y procesada. Este estudio concluye que no debemos dejar de considerar siempre la dieta equilibrada y completa como aquella que incluye productos lácteos, como se ha venido recomendando (Yang *et al.*, 2014).

Conclusión

La leche y sus derivados son alimentos insustituibles dentro de una dieta equilibrada, ya que nos aportan micronutrientes, como el calcio y la vitamina D, que no están presentes en otros alimentos en las cantidades y con la biodisponibilidad necesarias para poder satisfacer los requerimientos nutricionales que nos debe aportar una dieta equilibrada. Los productos lácteos enriquecidos permiten aumentar la ingesta de estos micronutrientes con una alta biodisponibilidad, sin necesidad de modificar la dieta, lo que resulta beneficioso para el mantenimiento de la salud.

CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones

Sección I. Estudio Experimental: Beneficios de la Dieta Mediterránea sobre los factores de riesgo cardiovascular

Tras el análisis del estudio, se observa que la ingesta durante 6 semanas de dieta mediterránea, suplementada o no con antioxidantes característicos de esta dieta, y sin modificación de cambios en los estilos de vida no provoca efectos positivos sobre la prevención de las ECV. No obstante, observamos cierta tendencia en la mejora de parámetros claves como IMC y presión arterial cuando se normaliza la dieta lo que no se constata con la suplementación de antioxidantes. Evidenciando que la normalización de la dieta es la mejor opción. Por lo tanto, se requieren más estudios que evalúen el efecto de una dieta mediterránea acompañada de un estilo de vida mediterráneo para poder establecer los beneficios reales y cuáles son los parámetros más importantes que contribuyen a dichos beneficios.

Sección II. Toxicidad oral aguda/subaguda y subcrónica de un extracto de aceite de oliva virgen rico en hidroxitirosol

La administración oral de un extracto de aceite de oliva virgen que contiene un 15% de hidroxitirosol no indujo efectos que puedan considerarse de relevancia toxicológica en ensayo agudo, subagudo y subcrónico en un modelo murino. En consecuencia, después de confirmar la amplia evidencia científica sobre los beneficios del hidroxitirosol, se confirma que puede ser un compuesto clave en el manejo de diversas enfermedades crónicas. Además de acuerdo a las acciones y propiedades que tiene este compuesto, actualmente está aceptado como novel food.

Sección III. Efecto del consumo de Ácido ursólico en la reducción de la grasa y la hipertrofia muscular en humanos

En conclusión, nuestros resultados muestran que la suplementación durante 12 semanas, con 35 g/d de ácido ursólico procedente de un extracto de piel de manzana y vehiculizado en un fiambre de pechuga de pollo, acompañada de actividad física dos veces a la semana, no ejerce ningún efecto sobre el peso y la composición corporal, ni en la fuerza y resistencia muscular, en humanos sanos.

Sección IV. Evaluación de la composición fitoquímica y nutricional de la semilla de chía oscura (*Salvia Hispánica*)

Nuestros hallazgos indican que las semillas de chía son ricas en fibra dietética y oligosacáridos, ácidos linolénicos poliinsaturados omega-3, proteínas de alta calidad que contienen L-fenilalanina y L-triptófano. También son una buena fuente de antioxidantes, en particular polifenoles. Además, la variedad específica de chía oscura de Jalisco contiene también nucleósidos: adenosina, guanosina y uridina, mejorando su valor nutricional. Por tanto, es el conjunto de sus nutrientes y compuestos bioactivos el que determina su estatus como alimento funcional.

Sección V. Leche y productos lácteos como vehículos de calcio y vitamina D: papel de las leches enriquecidas

La leche y sus derivados son alimentos insustituibles en una dieta equilibrada, ya que aportan micronutrientes, como el calcio y la vitamina D, que no están presentes en otros alimentos en las cantidades y con la biodisponibilidad necesarias para satisfacer las necesidades nutricionales de una dieta equilibrada. Los productos lácteos enriquecidos permiten aumentar la ingesta de estos micronutrientes con una alta biodisponibilidad, sin necesidad de modificar la dieta, lo que es beneficioso para mantener la salud.

CONCLUSIÓN GENERAL

Los resultados de la presente Tesis Doctoral confirman:

1. La dieta rica en alimentos es la estrategia más eficiente para normalizar alteraciones cardiometabólicas.
2. La ausencia de toxicidad del hidroxitirosol
3. La ausencia de efectos de los antioxidantes (ácido ursólico y concentrado de vegetales deshidratados) fuera de su matriz alimentaria
4. Se confirma que la chía es un alimento funcional por el conjunto de nutrientes y compuestos bioactivos que contiene
5. La leche sigue siendo el alimento clave para que la población española alcance ingestas recomendadas de calcio y Vitamina D

Los resultados de nuestra tesis confirman que la dieta variada y equilibrada en alimentos es la estrategia más eficiente para normalizar alteraciones cardiometabólicas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

La realización de esta tesis doctoral no habría sido posible sin la colaboración y el trabajo de mis directores de tesis, el **Dr. Jesús Rodríguez Huertas**. GRACIAS Dr. Jesús por confiar en mí y brindarme la oportunidad de seguir superándome. Aún recuerdo cuando lo conocí por primera vez en México, gracias por brindarme una nueva perspectiva, por compartir su pasión por la ciencia y por cautivarnos con ser grandes profesionales como lo es usted. Gracias por esa disposición de ayudar y por brindarle a todo el mundo la oportunidad de demostrar lo que vale y por procurar mi crecimiento académico y formativo. Más allá de lo profesional, me ha acogido como una hija y siempre he encontrado cariño, amistad y asertividad en usted. El Dr. Jesús es un científico excelente, docente y comunicador, creo que me quedo corta con este párrafo, solo quiero decirle desde lo más profundo de mi corazón: GRACIAS y espero que siga en mi vida como profesional, como amigo y como mi familia.

Quiero agradecer a un pilar fundamental de esta investigación, una persona que no sólo se ha convertido en mi maestra sino también en mi confidente, en mi apoyo y sin cuya colaboración este trabajo no se hubiera logrado. Gracias **Dra. MD** por inculcar en mí un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico, por ser un ejemplo a seguir y por su compromiso de trabajo, el cual me hace sentir en deuda por todo lo recibido durante el período de tiempo que ha durado la elaboración de mi tesis, mi más profunda lealtad y admiración. Gracias por enseñarme ese buen criterio que la caracteriza, por su simpatía y porque siempre encontré dulzura, sonrisas, un consejo y la mejor actitud ante cualquier adversidad, gracias por todo el tiempo invertido, por esas largas horas en su despacho, por la paciencia, no tengo palabras para expresar todo el cariño y agradecimiento que siento. Sus consejos me acompañaran durante toda la vida y espero algún día poder llegar a ser como usted.

Agradezco a la **Universidad de Granada** y al **Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Matáix Verdú”** por darme la oportunidad de continuar superándome y a todos los participantes de los diferentes estudios que confiaron en nosotros para llevar a cabo esta investigación.

Al **Dr. Emilio Martínez de Victoria** y al **Dr. Mariano Mañas Almendros** por la elaboración y participación en el diseño de los menús utilizados en el estudio del Efecto de Dieta Mediterránea. sobre los factores de riesgo cardiovascular.

Agradezco a todos mis compañeros, por los momentos regalados. **Alejandra** por ser mi compatriota, mi paño de lágrimas, por ayudarme siempre que lo he necesitado, por compartir momentos de alegría, de amistad y también de fatiga, frustración, gracias por hacer más llevadero este camino. Gracias a **Marta** porque a pesar de que lleva poco tiempo se ha convertido en una amiga, confidente y una persona que admiro por esa cualidad de ver la vida sin tantas complicaciones, gracias por quedarte conmigo hasta tarde, por tu ayuda, espero que hayas llegado a mi vida para quedarte. Gracias a **Caro** porque en un inicio fue mi codirectora y aunque no pudimos trabajar juntas, ojalá que en futuro podamos hacer alguna colaboración

porque mi pasión por la microbiota seguirá persistiendo. Gracias **Mari Cruz** por tus consejos, por tu alegría y por contagiarnos siempre de la mejor de las energías. Gracias a **Anabel** por confiar en mí para colaborar juntas, por tu solidaridad y por estar ahí siempre. Gracias a **Julio** porque además de ser un científico excepcional es un amigo, consejero y la única persona que conozco en el mundo que no tiene un no por respuesta y que tiene una solución para cualquier problema. Gracias a **Rafa** por su disposición para trabajar y para ayudar, a **Fran, Sensi** y a todos y cada una de las personas que forman parte del INYTA por la amistad brindada a lo largo de estos años.

Fuera del ámbito profesional, agradezco a **Emilio** por ser una de las personas más importantes en mi vida, porque es la que realmente me conoce y me comprende, porque siempre ha estado apoyándome en esta ardua tarea. Ha sido una suerte haber coincidido, creo que sin él no lo hubiera logrado, eres mi inspiración y mi fuerza. Eres mi mayor crítico, mi diseñador gráfico, mi editor, mi confidente, mi alegría. Gracias por hacer mi vida más sencilla y por hacerme tan feliz, por creer en mí incondicionalmente y por regalarme tantas sonrisas. Mil veces gracias.

Gracias a mis padres, por enseñarme lo que han recogido a su paso por la vida y por darme la libertad de elegir mi futuro, por brindarme con las manos abiertas su apoyo y su confianza en mi preparación. Gracias a mi **padre** por inculcarme un pensamiento crítico, por los interminables mapas conceptuales, por los paseos por el parque para desconectar, por componerme canciones y por ser mi mejor maestro de vida. Gracias a mi **madre** porque soy lo que soy gracias a ella, por su sacrificio por su amor incondicional y porque a pesar de la distancia siempre está presente. Gracias a los dos por darme todas las condiciones para desarrollar mis sueños y metas, por inculcarme la importancia del esfuerzo y de la educación. Son para mis ojos, los mejores padres del mundo. A mis **hermanos** y **sobrinos** por contribuir en este largo camino que es la vida. Gracias por apoyarme y animarme en todas mis decisiones. Por estar ahí, por ser un ejemplo y por tanto amor. A **Leti, Emilio y Guille** por acogerme como una más, por abrirme su corazón y por todo el cariño recibido a lo largo de mi permanencia en este país. Gracias por dejarme formar parte de sus vidas.

REFERENCIAS

Referencias

- Wójcik, A., Różyło, M., & Ocimum, R. (2019). Tenuiflorum seeds and salvia hispanica seeds: mineral and amino acid composition, physical properties, and use in gluten-free bread. *CyTA—J. Food*, *17*, 804–813.
- Abdel-Karim, M, López-Villodres, J. A., De La Cruz, J. P., Rodríguez-Pérez, M. D., Reyes, J. J., Guzmán-Moscoso, R., Rodríguez-Gutiérrez, G., Fernández-Bolaños, J., González-Correa, J. A. (2016). Effects of hydroxytyrosol on cardiovascular biomarkers in experimental diabetes mellitus. *J Nutr Biochem*, *37*, 94-100. 10.1016/j.jnutbio.2016.07.015.
- Abedi, E., Sahari, & M. A. (2014). Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food Science & Nutrition*, *2*(5), 443-463. 10.1002/fsn3.121
- ADA Reports. (1995). Position of the American Dietetic Association: phytochemicals and functional foods. *J Am Diet Assoc*, *95*(4), 493-6. 10.1016/s0002-8223(95)00130-1.
- Adadi, P., Barakova, N. V., Muravyov, K. Y., & Krivoschapkina, E. F. (2019). Designing selenium functional foods and beverages: a review. *Food Res. Int*, *120*, 708–25. 10.1016/j.foodres.2018.11.029
- Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Evaluación nutricional de la dieta española II. Micronutrientes. (2014). Sobre datos de la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE).
- Ai, C. B., & Li, L. N. (1992). Salvianolic acids D and E: Two new depsides from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med*, *58*, 197–199.
- Al Fazazi, S., Casuso, R. A., Aragón-Vela, J., Casals, C., & Huertas, J. R. (2018). Effects of hydroxytyrosol dose on the redox status of exercised rats: the role of hydroxytyrosol in exercise performance. *J Int Soc Sports Nutr*, *15*(20). 10.1186/s12970-018-0221-3.
- Al-Ghamdim, S. (2018). The association between olive oil consumption and primary prevention of cardiovascular diseases. *J. Fam. Med. Prim. Care*, *7*, 859–864. 10.4103/jfmpc.jfmpc_191_18
- Alghadir, A. H., Gabr, S. A., & Al-Eisa, E. (2015). Physical activity and lifestyle effects on bone mineral density among young adults: sociodemographic and biochemical analysis. *J Phys Ther Sci*, *27*, 2261-70.
- Ali, M. N., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Beh, B. K., Tan, S. W., & Tan, S. G. (2015). The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *J Biom Biotechnol*, *171956*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23251075>
- Amato, M., Caruso, M. C., Guzzo, F., Galgano, F., Commisso, M., Bochicchio, R., Labella, R., & Favati, F. (2015). Nutritional quality of seeds and leaf metabolites of Chia (*Salvia hispanica* L.) from Southern Italy. *Eur. Food Res. Technol*, *241*, 615–625.
- Amrein, K., Scherkl, M., Hoffmann, M., Neuwersch-Sommeregger, S., Köstenberger, M., Tmava Berisha, A., Martucci, G., Pilz, S., & Malle, O. (2020). Vitamin D deficiency 2.0: an update on the current status worldwide. *Eur J Clin Nutr*, *74*(11):1498-1513. 10.1038/s41430-020-0558-y.
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., & Montedoro, G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *J. Chromatogr. A*, *1054*(1–2), 17–31. 10.1016/j.chroma.2004.07.093
- Appleby, P., & Key, T. (2016). The long-term health of vegetarians and vegans. *Proc Nutr Soc*, *75*(3), 287-93.
- Asghari, E., Rashidlamir, A., Hosseini, S. R. A., Moazzami, M., Samarghandian, S., Farkhondeh, T. (2020). Synergism effects of ursolic acid supplementation on the levels of irisin, C-reactive protein, IL-6, and TNF-alpha during high-intensity resistance training in low activity men. *Cardiovasc Haematol Disord - Drug Targets*, *20*, 138e44.
- Ashwell, M. (2002). Concepts of functional foods. ILSI Europe concise monograph series. Brussels: ILSI Europe. <https://ilsi.eu/publication/concepts-of-functional-foods/>
- Assmann, G., Buono, P., Daniele, A., Della Valle, E., Farinero, E, et al. (2014). Functional foods and cardiometabolic diseases. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis*. *24*, 1272–300. 10.1016/j.numecd.2014.10.010
- Astrup, A. (2014). Yogurt and dairy product consumption to prevent cardiometabolic diseases: epidemiologic and experimental studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *99*(5), 1235S-1242S.
- Auñon-Calles, D., Canut, L., & Visioli, F. (2013). Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food Chem. Toxicol*, *55*, 498–504.
- Avenell, A., Mak, J. C. S., & O'Connell, D. (2014). Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures in postmenopausal women and older men. *Cochrane Database of Syst Rev*, *4*(CD000227). 10.1002/14651858.CD000227.pub4
- Ayerza, R. (1995). Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *72*(9), 1079-1081. 10.1007/BF02660727
- Ayerza, R. H., & Coates, W. (2004). Composition of chia (*Salvia hispánica*) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. *Tropical Science*, *44*(3), 131-135. 10.1002/ts.154
- Ayerza, R. (2009). The seed's protein and oil content, fatty acid composition, and growing cycle length of a single genotype of chia (*Salvia hispanica* L.) as affected by environmental factors. *J. Oleo Sci*, *58*, 347–354.

- Ayerza, R., & Coates, W. (2001). *Chia seeds: New source of omega-3 fatty acids, natural antioxidants and dietetic fiber*. AZ, USA: Southwest Center for Natural Products Research & Commercialization Office of Arid Lands Studies, The University of Arizona.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2005). Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutr. Res*, 25, 995–1003.
- Ayerza, R., Coates, W., & Lauria, M. (2002). Chia seed (*Salvia hispanica* L.) as an omega-3 fatty acid source for broilers: Influence on fatty acid composition, cholesterol and fat content of white and dark meats, growth performance, and sensory characteristics. *Poult. Sci*, 81, 826–837
- Bakaloudi, D. R., Chrysoula, L., Leonida, I., Kotzakioulafi, E., & Theodoridis, X., (2021). Chourdaki, M. Impact of the level of adherence to the Mediterranean Diet on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Clin Nutr*, 40(12), 5771-5780. 10.1016/j.clnu.2021.10.002.
- Bakhtiari, N., Hosseinkhani, S., Soleimani, M., Hemmati, R., Noori-Zadeh, A., Javan, M., & Tashakor, A. (2016). Short-term ursolic acid promotes skeletal muscle rejuvenation through enhancing of SIRT1 expression and satellite cells proliferation. *Biomed Pharmacother*, 78, 185-196. 10.1016/j.biopha.2016.01.010.
- Bakhtiari, N., Hosseinkhani, S., Tashakor, A., (2015). Hemmati, R. Ursolic acid ameliorates aging-metabolic phenotype through promoting of skeletal muscle rejuvenation. *Med Hypotheses*, 85, 1–6.
- Baltasar, F., & de las Nieves, M. (2014). Influencia del estado de madurez del fruto sobre parámetros de calidad, compuestos fenólicos y propiedades antioxidantes de aceites de oliva vírgenes extremeños. Aprovechamiento de subproductos de almazara. <http://hdl.handle.net/10662/1361>
- Bang, H. S., Seo, D. Y., Chung, Y. M., Kim, D. H., Lee, S. J., Lee, S. R., Kwak, H. B., Kim, T. N., Kim, M., Oh, K. M., Son, Y. J., Kim, S., & Han, J. (2017). Ursolic acid supplementation decreases markers of skeletal muscle damage during resistance training in resistance-trained men: a pilot study. *Korean J Physiol Pharmacol*, 21(6), 651-656. 10.4196/kjpp.2017.21.6.651.
- Bang, H. S., Seo, D. Y., & Chung, M. (2014). Ursolic acid-induced elevation of serum irisin augments muscle strength during resistance training in men. *Korean J Physiol Pharmacol*, 18, 441–446.
- Barber, T. M., Kabisch, S., Pfeiffer, A. F., & Weickert, M. O. (2020). The health benefits of dietary fibre. *Nutrients*, 12, 3209.
- Barbosa, K. B. F., Bressan, J., Zulet, M. A., & Martínez, J. A. (2008). Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 31(3), 259-280.
- Baró, L., Lara, F., & Plaza-Díaz, J. (2017). Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Lácteos y derivados lácteos. En: Gil Hernández A, ed. *Tratado de nutrición* (Tomo III). 3ª ed. (pp. 28-32). Madrid: Médica Panamericana.
- Barrio-López et al. (2019). J. Pre-proof Prev, S0002-8703(19)30291-1 doi: 10.1016/j.a.
- Basterra-Gortari, F. J., Ruiz-Canela, M., Martínez-González, M. A., Babio, N., Sorlí, J. V., Fito, M., ... & Arós, F. (2019). Effects of a Mediterranean eating plan on the need for glucose-lowering medications in participants with type 2 diabetes: A subgroup analysis of the PREDIMED trial. *Diabetes Care*, 42(8), 1390-1397. 10.2337/dc18-2475
- Beltrán-Orozco, M.C., Martínez-Olguín, A., & Robles-Ramírez, M.C. (2020). Changes in the nutritional composition and antioxidant capacity of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) during germination process. *Food Sci. Biotechnol*, 29, 751–757.
- Berkey, C. S., Colditz, G. A., Rockett, H. R., Frazier, A. L., & Willett, W. C. (2009). Dairy consumption and female height growth: prospective cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18, 1881-7.
- Bermejo López, L. M., Aparicio, A., Loria Kohen, V., López-Sobaler, A. M., & Ortega, R. M. (2021). Importancia de la nutrición en la defensa inmunitaria. Papel de la leche y sus componentes naturales. *Nutrición Hospitalaria*, 38(SPE2), 17-22.
- Berrougui, H., Ikhlef, S., & Khalil, A. (2015). Extra Virgin Olive Oil Polyphenols Promote Cholesterol Efflux and Improve HDL Functionality. Evidence-based Complement. *Altern. Med*. 10.1155/2015/208062
- Blanco-Metzler, A., Tovar, J., & Fernández-Piedra, M. (2004). Caracterización nutricional de los carbohidratos y composición centesimal de raíces y tubérculos tropicales cocidos, cultivados en Costa Rica. *Arch. Latinoam. Nutr*, 54, 322–327.
- Boehm, G., Lidestri, M., Casetta, P., Jelinek, J., Negretti, F., Stahl, B., & Marini, (2002). A. Supplementation of a bovine milk formula with an oligosaccharide mixture increases counts of faecal bifidobacteria in preterm infants. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed*, 86, F178–F181.
- Bogue, J., Collins, O., & Troy, A. J. (2017). Market analysis and concept development of functional foods. *Dev. New Funct. Food Nutraceutical Prod*, 29–45. 10.1016/B978-0-12-802780-6.00002-X
- Bonat Celli, G., & Abbaspourrad, A. (2018). Tailoring delivery system functionality using microfluidics. *Annu. Rev. Food. Sci. Technol*, 9, 481–501. 10.1146/annurev-food-030117-012545
- Bondia Pons, I. (2007). *Estudio del perfil de ácidos grasos en la evaluación de la dieta mediterránea como patrón de dieta saludable en poblaciones europeas*. Universitat de Barcelona. <http://hdl.handle.net/2445/42498>
- Borg, G. A. (1982). Psychophysical bases of perceived exertion. *Medicine & science in sports & exercise*.

- Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P. et al. (2012). A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, *481*, 463–468. 10.1038/nature10777
- Boucher, J., Mori, M. A., Lee, K. Y., Smyth, G., Liew, C. W., Macotela, Y., Rourk, M., Blüher, M., Russell, S. J., & Kahn, C. R. (2012). Impaired thermogenesis and adipose tissue development in mice with fat-specific disruption of insulin and IGF-1 signalling. *Nat Commun* *3*, 902. 10.1038/ncomms1905.
- Bowen, K. J., Sullivan, V. K., Kris-Etherton, P. M., & Petersen, K. S. (2018). Nutrition and cardiovascular disease—an update. *Current atherosclerosis reports*, *20*(2), 1–11. 10.1007/s11883-018-0704-3
- Bresson, J. L., Flynn, A., Heinonen, M., Hulshof, K., Korhonen, H., Lagiou, P., et al. (2008). Calcium and vitamin D and bone strength. *EFSA J*, *8*(28), 1–13.
- Budek, A. Z., Hoppe, C., Michaelsen, K. F., & Mølgaard, C. (2007). High intake of milk, but not meat, decreases bone turnover in prepubertal boys after 7 days. *Eur J Clin Nutr*, *61*, 957–62.
- Buil-Cosiales, P., Zazpe, I., Toledo, E., Corella, D., Salas-Salvado, J., Diez-Espino, J., ... & Martínez-González, M. Á. (2014). Fiber intake and all-cause mortality in the Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED) study. *The American journal of clinical nutrition*, *100*(6), 1498–1507.
- Bull, F. C., Al-Ansari, S. S., Biddle, S., Borodulin, K., Buman, M. P., Cardon, G., et al. (2020). World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour. *Br J Sports Med*, *54*, 1451e62.
- Bushway, A. A., Belya, P. R., & Bushway, R. J. (1981). Chia seed as a source of oil, poly- saccharide, and protein. *Journal of Food Science*, *46*, 1349–1356. 10.1111/j.1365-2621.1981.tb04171.x
- Bustos, A.Y., Gerez, C. L., Mohtar Mohtar, L. G., Zanini, P. V. I., Nazareno, M. A., Taranto, M. P., & Iturriaga, L. B. (2017). Lactic Acid Fermentation Improved Textural Behaviour, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Chia (*Salvia hispanica* L.) Dough. *Food Technol. Biotechnol*, *55*, 381–389.
- Cahill, J. P. (2003). Ethnobotany of chia, *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). *Economic Botany*, *57*(4), 604–618. 10.1663/0013-0001(2003)057[0604:EOCSHL]2.0.CO;2
- Cahill, J. P., & Ehdai, B. (2005). Variation and heritability of seed mass in chia (*Salvia hispanica* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, *52*(2), 201–207. 10.1007/s10722-003-5122-9
- Cahill, J. P., & Provance, M. C. (2002). Genetics of qualitative traits in domesticated chia (*Salvia hispanica* L.). *Journal of Heredity*, *93*(1), 52–55. 10.1093/jhered/93.1.52
- Calabriso, N., Gnoni, A., Stanca, E., Cavallo, A., Damiano, F., Siculella, L et al. (2018). Hydroxytyrosol ameliorates endothelial function under inflammatory conditions by preventing mitochondrial dysfunction. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 10.1155/2018/9086947
- Campos, B. E., Ruivo, T. D., da Silva Scapim, M. R., Madrona, G. S., & Bergamasco, R. D. C. (2016). Optimization of the mucilage extraction process from chia seeds and application in ice cream as a stabilizer and emulsifier. *LWT—Food Sci. Technol*, *65*, 874–883.
- Cao, K., Xu, J., Zou, X., Li, Y., Chen, C., Zheng, A et al. (2014). Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free Radic. Biol. Med. Elsevier*, *67*, 396–407. 10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.029
- Capitani, M. I., Spotorno, V., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT—Food Sci. Technol*, *45*, 94–102.
- Carluccio, M. A., Siculella, L., Ancora, M. A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C. et al. (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: Antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, *23*(4), 622–9. 10.1161/01.ATV.0000062884.69432.A0
- Cashman, K. D. (2007). Diet, nutrition, and bone health. *J Nutr*, *137*(11), 2507S–12S.
- Castejón, N., & Señoráns, F. J. (2020). Enzymatic modification to produce health-promoting lipids from fish oil, algae and other new omega-3 sources: A review. *New Biotechnol*, *57*, 45–54.
- Castro-Espin, C., & Agudo, A. (2022). The role of diet in prognosis among cancer survivors: a systematic review and meta-analysis of dietary patterns and diet interventions. *Nutrients*, *14*(2):348. 10.3390/nu14020348.
- Casuso, R. A., Al-Fazazi, S., Hidalgo-Gutierrez, A., López, L. C., Plaza-Díaz, J., Rueda-Robles, A., & Huertas, J. R. (2019). Hydroxytyrosol influences exercise-induced mitochondrial respiratory complex assembly into supercomplexes in rats. *Free Radic Biol Med*, *134*, 304–310. 10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.027.
- Catalán, Ú., Rubió, L., López de Las Hazas, M. C., Herrero, P., Nadal, P., Canela, N. et al. (2016). Hydroxytyrosol and its complex forms (secoiridoids) modulate aorta and heart proteome in healthy rats: Potential cardio-protective effects. *Mol. Nutr. Food Res*, *60*(10):2114–29. 10.1002/mnfr.201600052
- Caviedes, J. M. L., Restrepo, M. L. P., & Fornaguera, J. E. C. (2011). Relación entre las características de la pastura y el contenido de ácido linoleico conjugado (ALC) en la leche. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *24*(1), 63–73.
- Cereda, E., Turri, A., Klersy, C., Cappello, S., Ferrari, A., Filippi, A. R., Brugnatelli, S., Caraccia, M., Chiellino, S., Borioli, V., Monaco, T., Stella, G. M., Arcaini, L., Benazzo, M., Grugnetti, G., & Pedrazzoli, P., (2019). Caccialanza, R. La suplementación con aislado de proteína de suero mejora la composición corporal, la fuerza

- muscular y la tolerancia al tratamiento en pacientes con cáncer avanzado desnutridos sometidos a quimioterapia. *Cancer Med*, 8(16), 6923-6932. 10.1002/cam4.2517.
- Chan, J., Jaceldo-Siegl, K., & Fraser, G. E. (2009). Serum 25-hydroxyvitamin D status of vegetarians, partial vegetarians, and nonvegetarians: the Adventist Health Study-2. *Am J Clin Nutr*, 89(Suppl), 1686S-92S.
- Chen, J., Wong, H. S., Leong, P. K., Leung, H. Y., Chan, W. M., & Ko, K. M. (2017). Ursolic acid induces mitochondrial biogenesis through the activation of AMPK and PGC-1 in C2C12 myotubes: a possible mechanism underlying its beneficial effect on exercise endurance. *Food Funct*, 8, 2425–2436. 10.1039/C7FO00127D
- Chen, Q., Luo, S., Zhang, Y., & Chen, Z. (2011). Development of a liquid chromatography– mass spectrometry method for the determination of ursolic acid in rat plasma and tissue: Application to the pharmacokinetic and tissue distribution study. *Anal Bioanal Chem*, 399, 2877–84. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4651-x>.
- Chen, Y., Xiao, Y., Xie, B., Zhang, Q., Ma, X., Li, N., et al. (2016). Effect of milk powder supplementation with different calcium contents on bone mineral density of postmenopausal women in northern China: a randomized controlled double-blind trial. *Calcif Tissue Int*, 98, 60-6.
- Chen, Y., Zhang, Q., Wang, Y., Xiao, Y., Fu, R., Bao, H., et al. (2015). Estimating the causal effect of milk powder supplementation on bone mineral density: a randomized controlled trial with both non-compliance and loss to follow-up. *Eur J Clin Nutr*, 69, 824-30.
- Chen, F.Y., Bi, L., Qian, L., Gao, J.; Jiang, Y. C., & Chen, W. P. (2016). Identification of multidrug resistance gene MDR1 associated microRNA of salvianolic acid A reversal in lung cancer. *China J. Chin. Mater. Med*, 41, 3279–3284.
- Chen, H., Zhang, Q., Wang, X., Yang, J., & Wang, Q. (2011). Qualitative analysis and simultaneous quantification of phenolic compounds in the aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-DAD and ESI/MS(n). *Phytochem. Anal*, 22, 247–257.
- Chibisov, S., Singh, M., Singh, R. B., Halabi, G., Horiuchi, R., & Takahashi, T. (2019). Functional food security for prevention of obesity and metabolic syndrome. See Singh et al. pp. 145–56. 10.1016/B978-0-12-813148-0.00008-6
- Chim-Chi, Y., Gallegos-Tintore, S., Jiménez-Martínez, C., Dávila-Ortiz, G., & Chel-Guerrero, L. (2018). Antioxidant capacity of Mexican chia (*Salvia hispánica* L.) protein hydrolyzates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 323–331. 10.1007/s11694-017-9644-9
- Cho, Y. H., Lee, S. Y., Kim, C. M., Kim, N. D., Choe, S., Lee, C. H., et al. (2016). Effect of loquat leaf extract on muscle strength, muscle mass, and muscle function in healthy adults: a randomized, double-blinded, and placebo-controlled trial. *Evid Based Complement Alternat Med*, 4301621.
- Choi, J., Sabikhi, L., Hassan, A., & Anand, S. (2012). Bioactive peptides in dairy products. *Int J Dairy Technol*, 65, 1-12.
- Christian, M. S., Sharper, V. A., Hoberman, A. M., Seng, J. E., Fu, L., Covell, D., Diener, R. M., Bitler, C. M., & Crea, R. (2004). The toxicity profile of hydrolyzed aqueous olive pulp extract. *Drug Chem. Toxicol*, 27, 309–330
- Chu, X., He, X., Shi, Z., et al. (2015). Ursolic acid increases energy expenditure through enhancing free fatty acid uptake and β -oxidation via an UCP3/AMPK-dependent pathway in skeletal muscle. *Mol Nutr Food Res*, 59, 1491–1503.
- Cicerale Paucar-Menacho, L. M., Salvador-Reyes, R., Guillén-Sánchez, J., Capa-Robles, J., & Moreno-Rojo, C. (2015). Estudio comparativo de las características físico-químicas del aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.), aceite de oliva (*Olea europea*) y aceite crudo de pescado. *Scientia Agropecuaria*, 6(4), 279-290. 10.17268/sci.agropecu.2015.04.05
- Cicero, A. F. G., Fogacci, F., & Colletti, A. (2017). Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: A narrative review. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1378–1394. 10.1111/bph.13608
- Ciftci, O.N., Przybylski, R., & Rudzińska, M. (2012). Lipid components of flax, perilla, and chia seeds. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 114, 794–800.
- Cione, J. G. C., Verlengia, R., Barbosa, C. G. R., Ribeiro, A. G. S. V., de Oliveira, J. J., Oliveira, M. A., (2021). Crisp AH. No additional effects of ursolic acid supplementation associated with combined exercise program on metabolic syndrome of postmenopausal women: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Clin Nutr ESPEN*, 44, 143-149. 10.1016/j.clnesp.2021.05.031
- Clarkson, P., & Thompson, H. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*, 72, 637-46. 10.1093/ajcn/72.2.637S
- Clinton, S. K., Giovannucci, E. L., & Hursting, S. D. (2020). The World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions. *J Nutr*, 150(4), 663-671. 10.1093/jn/nxz268.
- Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Ind. Crop. Prod*, 34, 1366–1371.
- Coelho, M. S., Soares-Freitas, R. A., Areas, J. A., Gandra, E. A., & Salas-Mellado, M., & de las, M. (2018). Peptides from chia present antibacterial activity and inhibit cholesterol synthesis. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73, 101–107. 10.1007/s11130-018-0668-z

- Coelho, M. S., & Salas-Mellado, M. D. L. M. (2014). Chemical characterization of chia (*Salvia hispanica* L.) for use in food products. *J. Food Nutr. Res*, 2, 263–269.
- Coelho, M.S.; Salas-Mellado, M.M. How extraction method affects the physicochemical and functional properties of chia proteins. *LWT* 2018, 96, 26–33.
- Coi. aceite de oliva - Estimaciones año de cultivo 2019/20 - Consejo Oleícola Internacional. Disponible en: <https://www.internationaloliveoil.org/olive-oil-estimates-2019-20-crop-year/>
- COI. Home - International Olive Council. Disponible en: Internet: <https://www.internationaloliveoil.org/>. 2020a
- Colica, C., Di Renzo, L., Trombetta, D., Smeriglio, A., Bernardini, S., Cioccoloni, G. et al. (2017). Antioxidant effects of a hydroxytyrosol-based pharmaceutical formulation on body composition, metabolic state, and gene expression: a randomized double-blinded, placebo-controlled crossover trial. *oxid. Med. Cell. Longev.* 10.1155/2017/2473495
- Comm Health. (2009). 63, 582-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289389>.
- Convenio Internacional del Aceite de Oliva y las Aceitunas de Mesa. BOE.es - Documento DOUE-L-2016-81903. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2016-81903> [Consultada: 2020 Nov 19].
- Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 206-212. 10.4067/S0717-75182015000200014
- Cortés, M., Chiralt, A., & Puente, L. (2005). Alimentos funcionales: una historia con mucho presente y futuro. *Vitae*, 12(1), 5-14. ISSN 0121-4004
- Cotabarrén, J., Rosso, A. M., Tellechea, M., García-Pardo, J., Rivera, J. L., Obregón, W. D., & Parisi, M. G. (2019). Adding value to the chia (*Salvia hispánica* L.) expeller: Production of bioactive peptides with antioxidant properties by enzymatic hydrolysis with papain. *Food Chemistry*, 274, 848–856. 10.1016/j.foodchem.2018.09.061
- Cottin, S. C., Sanders, T. A., & Hall, W. L. (2011). The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. *Proc Nutr Soc*, 70, 215-31. 10.1017/S0029665111000061.
- Crespo, M. C., Tomé-Carneiro, J., Pintado, C., Dávalos, A., Visioli, F., & Burgos-Ramos, E. (2017). Hydroxytyrosol restores proper insulin signaling in an astrocytic model of Alzheimer's disease. *BioFactors*, 43(4), 540–8. 10.1002/biof.1356
- Creus, A., Benmelej, A., Villafañe, N., & Lombardo, Y. B. (2017). Dietary Salba (*Salvia hispanica* L) improves the altered metabolic fate of glucose and reduces increased collagen deposition in the heart of insulin-resistant rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*, 121, 30–39.
- Crowe, F. L., Steur, M., Allen, N. E., Appleby, P. N., Travis, R. C., & Key, T. J. (2011). Plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D in meat eaters, fish eaters, vegetarians and vegans: results from the EPIC-Oxford study. *Public Health Nutr*, 14, 340-6.
- Cuervo, M., Corbalán, M., Baladía, E., Cabrerizo, L., Formiguera, X., Iglesias, C., ... & Alfredo Martínez, J. (2009). Comparativa de las Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) de los diferentes países de la Unión Europea, de Estados Unidos (EEUU) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS). *Nutrición Hospitalaria*, 24(4), 384-414.
- Cueto Galán, R. (2016). *Papel protector de la dieta Mediterránea sobre el Índice de Hígado Graso*. Estudio PREDIMED-Málaga.
- Cvetkovikj, I., Stefkov, G., Acevska, J., Stanoeva, J. P., Karapandzova, M., Stefova, M., & Dimitrovska, A., Kulevanova, S. (2013). Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assessment of culinary *Salvia* species from South East Europe. *J. Chromatogr. A*, 1282, 38–45.
- D'Alessandro, A., & De Pergola, G. (2015). Mediterranean diet and cardiovascular disease: a critical evaluation of a priori dietary indexes. *Nutrients*, 7(9), 7863-7888. 10.3390/nu7095367
- D'Angelo, S., Manna, C., Migliardi, V., Mazzoni, O., Morrica, P., Capasso, G., Pontoni, G., Galletti, P., & Zappia, V. (2001). Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metab. Dispos*, 29, 1492–1498.
- Dagla, I., Benaki, D., Baira, E., Lemonakis, N., Poudyal, H., Brown, L et al. (2018). Alteration in the liver metabolome of rats with metabolic syndrome after treatment with hydroxytyrosol. a mass spectrometry and nuclear magnetic resonance - based metabolomics study. *Talanta. Elsevier B.V.*, 178, 246–57. 10.1016/j.talanta.2017.09.029
- Dalle Zotte, A., Szendro, Z. (2011). The role of rabbit meat as functional food. *Meat Sci*. 88, 319–31. 10.1016/j.meatsci.2011.02.017
- Davey, G. K., Spencer, E. A., Appleby, P. N., Allen, N. E., Knox, K. H., & Key, T. J. (2003). EPIC-Oxford: lifestyle characteristics and nutrient intakes in a cohort of 33883 meat-eaters and 31546 non-meat-eaters in the UK. *Public Health Nutr*, 6, 259-69.
- De Abreu Silva, L., Verneque, B. J. F., Mota, A. P. L., & Duarte, C. K. (2021). Chia seeds (*Salvia Hispanica* L.) consumption and lipid profile: a systematic review and meta-analysis. *Food & Function*. 10.1039/D1FO01287H
- De Beer, H. (2012). Dairy products and physical stature: a systematic review and metaanalysis of controlled trials. *Econ Hum Biol*, 10, 299-309.

- de Bock, M., Derraik, J. G. B., Brennan, C. M., Biggs, J. B., Morgan, P. E., & Hodgkinson, S. C et al. (2013). Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *PLoS One*, 8(3). 10.1371/journal.pone.0057622
- De Falco, B., Fiore, A., Rossi, R., Amato, M., & Lanzotti, V. (2018). Metabolomics driven analysis by UAE-MS and antioxidant activity of chia (*Salvia hispanica* L.) commercial and mutant seeds. *Food Chem*, 254, 137–143
- de la Paz Salgado-Cruz, M., Calderón-Domínguez, G., Chanona-Pérez, J. J., Hernández-Álvarez, A. J., Díaz-Ramírez, M., & Farrera-Rebollo, R. R. (2014). Chia seeds: A new nutraceutical option. In: *Seeds as Functional Foods and Nutraceuticals: New Frontiers in Food Science*.
- De la Sancha, P. (2019). Efecto de la suplementación de ácidos grasos omega-3 sobre la composición lipídica y función endotelial de las lipoproteínas de alta densidad (hdl) en sujetos con hipertrigliceridemia.
- De las Hazas, M. C. L., Rubio, L., Macia, A., & Motilva, M. J. (2018). Hydroxytyrosol: Emerging Trends in Potential Therapeutic Applications. *Curr. Pharm. Des. Bentham Science Publishers Ltd*, 23(19), 2157–79. 10.2174/1381612824666180522110314
- de Pablos, R. M., Espinosa-Oliva, A. M., Hornedo-Ortega, R., Cano, M., & Arguelles, S. (2019). Hydroxytyrosol protects from aging process via AMPK and autophagy; a review of its effects on cancer, metabolic syndrome, osteoporosis, immune-mediated and neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Res*, 143, 58–72.
- De Rose, E., & Guimaraes, A. C. (1980). A model for optimization of somatotype in young athletes. In M. Ostyn, G. Beunen, J. Simons (eds), *Kinanthropometry II*. Baltimore: University Park Press.
- Delgado Roche, L., Martínez Sánchez, G., & Díaz Batista, A. (2009). Determinación de marcadores de estrés oxidativo en pacientes con enfermedades cardiovasculares. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 43(3), 307–313.
- Dell'Agli, M., Buscialà, A., & Bosisio, E. (2004). Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc Res*, 63, 593–602. 10.1016/j.cardiores.2004.03.019
- Di Caro, S., Fragkos, K.C., Keetarut, K., Koo, H. F., Sebeos-Rogers, G., Saravanapavan, H., Barragry, J., Rogers, J., Mehta, S. J., & Rahman, F. (2019). Enteral nutrition in adult Crohn's disease: Toward a paradigm shift. *Nutrients*, 11(2222).
- Dick, M., Costa, T. M. H., Gomaa, A., Subirade, M., & de Oliveira Rios, A. (2015). Flôres, S.H. Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties. *Carbohydr. Polym*, 130, 198–205.
- Dimitrić-Marković, J. (2007). Flavonoids, the role and the importance in modern investigations. *Acta Agric. Serbica*, 12, 25–36.
- Din, Z. U., Alam, M., Ullah, H., Shi, D., Xu, B., Li, H., & Xiao, C. (2021). Nutritional, phytochemical and therapeutic potential of chia seed (*Salvia hispanica* L.). A mini-review. *Food Hydrocoll. Health*, 1, 100010.
- Drouin-Chartier, J. P., Brassard, D., Tessier-Grenier, M., & Côté, J. A. (2016). Labonté MÈ, Desroches S, Couture P, Lamarche B. Systematic review of the association between dairy product consumption and risk of cardiovascular-related clinical outcomes. *Adv Nutr*, 7, 1026–40.
- Drucker, D. J. (2001). Minireview: the glucagon-like peptides. *Endocrinology*, 142, 521–527. 10.1210/endo.142.2.7983.
- Dschoutezo, A. (2016). *Semillas de chía: El secreto amazónico para el bienestar* (Spanish Edition) (Posición en Kindle59-62). Edición de Kindle.
- Du, X., Zhu, K., Trube, A., Zhang, Q., Ma, G., Hu, X., et al. (2004). School-milk intervention trial enhances growth and bone mineral accretion in Chinese girls aged 10-12 years in Beijing. *Br J Nutr*, 92, 159-68.
- Du, X. Q., Greenfield, H., Fraser, D. R., Ge, K. Y., Liu, Z. H., & He, W. (2002). Milk consumption and bone mineral content in Chinese adolescent girls. *Bone*, 30, 521-8.
- Du, G., Sun, L., Zhao, R., Du, L., Song, J., Zhang, L., He, G., Zhang, Y., & Zhang, J. (2016). Polyphenols: Potential source of drugs for the treatment of ischaemic heart disease. *Pharmacol. Ther.* 162, 23–34.
- Eaton, J. C., & Iannotti, L. L. (2017). Genome-nutrition divergence: evolving understanding of the malnutrition spectrum. *Nutr Rev*, 75(11), 934-50. 10.1093/nutrit/nux055
- Edwards, S. S. (1819). *Salvia hispanica*, Spanish sage. *Botanical Register*, 5, 359.
- EFSA. (2010). Guidance on human health risk-benefit assessment of food. *EFSA Journal*, 8(7)1-41. 10.2903/j.efsa.2010.1673
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), Turck, D., Bresson, J. L., Burlingame, B., Dean, T., Fairweather-Tait, S., ... & van Loveren, H. (2017). Safety of hydroxytyrosol as a novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97. *EFSA Journal*, 15(3), e04728
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to olive oil and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 1316:1332), maintenance of normal (fasting) blood concentrations of triglycerides (ID 1316:1332), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1316:1332) and maintenance of normal blood glucose concentrations (ID 4244) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J.* 2011, 9, 2044.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). (2010). Scientific opinion on principles for deriving and applying dietary reference values. *EFSA J*, 8(3), 1458.

- EFSA. (2012). Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to polyphenols in olive and maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639, further assessment) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006.10(8), 1–14. 10.2903/j.efsa.2012.2848
- Enriquez, C., & Sofia, G. (2020). Aporte de aminoácidos esenciales en mezclas alimenticias de origen vegetal por métodos computacionales.
- Esposito, K., Kastorini, C-M, Panagiotakos, D. B., & Giugliano, D. (2011). Mediterranean diet and weight loss: meta-analysis of randomized controlled trials. *Metab Syndr Relat Disord*, 9(1), 1–12.
- Estaire, P, González Rodríguez, L. G., López-Sobaler, A. M., & Ortega, R. M. (2012). Food sources and intake of calcium in a representative sample to Spanish adults. *Food Nutr Sci*, 3, 1269-76.
- Estruch, R., Martínez-González, M. A., Corella, D., et al. Study investigators. effects of dietary fibre intake on risk factors for cardiovascular disease in subjects at high risk. *J Epidemiol*. 10.1136/jech.2008.082214
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M. I., Corella, D., Arós, F., et al. (2018). Primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *N. Engl. J. Med*, 378(25), 1–14. 10.1056/NEJMoa1800389
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M. I., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., et al. (2018). Prevención primaria de enfermedades cardiovasculares con una dieta mediterránea complementada con aceite de oliva virgen extra o frutos secos. *N. Engl. J. Med*, 378, e34.
- Extracción y caracterización del aceite de semilla de chía (*Salvia hispánica L.*): Estudio para su valoración y aprovechamiento. In Proceedings of the IV encuentro nacional de biotecnología IPN, Santa Cruz, Tlaxcala, México. 10.1016/bs.afnr.2015.06.002
- Fabiani, R. (2016). Anti-cancer properties of olive oil secoiridoid phenols: A systematic review of: In vivo studies. *Food Funct. Royal Society of Chemistry*, 7(10), 4145–59. 10.1039/c6fo00958a
- Fan, M., Wang, T., Peng, L.Y., Huang, J. S., Wu, X. D., Wang, H. Y., & Zhao, Q. S. (2021). Neo-clerodane Diterpenoids with Hypoglycemic Effects in Vivo from the Aerial Parts of *Salvia hispanica L.* *Chem. Biodivers*, 18, 2100517.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). (1970). Análítico: Contenido de Aminoácidos de los Alimentos y Datos Biológicos sobre las Proteína; FAO: Rome, Italy,
- FAO/WHO/UNU. (1985). *Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/ WHO/UNU expert consultation: Technical report series 724.* Geneva: WHO.
- Fardet, A., Dupont, D., Rioux, L. E., & Turgeon, S. L. (2018). Influence of food structure on dairy protein, lipid and calcium bioavailability: a narrative review of evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2, 1-24. 10.1080/10408398.2018.1435503
- Farré Rovira, R. (2015). La leche y los productos lácteos: fuentes dietéticas de calcio. *Nutr Hosp*, 31, 1-9. 10.3305/nh.2015.31.sup2.8676.
- Farré, A. L., & Macaya, C. (2006). Efectos antitrombóticos y antiinflamatorios de los ácidos grasos omega-3. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 6(4), 31D-37D. 10.1016/S1131-3587(06)74824-5
- Fedacko, J., Singhal, S., Singh, R. B., Hristova, K., Itharat, A., & Halabi G. (2019). Functional food security for prevention of cardiovascular diseases. See Singh et al. 167–83. 10.1016/B978-0-12-813148-0.00010-4
- Feldman, D. B., & Seely, J. C. (1988). *Necropsy guide: rodent and the rabbit*; CRC Press: Boca Raton, Florida, FL, USA, p. 197.
- Feng, B., Zhu, Y., Yan, L., Yan, H., Huang, X., Jiang, D., Li, Z., Hua, L., Zhuo, Y., Fang, Z., Che, L., Lin, Y., Xu, S., Huang, C., Zou, Y., Li, L., & Wu, D. (2020). Ursolic acid induces the production of IL6 and chemokines in both adipocytes and adipose tissue. *Adipocyte*, 9(1), 523-534. 10.1080/21623945.2020.
- Fernández, T. J. (2010). Ácidos grasos omega-3 y prevención cardiovascular. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41(1), 13-15.
- Fernández-Fernández, E., Martínez-Hernández, J. A., Martínez-Suárez, V., Moreno-Villares, J. M., Collado Yurrita, L. R., Hernández-Cabria, M., et al. (2015). Documento de consenso. Importancia nutricional y metabólica de la leche. *Nutr Hosp*, 31(1), 92-101. 10.3305/nh.2015.31.1.8253
- Ferreira, C., Fomes, L., Silva, G., & Rosa, G. (2015). Effect of chia seed (*Salvia hispanica L*) consumption on cardiovascular risk factors in humans: a systematic review. *Nutr. Hosp*, 32(5), 1909- 1912. Disponible en: <http://ibecs.isciii.es/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/> .
- FESNAD. (2010). Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética. Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) para la población española, Disponible en: <http://www.sennutricion.org/es/2010/03/02/ingestas-dieteticas-de-referencia-idr-para-la-poblacion-espaola-consenso-fesnad-2010> [acceso: 20-05-19].
- Figueiredo, V. C., & Nader, G. A. (2012). Ursolic acid directly promotes protein accretion in myotubes but does not affect myoblast proliferation. *Cell BiochemFunct*, 30(5), 432-7. 10.1002/cbf.2821
- Foisy Sauvé, M., Spahis, S., Delvin, E., & Levy, E. (2021). Glycomacropptide: a bioactive milk derivative to alleviate metabolic syndrome outcomes. *Antioxid Redox Signal*, 34(3), 201-222. 10.1089/ars.2019.7994.
- Fontana, L., Martínez-Augustin, O., & Gil, Á. (2017). Dietary nucleotides and immunity. In: *Nutrition, Immunity, and Infection*, 1st ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp. 387–404.

- Food and Drug Administration, US Department of Health and Human Services. (2011). Health Claims Meeting Significant Scientific Agreement (SSA). <https://www.fda.gov/food/food-labeling-nutrition/authorized-health-claims-meet-significant-scientific-agreement-ssa-standard>.
- Fundación Española de la Nutrición (FEN), Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT). (2015). La leche como vehículo de salud para la población. Disponible en: [valor_de_la_leche_fundacion_espanola_nutricion.pdf](#)
- Fundación Española de la Nutrición (FEN). (2012). Valoración nutricional de la dieta española de acuerdo al panel de consumo alimentario. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializa-ción-y-distribucion-alimentaria/Valoracion_Nutricional_2012_tcm7-309599.pdf
- Fundación Española de la Nutrición. ANIBES. (2015). Disponible en: <http://www.fen.org.es/anibes/es/inicio>
- Fundación Española de la Nutrición. Leche como vehículo de salud para la población. (2017). Disponible en: <http://www.finut.org/wp-content/uploads/2017/09/Libro-La-leche-como-veh%C3%ADculo-de-salud-version-Online.pdf>
- Gahfoor, K., Aljuhaimi, F., Oezcan, M. M., Uslu, N., Hussain, S., Babiker, E. E., & Fadimu, G. (2018). Effects of roasting on bioactive compounds, fatty acid, and mineral composition of chia seed and oil. *J. Food Process. Preserv*, *42*, 1–7. doi:10.1111/jfpp.13710
- García, M., Bihuniak, J. D., Shook, J., Kenny, A., Kerstetter, J., & Huedo-Medina, T. B. (2016). The effect of the traditional mediterranean-style diet on metabolic risk factors: a meta-analysis. *Nutrients*, *15*(3), 168. doi:10.3390/nu8030168
- García, M. I. (2016). Plantas alimentarias con propiedades medicinales. <http://hdl.handle.net/2445/68681>
- Gaucheron F. (2011). Milk and dairy products: a unique micronutrient combination. *J Am Coll Nutr*, *30*, 400S-9S. doi:10.1080/07315724.2011.10719983
- George, E. S., Marshall, S., Mayr, H. L., Trakman, G. L., & Tatu-Babet, O. A. (2019). Lassemillante ACM et al. The effect of high-polyphenol extra virgin olive oil on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr. Taylor & Francis*, *59*(17):2772–95. doi:10.1080/10408398.2018.1470491
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., & Rastall, R.A., (2004). Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* *17*, 259–275. doi:10.1079/NRR200479
- Gil, Á., & Ortega, R. M. (2019). Introduction and executive summary of the supplement, role of milk and dairy products in health and prevention of noncommunicable chronic diseases: A series of systematic reviews. *Adv Nutr*, *1*(2), S67-S73. 10.1093/advances/nmz020.
- Gil, Á., Plaza-Díaz, J., & Mesa, M. D. (2018). Vitamin, D: classic and novel actions. *Ann Nutr Metab*, *72*(2), 87-95. doi:10.1159/000486536
- Gil, A. (2014). *Libro blanco de los omega 3*. Dossier de prensa. 2a ed.
- Godos, J., Castellano, S., Ray, S., Grosso, G., & Galvano, F. (2018). Dietary polyphenol intake and depression: Results from the mediterranean healthy eating, lifestyle and aging (meal) study. *Molecules*, *23*(999). doi:10.3390/molecules23050999
- Gómez-Cortés, P., de la Fuente, M. Á., & Juárez, M. (2019). Ácidos grasos trans y ácido linoleico conjugado en alimentos: origen y propiedades biológicas. *Nutrición Hospitalaria*, *36*(2), 479-486. doi.org/10.20960/nh.2466
- Gómez-Delgado, F., Alcalá-Díaz, J. F., & García Ríos, A. (2014). La dieta mediterránea y su impacto en la enfermedad cardiovascular. *Dieta mediterránea*, *47*.
- Gómez-Favela, M. A., Gutiérrez-Dorado, R., Cuevas-Rodríguez, E. O., Canizalez-Román, V. A., Del Rosario León-Sicauros, C., Milán-Carrillo, J., & Reyes-Moreno, C. (2017). Improvement of chia seeds with antioxidant activity, GABA, essential amino acids, and dietary fiber by controlled germination bioprocess. *Plant Foods Hum. Nutr*, *72*, 345–352. doi:10.1007/s11130-017-0631-4
- González, G., & García, D. (2012). Ejercicio físico y radicales libres, ¿es necesario una suplementación con antioxidantes?. *Rev Internac Med Ciencias Actividad Física Deporte*, *12*(46), 369-88
- González Vaqué, L. (1991). CEE legislación relativa a los aditivos alimentarios.
- González-Correa, J. A., Navas, M. D., Muñoz-Marín, J., Trujillo, M., Fernández-Bolaños, J., (2008). De La Cruz, J. P. Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid. *J. Agric. Food Chem*, *56*(17), 7872–6. 10.1021/jf801502z
- González-Santiago, M., Martín-Bautista, E., Carrero, J. J., Fonollá, J., Baró, L., Bartolomé, M. V. et al. (2006). One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis*, *188*(1), 35–42. 10.1016/j.atherosclerosis.2005.10.022
- González, M. R., Marcos, M. L. T., Marcos, F. M., Sadek, I. M., Roldan, C. C., & López, P. J. T. (2019). Efectos de la dieta mediterránea sobre los factores de riesgo cardiovascular. *Journal of Negative and No Positive Results*, *4*(1), 25-51. doi:10.19230/jonnpr.2787
- Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Marino Gammazza, A., Knap, N., ... & Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *Int. J. Mol. Sci*, *19*(3), 686. doi:10.3390/ijms19030686

- Gouw, V. P., Jung, J., & Zhao, Y. (2017). Functional properties, bioactive compounds, and in vitro gastrointestinal digestion study of dried fruit pomace powders as functional food ingredients. *LWT*, *80*, 136-144. doi: 10.1016/j.lwt.2017.02.015
- Granato, D., Nunes, D. S., & Barba, F. J. (2017). An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends in Food Science & Technology*, *62*, 13-22. doi: 10.1016/j.tifs.2016.12.010
- Grancieri, M., Martino, H. S. D., & González de Mejía, E. (2019). Chia seed (*Salvia hispánica* L.) as a source of proteins and bioactive peptides with health benefits: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*(2), 480-499. doi:10.1111/1541-4337.12423
- Grosso, G. (2018). Effects of polyphenol-rich foods on human health. *Nutrients*, *10*(8), 1089. doi:10.3390/nu10081089
- Guo, J., Astrup, A., Lovegrove, J. A., Gijssbers, L., Givens, D. I., & Soedamah-Muthu, S. S. (2017). Milk and dairy consumption and risk of cardiovascular diseases and all-cause mortality: dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Epidemiol*, *32*(4), 269-287. doi:10.1007/s10654-017-0243-1
- Gutiérrez, T. J. (2018). Plantain flours as potential raw materials for the development of gluten-free functional foods. *Carbohydr. Polym*, *202*, 265-279. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.08.121
- Gutiérrez Tolentino, R., Ramírez Vega, M., Vega y León, S., Fontecha, J., Rodríguez, L. M., & Escobar Medina, A. (2014). Contenido de ácidos grasos en semillas de chía (*Salvia hispánica* L.) cultivadas en cuatro estados de México. *Rev Cubana Plant Med*, *19*(3), 199-207.
- Hamrouni-Sellami, I., Rahali, F. Z., Rebey, I. B., Bourgou, S., Limam, F., & Marzouk, B. (2013). Total phenolics, flavonoids, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) plants as affected by different drying methods. *Food Bioprocess Technol*, *6*(3), 806-817. doi:10.1007/s11947-012-0877-7
- Hanafy, D. M., Burrows, G. E., Prenzler, P. D., & Hill, R. A. (2020). Potential role of phenolic extracts of mentha in managing oxidative stress and Alzheimer's disease. *Antioxidants*, *9*(7), 631. doi:10.3390/antiox9070631
- Hao, J., Shen, W., Yu, G., Jia, H., Li, X., Feng, Z., Wang, Y., Weber, P., Wertz, K., Sharman, E., & Liu, J. (2010). Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr. Biochem*, *21*(7), 634-644. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.03.012
- He, Y., Li, Y., Zhao, T., Wang, Y., & Sun, C. (2013). Ursolic acid inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through LKB1/AMPK pathway. *PLoS one*, *8*(7), e70135. doi:10.1371/journal.pone.0070135
- Heath, B. H., & Carter, J. L. (1967). A modified somatotype method. *American journal of physical anthropology*, *27*(1), 57-74. doi:10.1002/ajpa.1330270108
- Heilman, J., Anyangwe, N., Tran, N., Edwards, J., Beilstein, P., & López, J. (2015). Toxicological evaluation of an olive extract, H35: subchronic toxicity in the rat. *Food Chem. Toxicol*, *84*, 18-28. doi:10.1016/j.fct.2015.07.007
- Hernández Ramírez, J. (2016). Establecimiento de cultivos in vitro de raíces adventicias de *Salvia hispánica* L. (Chía) para la producción de ácidos grasos Omega 3. [Tesis licenciatura]. Toluca, México: Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de química; 2016.
- Hernández-Ledesma, B., del Mar Contreras, M., & Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in colloid and interface science*, *165*(1), 23-35. doi:10.1016/j.cis.2010.11.001
- Hernández, A. G., & Pozo, A. S. (2010). Metabolismo de los nucleótidos. In *Tratado de nutrición* (pp. 379-404). Editorial Médica Panamericana.
- Herrera-Marcos, L. V., Lou-Bonafonte, J. M., Arnal, C., Navarro, M. A., & Osada, J. (2017). Transcriptomics and the mediterranean diet: A systematic review. *Nutrients*, *9*(5), 472. doi:10.3390/nu9050472
- Hoppe, C., Mølgaard, C., & Michaelsen, K. F. (2006). Cow's milk and linear growth in industrialized and developing countries. *Annu. Rev. Nutr*, *26*, 131-173. doi:10.1146/annurev.nutr.26.010506.103757
- Horwitz, W. (2010). Official methods of analysis of AOAC International. Volume I, agricultural chemicals, contaminants, drugs/edited by William Horwitz. Gaithersburg (Maryland): AOAC International, 1997 <http://hdl.handle.net/10637/3158>
- Iglesias, M. J., de la Fuente Layos, M. Á., & Alonso, J. F. (2015). Los nutrientes de la leche en la salud cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, *31*(2), 26-32. doi: 10.3305/nh.2015.31.sup2.8679
- Iguacel, I., Miguel-Berges, M. L., Gómez-Bruton, A., Moreno, L. A., & Julián, C. (2019). Veganism, vegetarianism, bone mineral density, and fracture risk: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev*, *77*(1), 1-18. doi:10.1093/nutrit/nuy045
- Imran, M., Nadeem, M., Gilani, S. A., Khan, S., Sajid, M. W., & Amir, R. M. (2018). Antitumor perspectives of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol: Recent updates. *Journal of food science*, *83*(7), 1781-1791. [Consultada: 2021 May 19]. doi:10.1111/1750-3841.14198
- Institute of Medicine (IOM). Dietary reference intakes. 2012.
- Irwin, S. (1968). Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia*, *13*(3), 222-257. doi:10.1007/BF00401402

- Ismail, M. (2015). Which is better for humans, animal milk or vegetable milk. *J Nutr Health Food Eng*, 2(5), 14-15. doi: 10.15406/jnhfe.2015.02.00067
- Israr, B., Frazier, R. A., & Gordon, M. H. (2013). Effects of phytate and minerals on the bioavailability of oxalate from food. *Food Chem*, 141(3), 1690-1693. doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.130
- Itan, Y., Powell, A., Beaumont, M. A., Burger, J., & Thomas, M. G. (2009). The origins of lactase persistence in Europe. *PLoS Comput Biol*, 5(8), e1000491. doi: 10.1371/journal.pcbi.100049
- Jäger, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M. N., & Scheffler, A. (2009). Pentacyclic triterpene distribution in various plants—rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules*, 14(6), 2016-2031. doi:10.3390/molecules14062016
- Jannasch, F., Kröger, J., & Schulze, M. B. (2017). Dietary patterns and type 2 diabetes: a systematic literature review and meta-analysis of prospective studies. *The Journal of nutrition*, 147(6), 1174-1182. doi:10.3945/jn.116.242552
- Jebb, S. A., Cole, T. J., Doman, D., Murgatroyd, P. R., & Prentice, A. M. (2000). Evaluation of the novel Tanita body-fat analyser to measure body composition by comparison with a four-compartment model. *Br J Nutr*, 83(2), 115-122. doi:10.1017/S0007114500000155
- Jemai, H., El Feki, A., & Sayadi, S. (2009). Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J. Agric. Food Chem*, 57(19), 8798-8804. doi:10.1021/jf901280r
- Jennings, A., Berendsen, A. M., De Groot, L. C., Feskens, E. J., Brzozowska, A., Sicinska, E., Pietruszka, B., Meunier, N., Caumon, E., Malpuech-Brugère, C., Santoro, A., Ostan, R., Franceschi, C., Gillings, R., O'Neil, C.M., Fairweather-Tait, S.J., Minihane, A.M., & Cassidy, A. (2019). Mediterranean-style diet improves systolic blood pressure and arterial stiffness in older adults: results of a 1-year European multi-center trial. *Hypertension*, 73(3), 578-586. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12259
- Jeong, J. W., Shim, J. J., Choi, I. D., Kim, S. H., Ra, J., Ku, H. K., Lee, D.E., Kim, T.Y., Jeung, W., Lee, J.H., Lee, K.W., Huh, C.S., Sim, J.H., & Ahn, Y.T. (2015). Apple pomace extract improves endurance in exercise performance by increasing strength and weight of skeletal muscle. *J Med Food*, 18(12), 1380-1386. doi:10.1089/jmf.2014.3401
- Jiménez P, Masson L, Quitral V. Composición química de semillas de chia, linaza y rosa mosqueta y su aporte en ácidos grasos omega-3. *Rev Chil Nutr*. 2013; 40(2). Disponible en: doi:10.4067/S0717-75182013000200010
- Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Lourenço-Lopes, C., Gallardo-Gomez, M., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Prieto, M.A., & Simal-Gandara, J. (2020). Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil. *Foods*, 9(8), 1014. doi:10.3390/foods9081014
- Jin, F., Nieman, D. C., Sha, W., Xie, G., Qiu, Y., & Jia, W. (2012). Supplementation of milled chia seeds increases plasma ALA and EPA in postmenopausal women. *Plant Foods Hum. Nutr*, 67(2), 105-110. doi:10.1007/s11130-012-0286-0
- Johnson, M. A. C. B., & Bradford, C. (2014). Omega-3, omega-6 and omega-9 fatty acids: implications for cardiovascular and other diseases. *J. Glycom. Lipidom*, 4(123), 2153-0637. 0.4172/2153-doi: 10637.1000123
- Joseph, P. C. (2004). Genetic diversity among varieties of Chia (*Salvia hispanica* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51(7), 773-781. doi:10.1023/B:GRES.0000034583.20407.80
- Joseph, P., Leong, D., McKee, M., Anand, S. S., Schwalm, J. D., Teo, K., Mente, A., & Yusuf, S. (2017). Reducing the global burden of cardiovascular disease, part 1: the epidemiology and risk factors. *Circulation research*, 121(6), 677-694. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.308903
- Kazmi, I., Afzal, M., Rahman, S., Iqbal, M., Imam, F., & Anwar, F. (2013). Antiobesity potential of ursolic acid stearyl glucoside by inhibiting pancreatic lipase. *Eur J Pharmacol*, 709(1-3), 28-36. doi:10.1016/j.ejphar.2013.02.032
- Karav, S., Le Parc, A., Leite Nobrega de Moura Bell, J. M., Frese, S. A., Kirmiz, N., Block, D. E., Barile, D., & Mills, D. A. (2016). Oligosaccharides released from milk glycoproteins are selective growth substrates for infant-associated bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 82(12), 3622-3630. doi: 10.1128/AEM.00547-16
- Karković Marković, A., Torić, J., Barbarić, M., & Jakobišić Brala, C. (2019). Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health. *Molecules*, 24(10), 2001. doi: 10.3390/molecules24102001.
- Kastorini, C. M., Milionis, H. J., Esposito, K., Giugliano, D., Goudevenos, J. A., & Panagiotakos, D. B. (2011). The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: a meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. *Journal of the American college of cardiology*, 57(11), 1299-1313. doi:10.1016/j.jacc.2010.09.073
- Katashima, C. K., Silva, V. R., Gomes, T. L., Pichard, C., & Pimentel, G. D. (2017). Ursolic acid and mechanisms of actions on adipose and muscle tissue: a systematic review. *Obesity reviews*, 18(6), 700-711. doi: 10.1111/obr.12523
- Katunzi-Kilewela, A., Kaale, L. D., Kibazohi, O., & Rweyemamu, L. M. (2021). Nutritional, health benefits and usage of chia seeds (*Salvia hispanica*): A review. *Afr. J. Food Sci*, 15(2), 48-59. doi:10.5897/AJFS2020.2015
- Kaushik, R., Sachdeva, B., Arora, S., Kapila, S., & Wadhwa, B. K. (2014). Bioavailability of vitamin D2 and calcium from fortified milk. *Food Chem*, 147, 307-311.
- Kessenich, C. R. (2008). Alternative Choices for calcium supplementation. *The Journal for Nurse Practitioners*, 4(1), 36-39. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.150

- Keys, A., Aravanis, C., Blackburn, H., & Buzina, R. (1980). A multivariate analysis of death and coronary heart disease. *Seven Countries*, 77-84.
- Keys, A., Menott, A., Karvonen, M. J., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., ... & Toshima, H. (2017). The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am. J. Epidemiol*, 185(11), 1130-1142. doi:10.1093/aje/kwx101
- Kirkland, D., Edwards, J., Woehrl, T., & Beilstein, P. (2015). Investigations into the genotoxic potential of olive extracts. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen*, 777, 17-28. doi:10.1016/j.mrgentox.2014.10.012
- Koelman, L., Egea Rodrigues, C., & Aleksandrova, K. (2022). Effects of Dietary Patterns on Biomarkers of Inflammation and Immune Responses: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Adv Nutr*, 13(1), 101-115. doi: 10.1093/advances/nmab086.
- Koubaa, M., Barba, F. J., Kovačević, D. B., Putnik, P., Santos, M. D., Queirós, R. P., Moreira, S.A., Inácio, R.S., Fidalgo, L.G., & Saraiva, J. A. (2018). Pulsed electric field processing of fruit juices. In *Fruit juices* (pp. 437-449). Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-802230-6.00022-9
- Giacometti, J., Kovačević, D. B., Putnik, P., Gabrić, D., Bilušić, T., Krešić, G., Stulic, V., Barba, F.J., Chemat, F., Barbosa-Cánovas, G., & Jambrak, A. R. (2018). Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food research international*, 113, 245-262. doi: 10.1016/j.foodres.2018.06.036
- Kraemer, W. J., Patton, J. F., Gordon, S. E., Harman, E. A., Deschenes, M. R., Reynolds, K., Newton, R.U., Triplett, N.T., & Dziados, J. E. (1995). Compatibility of high-intensity strength and endurance training on hormonal and skeletal muscle adaptations. *Journal of applied physiology*, 78(3), 976-989. doi: 10.1152/jappl.1995.78.3.976
- Kruger, M. C., Ha, P. C., Todd, J. M., Kuhn-Sherlock, B., Schollum, L. M., Ma, J., Qin, G., & Lau, E. (2012). High-calcium, vitamin D fortified milk is effective in improving bone turnover markers and vitamin D status in healthy postmenopausal Chinese women. *Eur J Clin Nutr*, 66(7), 856-861. doi:10.1038/ejcn.2012.54
- Krzyzanowska, J., Czubacka, A., & Oleszek, W. (2010). Dietary phytochemicals and human health. *Bio-farms for nutraceuticals*, 74-98. doi:10.1007/978-1-4419-7347-4_7
- Kulczyński, B., Kobus-Cisowska, J., Taczanowski, M., Kmiecik, D., & Gramza-Michałowska, A. (2019). The chemical composition and nutritional value of chia seeds—Current state of knowledge. *Nutrients*, 11(6), 1242. doi:10.3390/nu11061242
- Kunkel, S. D., Elmore, C. J., Bongers, K. S., Ebert, S. M., Fox, D. K., Dyle, M. C., Bullard, S.A., & Adams, C. M. (2012). Ursolic acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease. *PLoS one*, 7(6), e39332. doi: 10.1371/journal.pone.0039332.
- Kunkel, S. D., Suneja, M., Ebert, S. M., Bongers, K. S., Fox, D. K., Malmberg, S. E., Alipour, F., Shields, R.K., & Adams, C. M. (2011). mRNA expression signatures of human skeletal muscle atrophy identify a natural compound that increases muscle mass. *Cell metabolism*, 13(6), 627-638. doi: 10.1016/j.cmet.2011.03.020.
- Larsson, S. C., Crippa, A., Orsini, N., Wolk, A., & Michaëlsson, K. (2015). Milk consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, 7(9), 7749-7763. doi:10.3390/nu7095363
- Lemonakis, N., Poudyal, H., Halabalaki, M., Brown, L., Tsarbopoulos, A., Skaltsounis, A. L., & Gikas, E. (2017). The LC-MS-based metabolomics of hydroxytyrosol administration in rats reveals amelioration of the metabolic syndrome. *Journal of Chromatography B*, 1041, 45-59. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.12.020
- Lenssen, K. G., Bast, A., & de Boer, A. (2018). Clarifying the health claim assessment procedure of EFSA will benefit functional food innovation. *J. Funct. Foods*, 47, 386-396. doi: 10.1016/j.jff.2018.05.047
- Lepage, G., & Roy, C. C. (1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lipid Res*, 25(12), 1391-1396. doi:10.1016/S0022-2275(20)3445766
- Lerner, A., & Raanan, S. (2000). Nucleotides in infant nutrition: a must or an option. *Israel Medical Association Journal (IMAJ)*, 2(10), 772-774
- Li, S., Meng, F., Liao, X., Wang, Y., Sun, Z., Guo, F., Li, X., Meng, M., Li, Y., & Sun, C. (2014). Therapeutic role of ursolic acid on ameliorating hepatic steatosis and improving metabolic disorders in high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease rats. *PLoS One*, 9(1), e86724. doi:10.1371/journal.pone.0086724
- Li, W., Zhang, H., Nie, M., Tian, Y., Chen, X., Chen, C., Chen, H., & Liu, R. (2017). Ursolic acid derivative FZU-03,010 inhibits STAT3 and induces cell cycle arrest and apoptosis in renal and breast cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, 49(4), 367-373. doi: 10.1093/abbs/gmx012.
- Li, J., Li, M., Ye, K., Jiang, Q., Wang, M., Wen, X., & Yang, J. (2021). Chemical profile of Xian-He-Cao-Chang-Yan formula and its effects on ulcerative colitis. *J. Ethnopharmacol*, 267, 113517. doi:10.1016/j.jep.2020.113517
- Llorent-Martínez, E. J., Zengin, G., Ortega-Barrales, P., Zakariyyah Aumeeruddy, M., Locatelli, M., Mollica, A., & Mahomoodally, M. F. (2019). Characterization of the phytochemical profiles and biological activities of *Ajuga chamaepitys* subsp. *chia* var. *chia* and *Ajuga bombycina* by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry (HPLC–ESI–MSn). *Anal. Lett*, 52(5), 852-868. doi:10.1080/00032719.2018.1500581

- Lobo, P. C., Vieira, I. P., Pichard, C., Marques, B. S., Gentil, P., da Silva, E. L., & Pimentel, G. D. (2021). Ursolic acid has no additional effect on muscle strength and mass in active men undergoing a high-protein diet and resistance training: A double-blind and placebo-controlled trial. *Clin Nutr*, *40*(2), 581-589. doi: 10.1016/j.clnu.2020.06.004..
- López-Fontana, C. M., Martínez-González, M. A., & Martínez, J. A. (2003). Obesidad, metabolismo energético y medida de la actividad física. *Revista Española de Obesidad*, *1*(1), 29-36
- López-Huertas, E., Teucher, B., Boza, J. J., Martínez-Férez, A., Majsak-Newman, G., Baró, L., ... & Fairweather-Tait, S. (2006). Absorption of calcium from milks enriched with fructo-oligosaccharides, caseinophosphopeptides, tricalcium phosphate, and milk solids. *Am J Clin Nutr*, *83*(2), 310-316. doi:10.1093/ajcn/83.2.310
- López-Villodres JA, Abdel-Karim M, De La Cruz JP, Rodríguez-Pérez MD, Reyes JJ, Guzmán-Moscoso R et al. Effects of hydroxytyrosol on cardiovascular biomarkers in experimental diabetes mellitus. *J. Nutr. Biochem. Elsevier Inc.*; 2016 Nov 1; 37:94–100. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.07.015
- López, D. N., Galante, M., Robson, M., Boeris, V., & Spelzini, D. (2018). Amaranth, quinoa and chia protein isolates: Physicochemical and structural properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, *109*, 152–159. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.080
- Lorenzen, J. K., Jensen, S. K., & Astrup, A. (2014). Milk minerals modify the effect of fat intake on serum lipid profile: results from an animal and a human short-term study. *Br J Nutr*, *111*(8), 1412-1420. doi:10.1017/S0007114513003826
- Losoya S.C., Chacón G.L., Tuirán G.G., Rodriguez V.A. (2016). Ácidos grasos sus beneficios en una buena nutrición [Internet]. *CienciAcierta Revista de Divulgación Científica*, Universidad Autónoma de Coahuila. [citado 10 marzo 2017]. Disponible en: <http://www.cienciacierta>
- Lotfi, K., Saneei, P., Hajhashemy, Z., & Esmailzadeh, A. (2022). Adherence to the Mediterranean Diet, Five-Year Weight Change, and Risk of Overweight and Obesity: A Systematic Review and Dose–Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Adv Nutr*, *13*(1), 152-166. doi: 10.1093/advances/nmab092
- Lu, Y., & Foo, L. Y. (2002). Polyphenolics of Salvia—a review. *Phytochemistry*, *59*(2), 117-140. doi:10.1016/S0031-9422(01)00415-0
- Segura-Campos, M. R., Salazar-Vega, I. M., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2013). Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *LWT-Food Science and Technology*, *50*(2), 723-731. doi: 10.1016/j.lwt.2012.07.017
- Makris, D. P., & Rossiter, J. T. (2001). Comparison of quercetin and a non-orthohydroxy flavonol as antioxidants by competing in vitro oxidation reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(7), 3370-3377. doi:10.1021/jf0101071
- Mancha-Ramirez, A. M., & Slaga, T. J. (2016). Ursolic acid and chronic disease: an overview of UA's effects on prevention and treatment of obesity and cancer. In: Gupta, S., Prasad, S., Aggarwal, B. (eds) *Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases. Adv Exp Med Biol*, 928:75-96. doi: 10.1007/978-3-319-41334-1_4
- Mangano, K. M., Sahni, S., Kiel, D. P., Tucker, K. L., Dufour, A. B., & Hannan, M. T. (2015). Bone mineral density and protein-derived food clusters from the Framingham Offspring Study. *J Acad Nutr Diet*, *115*(10), 1605-1613. doi:10.1016/j.jand.2015.04.001
- Marangoni, F., Pellegrino, L., Verduci, E., Ghiselli, A., Bernabei, R., Calvani, R., ... & Poli, A. (2019). Cow's milk consumption and health: a health professional's guide. *J Am Coll Nutr*, *38*(3), 197-208. doi:10.1080/07315724.2018.1491016
- Marrodán, M. D., Martínez-Álvarez, J. R., Villarino, A., Alférez-García, I., González-Montero de Espinosa, M., López-Ejeda, N., Sánchez-Álvarez, M., & Cabañas, M. D. (2013). Utilidad de los datos antropométricos auto-declarados para la evaluación de la obesidad en la población española: estudio EPINUT-ARKOPHARMA. *Nutrición Hospitalaria*, *28*(3), 676-682. doi: 10.3305/nh.2013.28.3.6197
- Martín Moreno, V., Gómez Gandoy, J. B., & Antoranz González, M. J. (2001). Medición de la grasa corporal mediante impedancia bioeléctrica, pliegues cutáneos y ecuaciones a partir de medidas antropométricas. Análisis comparativo. *Revista española de salud pública*, *75*, 221-236
- Martínez de Victoria, E. (2016). El calcio, esencial para la salud. *Nutr Hosp*, *33*, 26-31. doi:10.20960/nh.341
- Martínez-Cruz, O., & Paredes-López, O. (2014). Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, *1346*, 43-48. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.007
- Martinez-Lacoba, R., Pardo-Garcia, I., Amo-Saus, E., & Escribano-Sotos, F. (2018). Mediterranean diet and health outcomes: A systematic meta-review. *European journal of public health*, *28*(5), 955-961. doi:10.1093/eurpub/cky113
- Martínez, M. A., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., Anadón, A., Casado, V., Vazquez, L., Martín, D., Reglero, G., Torres, C. (2018) Acute and repeated dose (28 days) oral safety studies of phosphatidyl-hydroxytyrosol. *Food Chem. Toxicol*, *120*, 462–471. doi:10.1016/j.fct.2018.07.046

- Martirosyan, D. M., Miroshnichenko, L. A., Kulakova, S. N., Pogojeva, A. V., & Zoloedov, V. I. (2007). Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. *Lipids Health Dis*, 6(1), 1-12. doi:10.1186/1476-511X-6-1
- Mataix Verdú, J., & Pérez Llamas, F. (2002). Alimentos del futuro: alimentos funcionales y transgénicos. MATAIX VERDÚ, J., Nutrición y alimentación humana, Ergon, Madrid; Págs. 421-446
- McClements, D. J. (2020). Advances in nanoparticle and microparticle delivery systems for increasing the dispersibility, stability, and bioactivity of phytochemicals. *Biotechnology advances*, 38, 107287. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.08.004
- McPherson, R. A., & Pincus, M. R. (2021). Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods E-book. Elsevier Health Sciences. 24th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; chap 20
- Melo, D., Machado, T. B., & Oliveira, M. B. P. (2019). Chia seeds: An ancient grain trending in modern human diets. *Food Funct*, 10(6), 3068-3089. doi:10.1039/C9FO00239A
- Mendoza, N. (2012). Importancia de obtener las cantidades de vitamina D que necesitamos. Encuentro Nacional de Salud y Medicina de la Mujer.
- Menga, V., Amato, M., Phillips, T. D., Angelino, D., Morreale, F., & Fares, C. (2017). Gluten-free pasta incorporating chia (*Salvia hispanica* L.) as thickening agent: An approach to naturally improve the nutritional profile and the in vitro carbohydrate digestibility. *Food Chem*, 221, 1954-1961. doi:10.1016/j.foodchem.2016.11.151
- Milan, G., Romanello, V., Pescatore, F., Armani, A., Paik, J. H., Frasson, L., Seydel, A., Zhao, J., Abraham, R., Goldberg, A. L., Blaauw, B., DePinho R. A., & Sandri, M. (2015). Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nat Commun*, 6(1), 1-14. doi:10.1038/ncomms7670. doi.org/10.1038/ncomms7670
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente (MAGRAMA). Consumo de derivados lácteos. 2014. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/es/megustalaleche/estudios_e_informes/Ficha_de_consumo_DERIVADOS_LÁCTEOS_TAM:Marzo_2013_tcm7-285252.pdf
- Mohamed, D. A., Mohamed, R. S., & Fouda, K. (2020). Anti-inflammatory potential of chia seeds oil and mucilage against adjuvant-induced arthritis in obese and non-obese rats. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol*, 31(4). doi:10.1515/jbcpp-2019-0236
- Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., & Sahu, P. S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health—A review. *Saudi J Biol Sci*, 23(5), 577-583. doi:10.1016/j.sjbs.2015.06.005
- Ali, N. M., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Beh, B. K., Tan, S. W., & Tan, S. G. (2012). The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *J. Biomed. Biotechnol*, 2012. doi:10.1155%2F2012%2F171956
- Monroy-Torres, R., Mancilla-Escobar, M. L., Gallaga-Solórzano, J. C., & Santiago-García, E. J. (2008). Protein digestibility of chia seed *Salvia hispanica* L. *Rev. Salud Pública Nutr*, 9(1), 1-9
- Montoya-Rodríguez, A., Gómez-Favela, M. A., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J., & González de Mejía, E. (2015). Identification of bioactive peptide sequences from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed proteins and their potential role in the prevention of chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(2), 139-158. doi:10.1111/1541-4337.12125
- Morales, J., Valenzuela, R., González, D., González, M., Tapia, G., Sanhueza, J., & Valenzuela, A. (2012). Nuevas fuentes dietarias de ácido alfa-linolénico: una visión crítica. *Rev Chil Nutr*, 39(3), 79-87. Disponible: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S07175182012000300012&script=sci_arttext&tlang=pt
- Moreira, R., Chenlo, F., Prieto, D. M., & Torres, M. D. (2012). Water adsorption isotherms of chia (*Salvia hispánica* L.) seeds. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 1077-1082. doi:10.1007/s11947-010-0400-y
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L., & Cuadrado, C. (2016). Ingestas diarias recomendadas de energía y nutrientes para la población española (Recommended daily energy and nutrient intakes for the Spanish population): Pyramid editions. In *Pyramid Editions*
- Muhammad, I., Muhammad, N., Manzoor, M. F., Amna, J., Zafar, A., Akhtar, M. N., Muhammad, A., Yasir, H. (2016). Fatty acids characterization, oxidative perspectives and consumer acceptability of oil extracted from pre-treated chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Lipids Health Dis*, 15(162).
- Högler, W. (2016). Global consensus recommendations on prevention and management of nutritional rickets. *J Clin Endocrinol Metab*, 101(2), 394-415. doi:10.1210/jc.2015-2175
- Muñoz-González, I., Merino-Álvarez, E., Salvador, M., Pintado, T., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F., & Herrero, A. M. (2019). Chia (*Salvia hispanica* L.) a promising alternative for conventional and gelled emulsions: Technological and lipid structural characteristics. *Gels*, 5(2), 19. doi:10.3390/gels5020019
- Muñoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O., & Aguilera, J. M. (2012). Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *Journal of Food Engineering*, 108, 216-224. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.06.037
- Özcan, M. M., Al-Juhaimi, F. Y., Ahmed, I. A. M., Osman, M. A., & Gasseem, M. A. (2019). Effect of different microwave power setting on quality of chia seed oil obtained in a cold press. *Food Chem*, 278, 190-196. doi:10.1016/j.foodchem.2018.11.048

- Musa-Veloso, K., Binns, M. A., Kocenas, A., Chung, C., Rice, H., Oppedal-Olsen, H., Lloyd, H., Lemke, S. (2011). Impact of low v. moderate intakes of long-chain n-3 fatty acids on risk of coronary heart disease. *Br J Nutr*, 106(8), 1129-1141. doi:10.1017/S0007114511001644
- Nap.edu. Dietary reference intakes (DRIs): recommended intakes for individuals, vitamins. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies; 2004. Disponible en: <http://iom.edu/Activities/Nutrition/Summary>
- Nap.edu. Dietary reference intakes: vitamins. Washington: The National Academies; 2001. Disponible en: <http://www.iom.edu/Global/News%20Announcements/~media/474B28C39EA34C43A60A6D42CCE07427.ashx>
- National Institutes of Health. Nutrients recommendations: dietary reference intakes (DRI). 2015. Disponible en: http://ods.od.nih.gov/Health_Information/Dietary_Reference_Intakes.aspx/
- Niers, L., Stasse-Wolthuis, M., Rombouts, F. M., & Rijkers, G. T. (2007). Nutritional support for the infant's immune system. *Nut Rev*, 65(8), 347-360. <https://doi:10.1111/j.1753-4887.2007.tb00313.x>
- Nikmaram, N., Roohinejad, S., Hashemi, S., Koubaa, M., Barba, F. J., Abbaspourrad, A., & Greiner, R. (2017). Emulsion-based systems for fabrication of electrospun nanofibers: Food, pharmaceutical and biomedical applications. *RSC advances*, 7(46), 28951-28964. doi:10.1039/C7RA00179G
- Norlailly, M. A., Swee, K. Y., Wan, Y. H., Boon, K. B., Sheau, W., & Soon, G. (2012). The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1-9. doi:10.1155%2F2012%2F171956
- Noshe, A. S., & Al-Bayyar, A. H. (2017). Effect of extraction method of Chia seeds Oil on its content of fatty acids and antioxidants. *Int. Res. J. Eng. Technol*, 234, 1-9.
- O'Neill, D. C., Cronin, O., O'Neill, S. B., Woods, T., Keohane, D. M., Molloy, M. G., & Falvey, E. C. (2016). Application of a sub-set of skinfold sites for ultrasound measurement of subcutaneous adiposity and percentage body fat estimation in athletes. *Int J Sports Med*, 37(05), 359-363. doi:10.1055/s-0035-1565168.
- O'Riordan, N., Kane, M., Joshi, L., & Hickey, R. M. (2014). Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation. *Glycobiology*, 24(3), 220-236. doi:10.1093/glycob/cwt162
- Ogasawara, R., Sato, K., Higashida, K., Nakazato, K., & Fujita, S. (2013). Ursolic acid stimulates mTORC1 signaling after resistance exercise in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 305(6), E760-E765. doi:10.1152/ajpendo.00302.2013.
- Ojeda, D., Jiménez-Ferrer, E., Zamilpa, A., Herrera-Arellano, A., Tortoriello, J., & Alvarez, L. (2010). Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin-and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *J Ethnopharmacol*, 127(1), 7-10. doi: 10.1016/j.jep.2009.09.059
- Oleszek, W. (2002). Dietary phytochemicals and human health. *Phytochem. Rev*, 1, 163-166.
- Oliva, M. E., Ferreira, M. R., Chicco, A., & Lombardo, Y. B. (2013). Dietary Salba (*Salvia hispanica* L) seed rich in α -linolenic acid improves adipose tissue dysfunction and the altered skeletal muscle glucose and lipid metabolism in dyslipidemic insulin-resistant rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat*, 89(5), 279-289. doi:10.1016/j.plefa.2013.09.010
- Olivos-Lugo, B. L., Valdivia-López, M. A., & Tecante, A. (2010). Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). *Food Sci. Technol. Int*, 16(1), 89-96. doi:10.1177%2F1082013209353087
- OMS. (2012). IPAQ. International Physical Activity Questionnaire (versión 2.0. español). Recuperado de <http://www.who.int/chp/steps/instrument/es/index/html>
- Organización Mundial de la Salud (OMS); FAO. (2007) Análisis de riesgos relativos a la inocuidad de los alimentos: Guía para las Autoridades Nacionales de Inocuidad de los Alimentos
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD Guidelines for Testing of Chemicals, N° 408, Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents; OECD: Paris, France, 21 September 1998.
- Orona-Tamayo, D., Valverde, M. E., Nieto-Rendón, B., & Paredes-López, O. (2015). Inhibitory activity of chia (*Salvia hispanica* L.) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 236-242. doi: 10.1016/j.lwt.2015.05.033
- Ortega Anta, R. M., Rodríguez, L. G. G., Ortega, A. I. J., Conde, L. P. O., Vizuete, A. A., & Sobaler, A. M. L. (2012). Adecuación de la ingesta de calcio en una muestra representativa de la población española de 7 a 16 años. Evolución en el aporte de calcio y en las fuentes alimentarias del mineral que se producen con la edad. *Rev Esp Nutr Comunitaria*, 18(4), 196-204
- Ortega Anta, R. M., González Rodríguez, L. G., Navia Lombán, B., Perea Sánchez, J. M., Aparicio Vizuete, A., & López Sobaler, A. M. (2013). Ingesta de calcio y vitamina D en una muestra representativa de mujeres españolas: problemática específica en menopausia. *Nut Hosp*, 28(2), 306-313. doi:10.3305/nh.2013.28.2.6286
- Ortega, R. M., González-Rodríguez, L., Jiménez Ortega, A., Perea Sánchez, J., & Bermejo López, L. (2012). Implicación del consumo de lácteos en la adecuación de la dieta y de la ingesta de calcio y nutrientes en niños españoles. *Nutr. clín. diet. Hosp*, 32(2):28-36.
- Ortega, R. M., Requejo, A. M., & Navia, B. (2014). Ingestas diarias recomendadas de energía y nutrientes para la población española. Madrid: Departamento de Nutrición, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

- Ortiz de Montellano, B. R. (1978). Aztec cannibalism: An ecological necessity? *Science*, *200*, 611–617. doi:10.1126/science.200.4342.611
- Pal, S., Woodford, K., Kukuljan, S., & Ho, S. (2015). Milk intolerance, beta-casein and lactose. *Nutrients*, *7*(9), 7285–7297. doi:10.3390/nu7095339
- Papadaki, A., Nolen-Doerr, E., & Mantzoros, C. S. (2020). The effect of the Mediterranean diet on metabolic health: a systematic review and meta-analysis of controlled trials in adults. *Nutrients*, *12*(11), 3342. doi:10.3390/nu12113342
- Parkinson, L., & Cicerale, S. (2016). The health benefiting mechanisms of virgin olive oil phenolic compounds. *Molecules*, *21*(12), 1734. doi:10.3390/molecules21121734. doi:10.3390/molecules21121734
- Parlamento EU. C1 Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on Nutrition and Health Claims made on Foods. 2006. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX%3A32006R1924>.
- Paško, P., Sajewicz, M., Gorinstein, S., & Zachwieja, Z. (2008). Analysis of selected phenolic acids and flavonoids in *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* seeds and sprouts by HPLC. *Acta chromatogr*, *20*(4), 661–672. doi:10.1556/achrom.20.2008.4.11
- Pastell, H., Putkonen, T., & Rita, H. (2019). Dietary fibre in legumes, seeds, vegetables, fruits and mushrooms: Comparing traditional and semi-automated filtration techniques. *Food Compos. Anal*, *75*, 1–7. doi: 10.1016/j.jfca.2018.09.011
- Patterson, E., Larsson, S. C., Wolk, A., & Åkesson, A. (2013). Association between dairy food consumption and risk of myocardial infarction in women differs by type of dairy food. *J Nutr*, *143*(1), 74–79. doi:10.3945/jn.112.166330
- Pawlak, R., Parrott, S. J., Raj, S., Cullum-Dugan, D., & Lucas, D. (2013). How prevalent is vitamin B12 deficiency among vegetarians?. *Nut Rev*, *71*(2), 110–117. doi:10.1111/nure.12001
- Peiretti, P. G., & Gai, F. (2009). Fatty acid and nutritive quality of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds and plant during growth. *Anim. Feed Sci Technol*, *148*(2–4), 267–275. doi:10.1016/j.anifeedsci.2008.04.006
- Penalvo, J. L., Oliva, B., Sotos-Prieto, M., Uzhova, I., Moreno-Franco, B., León-Latre, M., & Ordovás, J. M. (2015). La mayor adherencia a un patrón de dieta mediterránea se asocia a una mejora del perfil lipídico plasmático: la cohorte del Aragon Health Workers Study. *Revista Española de Cardiología*, *68*(4), 290–297. doi:10.1016/j.recesp.2014.09.018
- Phelan, M., & Kerins, D. (2011). The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food Funct*, *2*(3–4), 153–167. doi:10.1039/C1FO10017C
- Pigni, N. B., Aranibar, C., Mas, A. L., Aguirre, A., Borneo, R., Wunderlin, D., & Baroni, M. V. (2020). Chemical profile and bioaccessibility of polyphenols from wheat pasta supplemented with partially-deoiled chia flour. *LWT*, *124*, 109134. doi:10.1016/j.lwt.2020.109134
- Pirozzi, C., Lama, A., Simeoli, R., Paciello, O., Pagano, T. B., Mollica, M. P., Di Guida, F., Russo, R., Magliocca, S., Canani, R. B., Raso, G. M., Calignano, A. & Meli, R. (2016). Hydroxytyrosol prevents metabolic impairment reducing hepatic inflammation and restoring duodenal integrity in a rat model of NAFLD. *J. Nutr. Biochem*, *30*, 108–115. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.12.004
- Plimmer, R.H.A. The chemical composition of the proteins. In *Monographs on Biochemistry. Part I. Analysis*, 2nd ed.; Longmans, Green and Co.: London, UK, 1908; p. 82.
- Porrás-Loaiza, P., Jiménez-Munguía, M. T., Sosa-Morales, M. E., Palou, E., & López-Malo, A. (2014). Physical properties, chemical characterization and fatty acid composition of Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *International Journal of Food Science and Technology*, *49*(2), 571–577. doi:10.1111/ijfs.12339
- Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Režek Jambrak, A., Barba, F. J., Cravotto, G., Binello, A., Lorenzo, J. M., & Špigelman, A. (2017). Innovative “green” and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from citrus wastes—A review. *Molecules*, *22*(5), 680. doi:10.3390/molecules22050680
- Qiao, X., Zhang, Y. T., Ye, M., Wang, B. R., Han, J., & Guo, D. A. (2009). Analysis of chemical constituents and taxonomic similarity of *Salvia* species in China using LC/MS. *Planta Med*, *75*(15), 1613–1617. doi:10.1055/s-0029-1185866
- Radhiga, T., Rajamanickam, C., Senthil, S., & Pugalendi, K. V. (2012). Effect of ursolic acid on cardiac marker enzymes, lipid profile and macroscopic enzyme mapping assay in isoproterenol-induced myocardial ischemic rats. *Food Chem Toxicol*, *50*(11), 3971–3977. doi: 10.1016/j.fct.2012.07.067
- Rajput, R., Bhullar, H. K., Kaur, A. T., & Kaur, J. T. (2021). Chia Seeds: Composition, health benefits, and potential applications. In *Cereals and Cereal-Based Foods* (pp. 123–150). Apple Academic Press.
- Ramírez-Ramírez, J. C., Rosas Ulloa, Petra., Velazquez Gonzalez, M. y., Ulloa, J A., & Arce Romero, Francisco (2011). bacterias lácticas: Importancia en Alimentos y sus efectos en la salud. Conacyt.
- Ramirez-Rodriguez, A. M., González-Ortiz, M., Martínez-Abundis, E., & Acuña Ortega, N. (2017). Effect of ursolic acid on metabolic syndrome, insulin sensitivity, and inflammation. *J Med Food*, *20*(9), 882–886
- Rana, S., Gupta, S., Rana, A., Bhushan, S. (2015). Functional properties, phenolic constituents and antioxidant potential of industrial apple pomace for utilization as active food ingredient. *Food Sci. Hum. Wellness*, *4*(4):180– 87. doi: 10.1016/j.fshw.2015.10.001

- Rao, S. S., Singh, R. B., Takahashi, T., Juneja, L. R., Fedacko, J., & Shewale, A. R. (2019). Economic burden of noncommunicable diseases and economic cost of functional foods for prevention. In *The Role of Functional Food Security in Global Health* (pp. 57-68). Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-813148-0.00004-9
- Rao, V. S., de Melo, C. L., Queiroz, M. G. R., Lemos, T. L., Menezes, D. B., Melo, T. S., & Santos, F. A. (2011). Ursolic acid, a pentacyclic triterpene from *Sambucus australis*, prevents abdominal adiposity in mice fed a high-fat diet. *J Med Food*, 14(11), 1375-1382. doi: 10.1089/jmf.2010.0267.
- Ray, N. B., Lam, N. T., Luc, R., Bonvino, N. P., & Karagiannis, T. C. (2015). Cellular and molecular effects of bioactive phenolic compounds in olives and olive oil. In *Olive and olive oil bioactive constituents* (pp. 53-91). AOCS Press. doi:10.1016/B978-1-63067-041-2.50009-4
- Rees, K., Hartley, L., Flowers, N., Clarke, A., Hooper, L., Thorogood, M., & Stranges, S. (2013). 'Mediterranean'dietary pattern for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database of Syst Rev*, (8).
- Rees, K., Takeda, A., Martin, N., Ellis, L., Wijesekara, D., Vepa, A., Das, A., Hartley, L., & Stranges, S. (2019). Mediterranean-style diet for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database of Syst Rev*, (3). doi: 10.1002/14651858.CD009825.pub3
- Reglamento de Ejecución (UE) nº2016/81903 PRIETO Bolivar, F (2017). mercados nacionales e internacionales del aceite de oliva.
- Reid, I. R., Birstow, S. M., & Bolland, M. J. (2017) Calcium and cardiovascular disease. *Endocrinol Metab (Seoul)* 32 (3): 339-49. doi: 10.3803/EnM.2017.32.3.339
- Reyes-Garcia, R., Mendoza, N., Palacios, S., Salas, N., Quesada-Charneco, M., Garcia-Martin, A., Fonolla, J., Lara-Villoslada, F., & Muñoz-Torres, M. (2018). Effects of daily intake of calcium and vitamin D-enriched milk in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled, double-blind nutritional study. *J Womens Health*, 27(5), 561-568. doi: 10.1089/jwh.2017.6655
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia-López, M. A. (2008). Dietary fiber and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican Chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107, 656-663.
- Reyna-Villasmil, E., Torres-Cepeda, D., Santos-Bolívar, J., Mejía-Montilla, J., Reyna-Villasmil, N., & Fernández-Ramírez, A. (2016). Concentraciones plasmáticas de isoprostano-8 en preeclampsia y eclampsia. *Perinatol Reprod Hum*, 30(4), 180-185. doi: 10.1016/j.rprh.2016.10.001
- Rietjens, S. J., Bast, A., & Haenen, G. R. (2007). New insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol. *J. Agric. Food Chem*, 55(18), 7609-7614. doi:10.1021/jf0706934
- Rizzo, N. S., Jaceldo-Siegl, K., Sabate, J., & Fraser, G. E. (2013). Nutrient profiles of vegetarian and nonvegetarian dietary patterns. *J Acad Nutr Diet*, 113(12), 1610-1619
- Rizzoli, R. (2014). Dairy products, yogurts, and bone health. *Am J Clin Nutr*, 99(5), 1256S-1262S
- Robles-Almazan, M., Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C., Rodriguez-Garcia, C., Quiles, J. L., & Ramirez-Tortosa, M. (2018). Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Research International*, 105, 654-667. doi:10.1016/j.foodres.2017.11.053
- Rodrigo, R., Miranda, A., & Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clin Chim Acta*, 412(5-6), 410-424. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898110007199>
- Rodríguez Huertas, J., Rodríguez Lara, A., González Acevedo, O., & Mesa, M. D. (2019). Leche y productos lácteos como vehículos de calcio y vitamina D: papel de las leches enriquecidas. *Nutr Hosp*, 36(4), 962-973. doi:10.20960/nh.02570
- Rodríguez-Morató, J., Xicota, L., Fitó, M., Farré, M., Dierssen, M., & De la Torre, R. (2015). Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules*, 20(3), 4655-4680. doi:10.3390/molecules20034655
- Rodríguez-Rodríguez, E., Lombán, B. N., & López-Sobaler, A. M. (2010). Review and future perspectives on recommended calcium intake. *Nutr Hosp*, 25(3), 366-374
- Rodríguez-Rodríguez, R., Herrera, M. D., De Sotomayor, M. A., & Ruiz-Gutierrez, V. (2007). Pomace olive oil improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats by increasing endothelial nitric oxide synthase expression. *Am. J. Hypertens*, 20(7), 728-734. doi: 10.1016/j.amjhyper.2007.01.012
- Romero, M., Toral, M., Gómez-Guzmán, M., Jiménez, R., Galindo, P., Sánchez, M., ... & Duarte, J. (2016). Antihypertensive effects of oleuropein-enriched olive leaf extract in spontaneously hypertensive rats. *Food & Funct*, 7(1), 584-593. doi:10.1039/c5fo01101
- Rossi, A. S., Oliva, M. E., Ferreira, M. R., Chicco, A., & Lombardo, Y. B. (2013). Dietary chia seed induced changes in hepatic transcription factors and their target lipogenic and oxidative enzyme activities in dyslipidaemic insulin-resistant rats. *Br. J. Nutr*, 109(9), 1617-1627
- Rovati, A., Escobar, E., & Prado, C. (2012). Particularidades de la semilla de chía (*Salvia hispanica* L.). *Avance Agroindustrial*, 33(3), 39-43.

- Rutherford, S. M., Fanning, A. C., Miller, B. J., & Moughan, P. J. (2015). Protein digestibility-corrected amino acid scores and digestible indispensable amino acid scores differentially describe protein quality in growing male rats. *J Nutr*, *145*(2), 372-379.
- Samani, M. R., D'Urso, G., Montoro, P., Pirbalouti, A. G., & Piacente, S. (2021). Effects of bio-fertilizers on the production of specialized metabolites in *Salvia officinalis* L. leaves: An analytical approach based on LC-ESI/LTQ-Orbitrap/MS and multivariate data analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *197*, 113951
- Sanchez-Rodriguez, E., Lima-Cabello, E., Biel-Glesson, S., Fernandez-Navarro, J. R., Calleja, M. A., Roca, M., Espejo-Calvo, J. A., Gil-Extremera, B., Soria-Florido, M., De la Torre, R., Fito, M., Covas, M. I., Alche, J. D., Martínez de Victoria, E., Gil, A., & Mesa, M. D. (2018). Effects of virgin olive oils differing in their bioactive compound contents on metabolic syndrome and endothelial functional risk biomarkers in healthy adults: a randomized double-blind controlled trial. *Nutrients*, *10*(5), 626. doi:10.3390/nu11030561
- Sánchez-Rodríguez, E., Mesa, M., Sanchez-Rodriguez, E., María, C., & García, D. (2018). Compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen. *Nutr Clin*, *12*(2-2018), 80-94. doi:10.7400/NCM.2018.12.2.5064
- Sandoval-Oliveros, M. R., & Paredes-López, O. (2013). Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *J. Agric. Food Chem*, *61*(1), 193–201. doi:10.1021/jf3034978
- Sato, Y., Iki, M., Fujita, Y., Tamaki, J., Kouda, K., Yura, A., ... & Kurumatani, N. (2015). Greater milk intake is associated with lower bone turnover, higher bone density, and higher bone microarchitecture index in a population of elderly Japanese men with relatively low dietary calcium intake: Fujiwara-kyo Osteoporosis Risk in Men (FORMEN) Study. *Osteoporosis Int*, *26*(5), 1585-1594.
- Schwingshackl, L., Lampousi, A. M., Portillo, M. P., Romaguera, D., Hoffmann, G., & Boeing, H. (2017). Olive oil in the prevention and management of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies and intervention trials. *Nutrition & diabetes*, *7*(4), e262-e262. doi:10.1038/nutd.2017.12
- Schwingshackl, L., Chaimani, A., Hoffmann, G., Schwedhelm, C., & Boeing, H. (2018). A network meta-analysis on the comparative efficacy of different dietary approaches on glycaemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *European journal of epidemiology*, *33*(2), 157-170
- Scoditti, E., Nestola, A., Massaro, M., Calabriso, N., Storelli, C., De Caterina, R., & Carluccio, M. A. (2014). Hydroxytyrosol suppresses MMP-9 and COX-2 activity and expression in activated human monocytes via PKC α and PKC β 1 inhibition. *Atherosclerosis*, *232*(1), 17-24. [Consultada: 2021 May 26];232(1):17–24. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.10.017
- Seguí Díaz, M. (2014) Prevención de la diabetes tipo 2 mediante la dieta mediterránea y grasas vegetales: El estudio PREDIMED (PREvención con DIeta MEDiterránea). *SEMERGEN, Soc. Esp. Med. Rural Gen.*, 278-279. doi: 10.1016/j.semerg.2014.04.009
- Segura-Campos, M. R., Salazar-Vega, I. M., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2013). Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *LWT-Food Science and Technology*, *50*(2), 723-731.
- Senthil, S., Sridevi, M., & Pugalendi, K. V. (2007). Protective effect of ursolic acid against myocardial ischemia induced by isoproterenol in rats. *Toxicol Mech Methods*, *17*(1), 57-65. doi: 10.1080/15376510600822649
- Seo, D. Y., Lee, S. R., Heo, J. W., No, M. H., Rhee, B. D., Ko, K. S., Kwak, H. B., & Han, J. (2018). Ursolic acid in health and disease. *Korean J Physiol Pharmacol*, *22*(3), 235-248. doi: 10.4196/kjpp.2018.22.3.235.
- Serrano, M. E. D., López, M. L., & Espuñes, T. D. R. S. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, *37*(4), 58-68. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57937408>
- Sheldon, W. H., Stevens, S. S., & Tucker, W. B. (1940). *The Varieties of Human Physique*. New York and London: Harper and Bros
- Shen, Y., Feng, Z., Yang, M., Zhou, Z., Han, S., Hou, J., Li, Z., Wu, W., & Guo, D. A. (2018). Rapid profiling of polymeric phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* by hybrid data-dependent/targeted multistage mass spectrometry acquisition based on expected compounds prediction and fragment ion searching. *J. Sep. Sci*, *41*(8), 1888-1895.
- Sierra, L., Roco, J., Alarcon, G., Medina, M., Van Nieuwenhove, C., de Bruno, M. P., & Jerez, S. (2015). Dietary intervention with *Salvia hispanica* (Chia) oil improves vascular function in rabbits under hypercholesterolaemic conditions. *J Funct Foods*, *14*, 641-649.
- Singh, J. P., Kaur, A., Singh, B., Singh, N., & Singh, B. (2019). Physicochemical evaluation of corn extrudates containing varying buckwheat flour levels prepared at various extrusion temperatures. *J. Food Sci. Technol*, *56*(4), 2205-2212.
- Skodje, G. I., Sarna, V. K., Minelle, I. H., Rolfsen, K. L., Muir, J. G., Gibson, P. R., Veierod, M. B., Henriksen, C., & Lundin, K. E. A. (2018). Fructan, rather than gluten, induces symptoms in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity. *Gastroenterology*, *154*(3), 529-539. doi: 10.1053/j.gastro.2017.10.040
- Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC). (2001) *Guías Alimentarias para la Población Española*
- Soedamah-Muthu, S. S., & De Goede, J. (2018). Dairy consumption and cardiometabolic diseases: systematic review and updated meta-analyses of prospective cohort studies. *Curr Nutr Rep*, *7*(4), 171-182

- Soerensen, K. V., Thorning, T. K., Astrup, A., Kristensen, M., & Lorenzen, J. K. (2014). Effect of dairy calcium from cheese and milk on fecal fat excretion, blood lipids, and appetite in young men. *Am J Clin Nutr*, 99(5), 984-991
- Sofi, F., Abbate, R., Gensini, G. F., & Casini, A. (2010). Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 92(5), 1189-1196. doi:10.3945/ajcn.2010.29673
- Solorzano-Santos, Reyes-Jurado, F., Palou, E., & López-Malo, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(1), 68-78
- Soni, M. G., Burdock, G. A., Christian, M. S., Bitler, C. M., & Crea, R. (2006). Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food Chem. Toxicol*, 44(7), 903-915
- Soysal, P., Hurst, C., Demurtas, J., Firth, J., Howden, R., Yang, L., Tully, M. A., Koyanagi, A., Ilie, P. C., López-Sánchez, G. F., Schwingshackl, L., Veronese, N., & Smith, L. (2021). Handgrip strength and health outcomes: Umbrella review of systematic reviews with meta-analyses of observational studies. *J Sport Health Sci*, 10(3), 290-295. doi: 10.1016/j.jshs.2020.06.009
- Spencer, E. A., Appleby, P. N., Davey, G. K., & Key, T. J. (2003). Diet and body mass index in 38 000 EPIC-Oxford meat-eaters, fish-eaters, vegetarians and vegans. *International journal of obesity*, 27(6), 728-734
- Stephen, A. M., Champ, M. M. J., Cloran, S. J., Fleith, M., Van Lieshout, L., Mejbourn, H., & Burley, V. J. (2017). Dietary fibre in Europe: current state of knowledge on definitions, sources, recommendations, intakes and relationships to health. *Nutr Res Rev*, 30(2), 149-190.
- Storniolo, C. E., Casillas, R., Bulló, M., Castañer, O., Ros, E., Sáez, G. T., ... & Moreno, J. J. (2017). A Mediterranean diet supplemented with extra virgin olive oil or nuts improves endothelial markers involved in blood pressure control in hypertensive women. *Eur J Nutr*, 56(1), 89-97. doi:10.1007/s00394-015-1060-5
- Sureda, A., Bibiloni, M. D. M., Martorell, M., Buil-Cosiales, P., Marti, A., Pons, A., ... & PREDIMED Study Investigators. (2016). Mediterranean diets supplemented with virgin olive oil and nuts enhance plasmatic antioxidant capabilities and decrease xanthine oxidase activity in people with metabolic syndrome: The PREDIMED study. *Molecular nutrition & food research*, 60(12), 2654-2664. doi:10.1002/mnfr.201600450
- Suri, S., Passi, S. J., & Goyat, J. (2016, March). Chia seed (*Salvia hispanica* L.)—A new age functional food. In *4th International Conference on Recent Innovations in Science Engineering and Management* (Vol. 4, pp. 286-299)
- Szilagyi, A., Galiatsatos, P., & Xue, X. (2016). Systematic review and meta-analysis of lactose intolerance and nutritional effects of dairy food restriction in inflammatory bowel diseases. *Nutr J*, 15, 67
- Taga, M. S., Miller, E. E., & Pratt, D. E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61, 928-931. doi:10.1007/BF02542169
- Tahergorabi, R., Matak, K. E., Jaczynski, J. (2015). Fish protein isolate: development of functional foods with nutraceutical ingredients. *J. Funct. Foods* 18:746-56. doi: 10.1016/j.jff.2014.05.006
- Tang, C., Wang, X., Qin, L. Q., & Dong, J. Y. (2021). Mediterranean diet and mortality in people with cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Nutrients*, 13(8), 2623. doi: 10.3390/nu13082623.
- Tapia-Hernández, J. A., Del-Toro-Sánchez, C. L., Cinco-Moroyoqui, F. J., Ruiz-Cruz, S., Juárez, J., Castro-Enríquez, D. D., Barreras-Urbina, C. G., López-Ahumada, G. A., & Rodríguez-Félix, F. (2019). Gallic acid-loaded zein nanoparticles by electrospraying process. *J Food Sci*, 84(4), 818-831. doi: 10.1111/1750-3841.14486
- Tejada, S., Pinya, S., del Mar Bibiloni, M., A Tur, J., Pons, A., & Sureda, A. (2017). Cardioprotective effects of the polyphenol hydroxytyrosol from olive oil. *Current drug targets*, 18(13), 1477-1486. doi:10.2174/1389450117666161005150650
- Teoh, S. L., Lai, N. M., Vanichkulpitak, P., Vuksan, V., Ho, H., & Chaiyakunapruk, N. (2018). Clinical evidence on dietary supplementation with chia seed (*Salvia hispanica* L.): a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev*, 76(4), 219-242.
- Thorning TK, Raben A, Tholstrup T, Soedamah-Muthu SS, Givens I, Astrup A. Milk and dairy products: good or bad for human health? An assessment of the totality of scientific evidence. *Food Nutr Res* 2016;22; 60:32527.
- Ting, I. P., Brown, J. H., Naqvi, H. H., Kumamoto, J., & Matsumura, M. (1990). Chia: A potential oil crop for arid zones. In H. Naqvi, A. Estilai, & I. P. Ting (Eds.), *New industrial crops and products* (pp. 197-202). Proceedings of the first international conference on new industrial crops and products, riverside, California, USA, October 8-12.
- Toledo E, Hu FB, Estruch R, Buil-Cosiales P, Corella D, Salas-Salvadó J et al. Effect of the Mediterranean diet on blood pressure in the PREDIMED trial: Results from a randomized controlled trial. *BMC Med*. 2013;11(1). doi:10.1186/1741-7015-11-207
- Tsartsou, E., Proutsos, N., Castanas, E., & Kampa, M. (2019). Network meta-analysis of metabolic effects of olive-oil in humans shows the importance of olive oil consumption with moderate polyphenol levels as part of the mediterranean diet. *Frontiers in nutrition*, 6, 6. doi:10.3389/fnut.2019.00006
- Tseng Y-H, CypessAM, Kahn CR. 2010.Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy.Nature Reviews Drug Discovery 9, 465-482. doi:10.1038/nrd3138

- US Department of Agriculture (2004). Seeds, chia seeds, dried. Nutrient Database for Standard Reference, Release 27: Basic Report: 12006. Report Date, March 16, 2015.
- Uyulaşer V, Yildiz G. The Historical Development and Nutritional Importance of Olive and Olive Oil Constituted an Important Part of the Mediterranean Diet. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2014;54(8):1092–101. doi:10.1080/10408398.2011.626874
- Varela-Moreiras G. Libro blanco de la nutrición en España. Madrid: Fundación Española de la Nutrición (FEN) y Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN); 2013.
- Vázquez A, Sánchez-Rodríguez E, Vargas F, Montoro-Molina S, Romero M, Espejo-Calvo JA, Vilchez P, Jaramillo S, Olmo-García L, Carrasco-Pancorbo A, de la Torre R, Fito M, Covas MI, Martínez de Victoria E, Mesa MD. Cardioprotective Effect of a Virgin Olive Oil Enriched with Bioactive Compounds in Spontaneously Hypertensive Rats. *Nutrients.* 2019 Jul 26;11(8):1728. doi: 10.3390/nu11081728.
- Vázquez-Ovando, A., Betancur-Ancona, D., & Chel-Guerrero, L. (2013). Physicochemical and functional properties of a protein-rich fraction produced by dry fractionation of chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *CYTA - Journal of Food, 11*(1), 75–80. doi:10.1080/19476337.2012.692123.
- Vázquez-Ovando, J.A.; Rosado-Rubio, J.G.; Chel-Guerrero, L.A.; Betancur-Ancona, D.A. Procesamiento en seco de harina de chíá (*Salvia hispanica* L.): Caracterización química de fibra y proteína Dry processing of chíá (*Salvia hispanica* L.) flour: Chemical characterization of fiber and protein. *CyTA—J. Food* 2010, 8, 117–127.
- Velasco Vargas, I., Tecante, A., Valdivia-López, M. A., & Aburto-Juárez, M. L. (2004).
- Victora C, Adair L, Fall C, Hallal P, Martorell R, Richter L, et al. Maternal and child undernutrition. Consequences for adult health and human capital. *Lancet* 2008;371:340-57.
- Vidal Carou M, Veciana Nogués M. Alimentos enriquecidos y complementos alimenticios. Manual práctico de Nutrición y Salud. 1ª ed. Madrid: Kátedra Kellogg's; 2012. pp. 131-51.
- Villanueva Sagrado, M. (2010, November). Heath Carter vs Sheldon Darnell falacias y realidades de las técnicas somatotipológicas. In *Anales de Antropología* (Vol. 22, No. 1) doi:10.22201/iaa.24486221e.1985.1.15856
- Visioli F, Poli A, Galli C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.* 2002;22(1):65–75. doi:10.1002/med.1028
- Visioli F, Strata A. Milk, dairy products, and their functional effects in humans: a narrative review of recent evidence. *Adv Nutr* 2014; 5:131-43. doi:10.3945/an.113.005025
- Wahlqvist ML. Vitamin D status and food security in North-East Asia. *Asia Pac J Clin Nutr* 2013;22(1):1-5.
- Wang N, Liu Y, Ma Y, Wen D. Hydroxytyrosol ameliorates insulin resistance by modulating endoplasmic reticulum stress and prevents hepatic steatosis in diet-induced obesity mice [Internet: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.03.018>]. *J. Nutr. Biochem.* Elsevier Inc; 2018. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.03.018
- Weaver CM, Gordon CM, Janz KF, Kalkwarf HJ, Lappe JM, Lewis R, et al. The National Osteoporosis Foundation's position statement on peak bone mass development and lifestyle factors: a systematic review and implementation recommendations. *Osteoporos Int* 2016; 27:1281-386.
- Weaver CM, Proulx WR, Heaney R. Choices for achieving adequate dietary calcium with a vegetarian diet. *Am J Clin Nutr* 1999;70(Suppl): S543-8.
- Whiting S, Kohrt W, Warren M, Kraenzlin M, Bonjour J. Food fortification for bone health in adulthood: a scoping review. *Eur J Clin Nutr* 2016;70(10):1099-105.
- Willett WC. The Mediterranean diet: science and practice. *Public Health Nutr.* 2006;9(1a):105–10. doi:10.1079/phn2005931
- Włodarek D, Głabiska D, Kołota A, Adamczyk P, Czekajło A, Grzeszczak W, et al. Calcium intake and osteoporosis: the influence of calcium intake from dairy products on hip bone mineral density and fracture incidence - A population-based study in women over 55 years of age. *Public Health Nutr* 2014; 17:383-9. doi: 10.1017/S1368980012005307
- World Health Organization - WHO. Cardiovascular Diseases (CVDs). FactSheet. 2015; 317. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>.
- World Health Organization. Guidelines: Saturated fatty acid and trans-fatty acid intake for adults and children [Online]. [cited 2018]. Available from: URL: [tation \(1\). pdf](#).
- Wu X, Li C, Mariyam Z, Jiang P, Zhou M, Zeb F et al. Acrolein-induced atherogenesis by stimulation of hepatic flavin containing monooxygenase 3 and a protection from hydroxytyrosol. *J. Cell. Physiol.* 2018;234(1):475–85. doi:10.1002/jcp.26600
- Wu, D.; He, J.; Jiang, Y.; Yang, B. Quality analysis of *Polygala tenuifolia* root by ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Food Drug Anal.* 2015, 23, 144–151. doi: 10.1016/j.jfda.2014.07.009
- Xiang, X.; Sha, X.; Su, S.; Zhu, Z.; Guo, S.; Yan, H.; Qian, D.; Duan, J. Simultaneous determination of polysaccharides and 21 nucleosides and amino acids in different tissues of *Salvia miltiorrhiza* from different areas by UV-visible

- spectrophotometry and UHPLC with triple quadrupole MS/MS. *J. Sep. Sci.* 2018, 41, 996–1008. doi:10.1002/jssc.201700802
- Xu H, Zhang M, Li XL et al. Low and high doses of ursolic acid ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis through different pathways. *J Neuroimmunol.* 2015; 281: 61–67. doi 10.1016/j.jneuroim.2015.02.010
- Yackobovitch-Gavan M, Phillip M, Gat-Yablonski G. How milk and its proteins affect growth, bone health, and weight. *Horm Res Paediatr* 2017;88(1):63-9. doi: 10.1159/000456662
- Yan-Xiang L. Research on the anti-obesity effect of ursolic acid with experimental hyperlipidemia mice. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2013; 28: 264–266.
- Yang B, McCullough ML, Gapstur SM, Jacobs EJ, Bostick RM, Fedirko V, et al. Calcium, vitamin D, dairy products, and mortality among colorectal cancer survivors: The Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort. *J Clin Oncol* 2014; 32:2335–43. doi: 10.1200/JCO.2014.55.3024
- Yang LJ, Tang Q, Wu J, Chen Y, Zheng F, Dai Z, Hann SS. Inter-regulation of IGFBP1 and FOXO3a unveils novel mechanism in ursolic acid-inhibited growth of hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016 Mar 31; 35:59. doi: 10.1186/s13046-016-0330-2. Erratum in: *J Exp Clin Cancer Res.* 2016; 35:81.
- Ye Q, Georges N, Selomulya C. 2018. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: from research stage to commercial food products. *Trends Food Sci. Technol.* 78:167–79. doi: 10.1016/j.tifs.2018.05.025
- Yeung AWK, Mocan A, Atanasov AG. 2018. Let food be thy medicine and medicine be thy food: a bibliometric analysis of the most cited papers focusing on nutraceuticals and functional foods. *Food Chem.* 269:455– 65. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.06.139
- Yie Y, Zhao S, Tang Q, Zheng F, Wu J, Yang L, Deng S, Hann SS. Ursolic acid inhibited growth of hepatocellular carcinoma HepG2 cells through AMPK α -mediated reduction of DNA methyltransferase 1. *Mol Cell Biochem.* 2015 Apr;402(1-2):63-74. doi: 10.1007/s11010-014-2314-x.
- Yu E, Hu FB. Dairy products, dairy fatty acids, and the prevention of cardiometabolic disease: a review of recent evidence. *Curr Atheroscler Rep.* 2018;20(5):24. doi: 10.1007/s11883-018-0724-z
- Yubero-Serrano EM, Lopez-Moreno J, Gomez-Delgado F, Lopez-Miranda J. Extra virgin olive oil: More than a healthy fat. *Eur. J. Clin. Nutr.* Springer US; 2019;72(Table 1):8–17. doi:10.1038/s41430-018-0304-x
- Zettel, V.; Hitzmann, B. Applications of chia (*Salvia hispanica* L.) in food products. *Trends Food Sci. Technol.* 2018, 80, 43–50.
- Zhang T, Su J, Wang K, Zhu T, Li X. Ursolic acid reduces oxidative stress to alleviate early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosci Lett.* 2014 Sep 5; 579:12-7. doi: 10.1016/j.neulet.2014.07.005.
- Zhang Y, Li X, Ciric B, Curtis MT, Chen WJ, Rostami A, Zhang GX. A dual effect of ursolic acid to the treatment of multiple sclerosis through both immunomodulation and direct remyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Apr 21;117(16):9082-9093. doi: 10.1073/pnas.2000208117.
- Zhang, H.; Liu, Y.Y.; Jiang, Q.; Li, K.R.; Zhao, Y.X.; Cao, C.; Yao, J. Salvianolic acid A protects RPE cells against oxidative stress through activation of Nrf2/HO-1 signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 2014, 69, 219–228. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.025
- Zhao, Y.; Hao, Y.; Ji, H.; Fang, Y.; Guo, Y.; Sha, W.; Zhou, Y.; Pang, X.; Southerland, W.M.; Califano, J.A.; et al. Combination effects of salvianolic acid B with low-dose celecoxib on inhibition of head and neck squamous cell carcinoma growth in vitro and in vivo. *Cancer Prev. Res.* 2010, 3, 787–796. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-09-0243
- Zheng W, Ma DF, Ding M, Zhang YM, Wang PY. Milk intake increases bone mineral content through inhibiting bone resorption: meta-analysis of randomized controlled trials. *e-SPEN J* 2013;8(1): e1-e7. doi: 10.1016/j.cln-me.2012.10.005.
- Zhou, Y.; Xu, G.; Choi, F.F.; Ding, L.S.; Han, Q.B.; Song, J.Z.; Qiao, C.F.; Zhao, Q.S.; Xu, H.X. Qualitative and quantitative analysis of diterpenoids in *Salvia* species by liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *J. Chromatogram. A* 2009, 1216, 4847–4858. doi: 10.1016/j.chroma.2009.04.017

S
O
X
E
Z

ANEXOS

Anexos

Indicios de calidad de las publicaciones derivadas de la tesis doctoral

Artículo 1 Aceptado en Nutrients Journal

Nutrients Journal

DOI: 10.3390/nu11092133.

Acute/Subacute and Sub-Chronic Oral Toxicity of a Hidroxytyrosol-Rich Virgin Olive Oil Extract

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix Verdú”, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, España.

Avilene Rodríguez Lara¹, María Dolores Mesa García^{2,3}, Jerónimo Aragón-Vela¹, Cristina Casals Vázquez², Jesús M. Zúñiga⁴ and Jesús Rodríguez Huertas¹ *

¹Departamento de Fisiología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix Verdú”, Universidad de Granada, Parque Tecnológico de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, España; avilenerl@correo.ugr.es (A.R.L); jeroav@ugr.es (J.A-V.); casalsvazquez@gmail.com (C.C.V.); jhuertas@ugr.es (J.R.H).

² Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix Verdú”, Universidad de Granada, Parque Tecnológico de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, España mdmesa@ugr.es (M.D.M).

³ Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada. Ibs.GRANADA

⁴ Centro de Instrumentación Científica. Universidad de Granada. jzúñiga@ugr.es (J.Z.)

Índice de impacto 5.7 JCR category rank: Q1: Nutrition & Dietetics

Artículo 2 Aceptado en Nutrición Hospitalaria

Nutrición Hospitalaria

DOI: 10.20960/nh.02570

Leche y productos lácteos como vehículos de calcio y vitamina D: papel de las leches enriquecidas

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix Verdú”, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, España.

Jesús Rodríguez Huertas¹, Avilene Rodríguez Lara¹, Olivia González Acevedo¹ and María Dolores Mesa García^{2,3*}

¹Departamento de Fisiología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix Verdú”, Universidad de Granada, Parque Tecnológico de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, España; jhuertas@ugr.es (J.R.H) avilenerl@correo.ugr.es (A.R.L)

² Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix Verdú”, Universidad de Granada, Parque Tecnológico de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, España; mdmesa@ugr.es (M.D.M).

³ Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada. Ibs.GRANADA

Índice de impacto: 1.057 JCR category rank: Q3: Nutrition & Dietetics

Artículo 3 Aceptado en Foods Journal

Foods Journal

DOI: 10.3390/foods10123001

Assessment of the phytochemical and nutrimental composition of dark Chia seed (*Salvia Hispánica L.*)

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix Verdú”, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, España.

Avilene Rodríguez Lara¹, María Dolores Mesa-García^{2,3}, Karla Alejandra Damián Medina⁴, Rosa Quirantes Piné⁵, Rafael A. Casuso¹, Antonio Segura Carretero⁵ and Jesús Rodríguez Huertas^{1,2*}

¹Departamento de Fisiología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix Verdú”, Universidad de Granada, Parque Tecnológico de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, España; avilenerl@correo.ugr.es (A.R.L); mdmesa@ugr.es (M.D.M); karla.damian03@gmail.com (K.A.D.M.); casusopt@gmail.com (R.C); jhuertas@ugr.es (J.R.H).

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix Verdú”, Universidad de Granada, Parque Tecnológico de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, España; mdmesa@ugr.es (M.D.M).

³Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada. Ibs.GRANADA, 1816 Granada, España (M.D.M)

⁴ Centro Universitario de Tonalá, Universidad de Guadalajara Av 555 Ejido San José Tateposco, Nuevo Periferico Oriente, 45425 Tonalá, Jalisco, Mexico; karla.damian@academicos.udg.mx

⁵ Centro Tecnológico de Investigación y Desarrollo de Alimentos Funcionales, Avenida del Conocimiento, 37, 18100, Granada, España. ansegura@ugr.es (A.S.C); rquirantes@cidaf.es (R.Q.P)

Impact factor: 4.350 JCR category rank: Q2: Food Science & Technology

Índice de figuras

1. Pirámide tradicional de la Dieta Mediterránea.
2. Estructura química del hidroxitirosol y la oleuropeína
3. Estructura química del ácido ursólico
4. Rol del ácido ursólico en diferentes órganos
5. Diagrama general de los estudios incluidos en la presente Tesis Doctoral
6. Diseño experimental utilizado en el estudio (Dieta Mediterránea)
7. Ecuaciones antropométricas utilizadas en el estudio
8. Reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico
9. Diseño experimental del estudio agudo/subagudo y subcrónico siguiendo el protocolo descrito en las disposiciones de la Directiva 92/69 / CEEE-OECD 408.
10. Evolución del peso corporal y de ingesta tras los 90 días de intervención
11. Evaluación microscópica representativa (10×) de tejidos seleccionados 14 d tras la administración de una dosis única de 2000 mg/kg/d) de un extracto de AOV en el estudio agudo/subagudo. Aceite de oliva virgen (AOV).
12. Evaluación microscópica representativa (10×) de tejidos seleccionados después de la intervención con la dosis alta (1000 mg/kg/d) del extracto de AOV durante 90 d en el estudio es subcrónico. Aceite de oliva virgen, AOV.
13. Diseño experimental utilizado en el estudio efecto del ácido ursólico en la reducción de la grasa y la hipertrofia muscular en humanos.
14. Escala de esfuerzo percibido de Borg
15. Comparativa IDR de calcio y vitamina D en etapas de la vida.

Índice de tablas

1. Parámetros antropométricos iniciales de los voluntarios participantes en el estudio, distribuidos en los grupos experimentales
2. Evaluación nutricional de la dieta de los sujetos voluntarios antes del inicio de iniciar el estudio.
3. Evolución del peso corporal, IMC, porcentaje del compartimento grasa y frecuencia cardíaca de los voluntarios tras la intervención con dieta mediterránea y el suplemento de antioxidantes durante 6 semanas
4. Evolución de los parámetros hematológicos de los voluntarios tras la intervención con dieta mediterránea y el suplemento de antioxidantes durante 6 semanas.
5. Evolución de las concentraciones de glucosa, lípidos, compuestos nitrogenados, biomarcadores de estado oxidativo y actividad de las enzimas hepáticas en sangre de los voluntarios tras la intervención con dieta mediterránea y el suplemento de vegetales deshidratados, rico en antioxidantes.
6. Parámetros hematológicos de las ratas después de 14 días tras la administración de una dosis aguda (300 mg/kg) y subaguda (1000 mg/kg) del extracto de AOV
7. Parámetros hematológicos de las ratas después de 90 días de intervención con diferentes dosis del extracto de AOV.
8. Parámetros bioquímicos plasmáticos. Toxicidad subaguda tras 14 días de intervención con diferentes dosis del extracto de VOO.
9. Parámetros bioquímicos plasmáticos tras 90 días de intervención con diferentes dosis del extracto de AOV
10. Evaluación microscópica representativa (10×) de tejidos seleccionados 14 d tras la administración de una dosis única de 2000 mg/kg/d) de un extracto de AOV en el estudio agudo/subagudo. Aceite de oliva virgen (AOV).
11. Evaluación microscópica representativa (10×) de tejidos seleccionados después de la intervención con la dosis alta (1000 mg/kg/d) del extracto de AOV durante 90 d en el estudio es subcrónico. Aceite de oliva virgen, AOV.
12. Información nutricional: pechuga de pollo braseada reducida en sal
13. Composición corporal inicial de los participantes en el estudio, distribuidos en los grupos experimentales
14. Evolución de la fuerza muscular de los participantes durante el período de intervención
15. Datos de calibración utilizados para la cuantificación de compuestos específicos
16. Composición proximal de las semillas de chía
17. Perfil de ácidos grasos de las semillas de chía

18. Compuestos detectados en el extracto de semillas de chía. (Figura 1) clasificados según la naturaleza química del compuesto
19. Concentración de los principales compuestos en las semillas de chía.
20. Fuentes dietéticas de calcio, proporción absorbible por ración de alimento y raciones equivalentes que aportan la cantidad de calcio absorbido de una ración de leche
21. Aporte de calcio y vitamina D por ración de 250 ml de las distintas leches semidesnatadas y desnatadas enriquecidas con calcio más consumidas en España
22. Comparativa de la contribución (%) a la ingesta diaria de calcio por ración de leche de vaca semidesnatada y de leche semidesnatada enriquecida a las IDR de calcio por edades y autores

Foto 1. Semillas de *Salvia hispánica* L.

Cuestionario IPAQ

Actividad física			
<p>A continuación voy a preguntarle por el tiempo que pasa realizando diferentes tipos de actividad física. Le ruego que intente contestar a las preguntas aunque no se considere una persona activa.</p> <p>Piense primero en el tiempo que pasa en el trabajo, que se trate de un empleo remunerado o no, de estudiar, de mantener su casa, de cosechar, de pescar, de cazar o de buscar trabajo <i>[inserte otros ejemplos si es necesario]</i>. En estas preguntas, las "actividades físicas intensas" se refieren a aquéllas que implican un esfuerzo físico importante y que causan una gran aceleración de la respiración o del ritmo cardíaco. Por otra parte, las "actividades físicas de intensidad moderada" son aquéllas que implican un esfuerzo físico moderado y causan una ligera aceleración de la respiración o del ritmo cardíaco.</p>			
Pregunta		Respuesta	Código
En el trabajo			
49	¿Exige su trabajo una actividad física intensa que implica una aceleración importante de la respiración o del ritmo cardíaco, como <i>[levantar pesos, cavar o trabajos de construcción]</i> durante al menos 10 minutos consecutivos? <i>(INSERTAR EJEMPLOS Y UTILIZAR LAS CARTILLAS DE IMÁGENES)</i>	Sí 1 No 2 Si No, Saltar a P 4	P1
50	En una semana típica, ¿cuántos días realiza usted actividades físicas intensas en su trabajo?	Número de días <input type="text"/>	P2
51	En uno de esos días en los que realiza actividades físicas intensas, ¿cuánto tiempo suele dedicar a esas actividades?	Horas : minutos <input type="text"/> : <input type="text"/> hrs mins	P3 (a-b)
52	¿Exige su trabajo una actividad de intensidad moderada que implica una ligera aceleración de la respiración o del ritmo cardíaco, como caminar deprisa <i>[o transportar pesos ligeros]</i> durante al menos 10 minutos consecutivos? <i>(INSERTAR EJEMPLOS Y UTILIZAR LAS CARTILLAS DE IMÁGENES)</i>	Sí 1 No 2 Si No, Saltar a P7	P4
53	En una semana típica, ¿cuántos días realiza usted actividades de intensidad moderada en su trabajo?	Número de días <input type="text"/>	P5
54	En uno de esos días en los que realiza actividades físicas de intensidad moderada, ¿cuánto tiempo suele dedicar a esas actividades?	Horas : minutos <input type="text"/> : <input type="text"/> hrs mins	P6 (a-b)
Para desplazarse			
<p>En las siguientes preguntas, dejaremos de lado las actividades físicas en el trabajo, de las que ya hemos tratado. Ahora me gustaría saber cómo se desplaza de un sitio a otro. Por ejemplo, cómo va al trabajo, de compras, al mercado, al lugar de culto <i>[insertar otros ejemplos si es necesario]</i></p>			
55	¿Camina usted o usa usted una bicicleta al menos 10 minutos consecutivos en sus desplazamientos?	Sí 1 No 2 Si No, Saltar a P 10	P7
56	En una semana típica, ¿cuántos días camina o va en bicicleta al menos 10 minutos consecutivos en sus desplazamientos?	Número de días <input type="text"/>	P8
57	En un día típico, ¿cuánto tiempo pasa caminando o yendo en bicicleta para desplazarse?	Horas : minutos <input type="text"/> : <input type="text"/> hrs mins	P9 (a-b)
En el tiempo libre			
<p>Las preguntas que van a continuación excluyen la actividad física en el trabajo y para desplazarse, que ya hemos mencionado. Ahora me gustaría tratar de deportes, fitness u otras actividades físicas que practica en su tiempo libre <i>[inserte otros ejemplos si llega el caso]</i>.</p>			
58	¿En su tiempo libre, practica usted deportes/fitness intensos que implican una aceleración importante de la respiración o del ritmo cardíaco como <i>[correr, jugar al fútbol]</i> durante al menos 10 minutos consecutivos? <i>(INSERTAR EJEMPLOS Y UTILIZAR LAS CARTILLAS DE IMÁGENES)</i>	Sí 1 No 2 Si No, Saltar a P 13	P10
59	En una semana típica, ¿cuántos días practica usted deportes/fitness intensos en su tiempo libre?	Número de días <input type="text"/>	P11
60	En uno de esos días en los que practica deportes/fitness intensos, ¿cuánto tiempo suele dedicar a esas actividades?	Horas : minutos <input type="text"/> : <input type="text"/> hrs mins	P12 (a-b)