



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

**CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.
ANTIOXIDANTES Y FUNCIÓN BIOLÓGICA.**

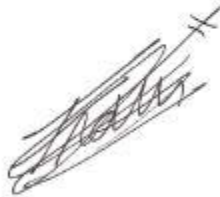
MEMORIA presentada por MARÍA JESÚS OLIVERAS LÓPEZ para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Granada.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

Directores de la Tesis Doctoral



Dra. Mª del Carmen López Martínez



Dr. Francisco Martín Bermudo



Dr. José Javier Quesada Granados

Memoria presentada por María Jesús Oliveras López

Granada, 2005

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

**La Directora del Departamento, María Fátima Olea Serrano
CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de Investigación ha sido desarrollado en el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, por la Licenciada María Jesús Oliveras López. Parte del estudio ha sido realizado en el Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández de Alicante así como en el Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Florencia.

Dra. M^a Fátima Olea Serrano



Granada, 2005

ABREVIATURAS

- Aceite de Girasol: AG
- Aceite de Oliva: AO
- Ácido Cafeico: Acaf
- Ácido Desoxirribonucleico: ADN, DNA
- Ácido Elenólico, Elenolic acid: EA
- Ácido Ferúlico: Fer
- Ácido o-cumárico: Aocum
- Ácido p-cumárico: Apcum
- Ácido Ribonucleico: ARN, RNA
- Ácido Vanílico: AVan
- Ácidos Grasos Monoinsaturados: AGMI
- Ácidos Grasos Poliinsaturados: AGPI
- Ácidos Grasos Saturados: AGS
- Apigenina, Apigenin: Apig
- Biodisponibilidad: BD
- Catalasa: CAT
- Compuestos Polares Menores, Minor Polar Compounds: CMP, MPC
- Control: CTL
- Cromatografía de Gases: GC
- Cromatografía Líquida de Alta Eficacia: HPLC
- Deacetoxyoleuropeína aglicona, Deacetoxyoleuropein aglycone: DacOEa
- Detector Ultravioleta-Visible, Diode Array Detector: DAD
- Especies Reactivas del Oxígeno: ROS
- Espectrometría de Masas, Mass Spectrometry: MS
- Extra Virgin Olive Oil: EVOO
- Fosfoglicerato Kinasa-1: PGK-1
- Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa: GAPDH
- Glutation Peroxidasa: GT_{PX}
- Glutation reducido/Glutation oxidado: GSH/GSSG
- Glutation Reductasa: GT_{RD}
- Hidroxitirosol, Hydroxytyrosol: OHTyr
- Luteolina, Luteolin: Lut
- Malonil dialdehído: MDA
- Oleuropeína aglicona, Oleuropein aglycone: OEa
- Oleuropeína, Oleuropein: OE
- Potencial Antioxidante Total: PAO
- Radioinmunoensayo: RIA
- Superóxido Dismutasa dependiente de manganeso: SOD-2
- Tiempo de retención, Retention time: t_R
- Tirosol, Tyrosol: Tyr
- Vainillina: Van

**CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.
ANTIOXIDANTES Y FUNCIÓN BIOLÓGICA.**

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	- 1 -
1. GENERALIDADES DEL ACEITE DE OLIVA	- 1 -
1.1. Origen del olivo y características botánicas	- 1 -
1.2. Variedades de aceitunas	- 3 -
1.3. Tipos de aceites de oliva	- 10 -
1.4. Procesos de obtención del aceite de oliva	- 13 -
1.5. Criterios de pureza.....	- 18 -
1.6. Criterios de calidad del aceite de oliva e importancia de la evaluación sensorial.....	- 20 -
1.7. Composición del aceite de oliva	- 21 -
2. ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES	- 25 -
2.1. Radicales libres generados en el organismo.....	- 25 -
2.2. Mecanismos de defensa de los antioxidantes	- 27 -
2.3. Estrés oxidativo	- 29 -
2.4. Determinación del estado oxidativo	- 32 -
2.5. Enzimas antioxidantes	- 33 -
2.6. Vitamina E.....	- 37 -
2.7. Compuestos fenólicos	- 41 -
3. ISLOTES PANCREÁTICOS Y DIABETES.....	- 57 -
3.1. El islote de Langerhans y la célula β . Estructura y función.....	- 57 -
3.2. Diabetes y estrés oxidativo. Apoptosis.....	- 61 -
II. OBJETIVOS	- 65 -
III. PARTE EXPERIMENTAL	- 69 -
1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO - QUÍMICA DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.....	- 69 -
MATERIAL Y MÉTODOS	- 69 -
1.1. Determinación del grado de acidez	- 69 -
1.2. Determinación del índice de peróxidos	- 70 -
1.3. Prueba espectrofotométrica en el U.V. Determinación del K_{232} y K_{270}	- 72 -
1.4. Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos	- 73 -
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 75 -
1.1. Grado de acidez, índice de peróxidos y absorción en el ultravioleta	- 75 -
1.2. Perfil de ácidos grasos	- 76 -
2. ESTUDIO DE ANTIOXIDANTES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA	- 79 -
MATERIAL Y MÉTODOS	- 79 -
2.1. Estudio del contenido en vitamina E del aceite de oliva virgen extra.....	- 79 -
2.2. Estudio de la composición polifenólica del aceite de oliva virgen extra a lo largo de varias campañas	- 85 -
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 93 -
2.1. Estudio del contenido en vitamina E del aceite de oliva virgen extra.....	- 93 -
2.2. Estudio de la composición polifenólica del aceite de oliva virgen extra a lo largo de varias campañas	- 104 -
3. COMPARATIVE STUDY OF PHENOLIC ANTIOXIDANTS IN SPANISH AND ITALIAN CULTIVARS	- 135 -
MATERIALS AND METHODS	- 135 -
3.1. Analysis and comparison of the minor polar compound profile in Spanish and Italian monocultivar extra virgin olive oils.....	- 135 -
3.2. Study of lignan compounds in <i>Olea europaea</i> L. fruit.....	- 141 -
RESULTS AND DISCUSSION.....	- 147 -
3.1. Analysis and comparison of the minor polar compounds in Spanish and Italian monocultivar extra virgin olive oils.....	- 147 -
3.2. Study of lignan compounds in <i>Olea europaea</i> L. fruit.....	- 176 -

4. ESTUDIO DEL EFECTO BIOLÓGICO DE UN ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA CON ELEVADO CONTENIDO EN POLIFENOLES	- 189 -
MATERIAL Y MÉTODOS	- 189 -
4.1. Animales de experimentación	- 189 -
4.2. Dosis de aceite administradas	- 190 -
4.3. Reactivos de laboratorio	- 191 -
4.4. Determinación de los niveles de hidroxitirosol en plasma.....	- 192 -
4.5. Determinación de la capacidad antioxidante del plasma	- 197 -
4.6. Secreción de insulina de los islotes de Langerhans	- 204 -
4.7. Medida de la peroxidación lipídica de las membranas celulares en islotes de Langerhans y en hígado.....	- 213 -
4.8. Medida de la expresión de enzimas antioxidantes	- 217 -
4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	- 224 -
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 225 -
4.1. Niveles de hidroxitirosol en plasma.....	- 225 -
4.2. Capacidad antioxidante del plasma.....	- 234 -
4.3. Secreción de insulina de los islotes de Langerhans	- 240 -
4.4. Medida de la peroxidación lipídica de las membranas celulares en islotes de Langerhans y en hígado.....	- 245 -
4.5. Expresión de enzimas antioxidantes en islotes de Langerhans	- 249 -
IV. CONCLUSIONES	- 257 -
V. BIBLIOGRAFÍA	- 261 -

I. INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES DEL ACEITE DE OLIVA

1.1. Origen del olivo y características botánicas

El cultivo del olivo (*Olea europaea* L.), se ha venido desarrollando desde la antigüedad hasta nuestros días en la mayoría de los países de la ribera mediterránea. El olivo silvestre es originario de Asia Menor meridional, sin embargo, su cultivo para la obtención de aceite comienza en las épocas paleolítica y neolítica (5000 a 3500 a.C.) en Creta. A partir del siglo XVI a.C., los fenicios difunden el olivo por las islas griegas y Península Helénica. Desde el siglo VI a.C., se propagó por toda la cuenca del Mediterráneo, pasando a Túnez, la isla de Sicilia y, desde allí, a la Italia meridional, donde se extendió pronto por su norte, desde Calabria a Liguria (Uceda *et al.*, 1997).

Posteriormente, los romanos extenderían el cultivo del *oleum* por los territorios que ocuparon en las costas mediterráneas. En España, el olivo se había introducido durante la dominación marítima de los fenicios (1050 a.C.), que también aportaron el procedimiento para obtener el aceite, y alcanzó un notable desarrollo con el dominio de Roma (45 a.C.). Los árabes introdujeron sus variedades en el sur de España e influyeron en la difusión del cultivo hasta el punto de que muchos vocablos castellanos, como aceite (*zeit*), aceituna ó acebuche tienen raíz árabe.

El cultivo del olivo sale de la cuenca mediterránea con el descubrimiento de América, en 1492. En tiempos más modernos el olivo ha continuado su expansión más allá del Mediterráneo, cultivándose hoy en lugares tan alejados de su origen como la región sudafricana, Australia, Japón ó China (Uceda *et al.*, 1997).

El olivo, que pertenece a la familia de las Oleáceas, en la que se integran 29 géneros, es un árbol de tamaño mediano, de unos 4 a 8 metros de altura

según la variedad, que puede permanecer vivo y productivo durante cientos de años (Uceda *et al.*, 2000).



Las hojas del olivo son persistentes y normalmente sobreviven dos o tres años, son opuestas y cruzadas, de brotes enteros y tienen coloración verde oscura. Presenta flores de tono blanco en racimos.

La aceituna, fruto del olivo, es una drupa elipsoidal de coloración verdosa oscura cuando ya ha madurado. Se trata de un fruto compuesto por endocarpo (20-30%), el hueso leñoso

en cuyo interior se encuentra una sola semilla, mesocarpo (68-86%), la pulpa o carne y exocarpo (1-2%), la piel o capa exterior.

El componente mayoritario de la aceituna es el agua (50%), que depende del contenido de aceite (22%). En su composición hay también azúcares (19%), por transformación del almidón inicial, celulosa (6%) y proteínas (1,6%). Otros compuestos como elementos minerales (1,6%), vitaminas ó compuestos fenólicos están presentes en menor proporción.

La maduración de la oliva depende de diversos factores (Barranco *et al.*, 1997), como la edad del olivo (el fruto de árboles jóvenes madura antes ya que su metabolismo es más rápido), variedad, estado del árbol (los olivos enfermos dan frutos pequeños y con problemas de maduración), las técnicas de cultivo y factores ecológicos, como el contenido de humedad (las épocas secas retrasan la maduración del fruto) y la luz (la iluminación fuerte acelera la maduración).

El aceite obtenido de su fruto, considerado como uno de los alimentos de la dieta mediterránea, es cada vez más apreciado por sus cualidades

organolépticas, que lo convierten en una grasa ideal en gastronomía y que aporta unas características nutricionales muy apreciadas, tanto en la prevención de enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo como en la patología cardiovascular.

La producción de aceite de oliva está concentrada mayoritariamente en los países mediterráneos, en los que se encuentra el 99% de la superficie del olivar y se genera el 98% de la producción mundial de aceite de oliva. La Unión Europea es el principal productor a nivel mundial en aceite de oliva, con una producción de aceite de oliva superior del 80%, seguida por África (8,5%), Asia (5,5%) y América, con un 2% de la producción mundial. Dentro de los países productores europeos, España destaca con un 28,3%, donde más del 80% de la producción nacional, corresponde a Andalucía. En Italia, el 63% de la producción está localizada en las regiones del sur (Abulia, Calabria). Esto puede dar una idea de la importancia que el sector del aceite de oliva tiene en la economía de esta región. Italia, Grecia, Portugal y Francia, Túnez y Turquía siguen a España en la producción de aceite de oliva (Aparicio *et al.*, 2003).

1.2. Variedades de aceitunas

La mayor parte de este trabajo se ha realizado con aceite de oliva virgen de la variedad Picual, aunque también se han estudiado aceites obtenidos de otras variedades españolas, como son Picuda, Arbequina y Hojiblanca y aceites de variedades italianas, Toscana y Taggiasca.

? Variedades españolas

La tabla 1 muestra las variedades de aceituna que se pueden encontrar en la Península Ibérica y las zonas principales de cultivo.

Variedad	Destino	Superficie	Zona de Cultivo
Picual	Aceite	645.000 Has.	Jaén, Córdoba, Granada
Cornicabra	Aceite	269.000 Has.	Ciudad Real, Toledo
Hojiblanca	Aceite y Mesa	217.000 Has.	Córdoba, Málaga, Sevilla
Lechín de Sevilla	Aceite	185.000 Has.	Sevilla, Cádiz
Manzanilla de Sevilla	Mesa	85.000 Has.	Sevilla, Badajoz
Verdial de Badajoz	Aceite	74.000 Has.	Badajoz
Empeltre	Aceite	72.000 Has.	Zaragoza, Teruel, Baleares
Arbequina	Aceite	71.000 Has.	Lérida, Tarragona
Manzanilla Cacereña	Aceite y Mesa	64.000 Has.	Cáceres, Salamanca
Picudo	Aceite	60.000 Has.	Córdoba, Granada
Farga	Aceite	45.000 Has.	Castellón, Tarragona
Lechín de Granada	Aceite	36.000 Has.	Granada, Almería, Murcia
Verdial de Huelva	Aceite	34.000 Has.	Huelva, Sevilla
Gordal Sevillana	Mesa	30.000 Has.	Sevilla
Morisca	Aceite	29.000 Has.	Badajoz, Cáceres
Morrut	Aceite	28.000 Has.	Tarragona, Castellón
Sevillena	Aceite	25.000 Has.	Tarragona, Castellón
Castellana	Aceite	22.000 Has.	Guadalajara, Cuenca
Verdial de Vélez-Málaga	Aceite	20.000 Has.	Málaga
Aloreña	Aceite y Mesa	17.000 Has.	Málaga
Blanqueta	Aceite	11.000 Has.	Alicante, Valencia
Villalonga	Aceite	6.000 Has.	Valencia

Tabla 1: Variedades de aceituna de la Península Ibérica.

Variedad Picual

Es la variedad más importante del mundo. Representa el 20% del olivar mundial y en España alcanza el 50%. Es la principal variedad en Andalucía por la importancia de la superficie plantada, se cultiva fundamentalmente en las provincias de Jaén, Córdoba y Granada y se estima que uno de cada dos olivos de esta Comunidad Autónoma es de esta variedad.



El fruto maduro es de color negro y de tamaño mediano. Recibe esta denominación por el ápice apuntado de sus frutos, que tienen una relación pulpa/hueso media-alta y elevado rendimiento graso (puede alcanzar hasta el 27%).

Su producción es elevada y se establece precozmente. Se considera una variedad muy rústica por su adaptación a diversas condiciones de clima y suelo, en particular es tolerante a las heladas y al exceso de humedad en suelo. Es un aceite de oliva virgen de gran estabilidad que presenta un frutado característico, aromático, con un ligero amargor y sabor un poco picante. Existe interés por esta variedad a causa de la calidad que se atribuye a su aceite.

Otras variedades predominantes en la provincia de Granada, además de la Picual ó Martaña, que representa un 80% de la producción de aceituna, son:

- Lucio y Loaime, variedades principales autóctonas de Granada que representan el 15% de la producción. Ambas son muy resistentes a la sequía y a las heladas invernales.

- Negrillo de Iznalloz, Escarabajuelo, Hojiblanca, Lechín y Gordal de Granada y Cornezuelo, variedades secundarias que representan el resto de la producción.

Variedad Picuda

Es la cuarta variedad en Andalucía por la importancia de la superficie plantada pero, debido a su amplia zona de difusión nunca llega a ser la variedad dominante de una comarca. Se cultiva fundamentalmente en la zona norte de Granada, Málaga, Jaén y en la zona Penibética Cordobesa. También conocida como carrasqueña de Córdoba, es seguramente la variedad más emblemática de Córdoba.



El fruto maduro es de color negro y de gran tamaño. Recibe esta denominación por el ápice apuntado y curvado de sus frutos.

La relación pulpa/hueso es alta y el rendimiento graso elevado, sin llegar a los valores de la picual, pero con cifras cercanas al 20%.

Su producción se puede considerar elevada y se destina fundamentalmente para la producción de aceite, aunque también es apreciada como aceituna de mesa.

La época de maduración de sus frutos es tardía, con cierta tolerancia al frío. Se obtiene un aceite de oliva virgen que presenta un frutado característico y equilibrado en el amargo. Existe un cierto interés por esta variedad a causa de la calidad que se atribuye a su aceite, aunque el conjunto de sus características agronómicas no favorece su difusión.

Variedad Hojiblanca

Su área de influencia se extiende por Andalucía, en concreto por el este de la provincia de Sevilla, el sur de Córdoba y todo el norte de la provincia de Málaga. Puede suponer el 16 % del olivar andaluz. El nombre le viene del color del envés de la hoja.



El fruto es oblongo, de tamaño medio, con una relación pulpa/hueso elevada. Sin embrago, el rendimiento en aceite es bajo, entre 17-19%.

Aguanta bien el frío y se adapta a terrenos calizos.

Con las aceitunas hojiblanca se obtienen unos aceites más suaves, afrutados, almendrados, de color más amarillo.

Variedad Arbequina

Es la variedad más extendida en Cataluña. Su nombre proviene de la población de Arbeca situada en la comarca de Les Garrigues. Hoy en día su cultivo es cada vez más extenso en Andalucía, donde las peculiaridades del clima (pluviometría, temperatura, horas de sol) han propiciado su desarrollo. Tal es el caso, que cada año crece la producción de esta variedad y comienza a formar parte de las variedades habituales de cada comarca andaluza.

El árbol es pequeño, resiste bien los fríos y la sequía y empieza a ser productivo en 10 ó 15 años.



La aceituna Arbequina es una de las más pequeñas, utilizadas para producir aceite de oliva.

Es más redondeada, de maduración temprana, de color verde/violeta.

Se puede afirmar que este aceite es muy similar a variedades que se producen en otras regiones ribereñas del mediterráneo (Italia y Grecia). Se obtienen unos aceites similares a los de la variedad Hojiblanca, con un sabor almendrado, muy dulce, sin dejar ningún amargor ni picor. Suelen predominar los tonos dorados con pinceladas de color verde.

? **Variedades italianas**

Variedad Taggiasca

Esta variedad es típica de la Riviera de la región italiana de la Liguria (Poniente) y se extiende por Imperia y Savona hacia el sur de Genova y La Spezia. El árbol, con un desarrollo vertical notable, puede superar los 10 metros y su vida productiva comienza a los tres años. Otras variedades de oliva con las que aparece en esta zona son Lavagnina, Razzola y Pignola.



El fruto de la Taggiasca, de color negro-violáceo cuando está maduro, tiene forma alargada, ligeramente cilíndrica. El aceite de oliva virgen elaborado a partir de esta aceituna es de color amarillo-verdoso, de sabor ligeramente amargo al inicio y posteriormente frutado, dulce y suave.

Variedad Seggianese

En esta región del centro-norte de Italia, se pueden encontrar numerosas variedades: Americano, Arandino, Ciliegino, Frantoio, Grappolo, Gremignolo, Grossolana, Larcianese, Lazzero, Lección, Leccio del Corno, Leccione, Madonna dell'Impruneta, Marzio, Maurino, Melaiolo, Mignolo, Moraiolo, Morchiaio, Olivastra, Seggianese, Pendolino, Pesciatino, Piangente, Punteruolo, Razzoia, Rossellino, Rosello, San Francesco, Santa Caterina, Scarlinese y Tondello.



De la mayoría de estas variedades, y sobre todo en el caso de la variedad Seggianese estudiada en este trabajo, se obtiene un aceite verde-amarillento, con sabor frutado, amargo y ligeramente picante.

1.3. Tipos de aceites de oliva

Según el Código Alimentario Español (CAE) se dará el nombre de aceite de oliva ó simplemente aceite, al líquido oleoso extraído de los frutos maduros del olivo, sin que haya sido sometido a manipulaciones o tratamientos no autorizados. Los aceites de oliva se clasifican atendiendo al Reglamento (CE) nº1989/2003 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. En cada categoría de aceite se establecen unos niveles máximos para la acidez y las otras características fisico-químicas.

Aceite de oliva virgen

Aceite obtenido a partir del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos ó por otros medios físicos, en condiciones, sobre todo térmicas, que no ocasionen la alteración del aceite, y que no haya tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado. El aceite de oliva virgen debe tener como máximo, una acidez libre de 2 g por 100 g expresada en ácido oleico.

Aceite de oliva virgen extra

El aceite de oliva virgen extra debe tener como máximo, una acidez libre, expresada en ácido oleico, de 0,8 g por 100 g.

Aceite de oliva lampante

Aceite de oliva con una acidez libre, expresada en ácido oleico, superior a 2 g por 100 g. No es apto para el consumo como tal y necesita ser refinado para su comercialización.

Aceite de oliva refinado

Aceite de oliva obtenido mediante la refinación de aceites de oliva vírgenes, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 0,3 g por 100 g.

La refinación elimina los componentes del aceite que deterioran el sabor, la estabilidad, el aspecto o valor nutritivo. El refinado produce un aceite comestible con las características deseadas por los consumidores, como sabor y olor suaves, aspecto limpio, color claro, estabilidad frente a la oxidación e idoneidad para freír. Las prácticas permitidas consisten en: Clarificación por procesos mecánicos, desmucilaginado, desacidificación por neutralización con lejías alcalinas o métodos físicos, decoloración con tierras decolorantes, desodorización por tratamientos en corrientes de vapor, winterización o desmargarinado a bajas temperaturas y mezcla de aceites en el caso de los aceites de semillas oleaginosas.

El inconveniente de esta técnica es que se puede producir la modificación de ciertos compuestos del aceite, como los triglicéridos, ó la pérdida de antioxidantes, como los tocoferoles ó polifenoles.

Aceite de oliva

El aceite de oliva está constituido por una mezcla de aceite de oliva refinado y de aceite de oliva virgen, con una acidez libre máxima del 1%, expresada en ácido oleico.

Aceite de orujo de oliva crudo

Aceite obtenido mediante tratamiento por disolvente del orujo de oliva, con exclusión de los aceites obtenidos por procedimientos de reesterificación y de cualquier mezcla con aceites de otra naturaleza. Requiere ser refinado para su consumo.

Aceite de orujo de oliva refinado

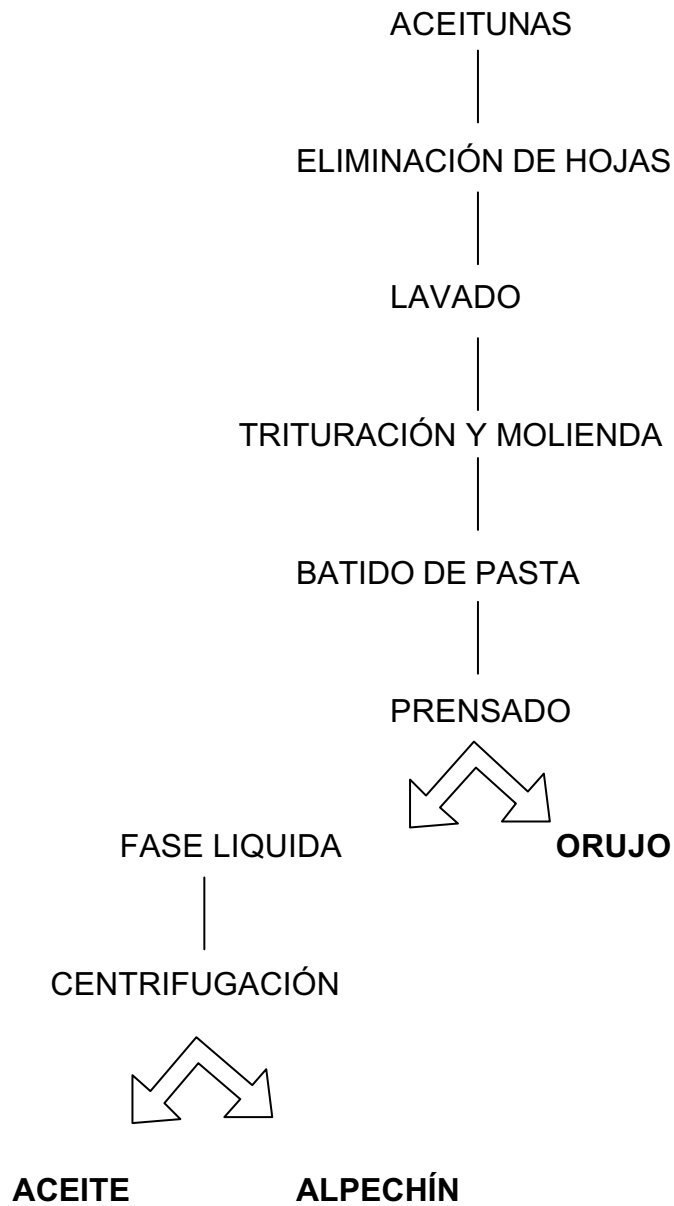
Es el aceite obtenido mediante refinación del aceite de orujo de oliva crudo, cuya acidez libre no podrá ser superior a 0,3 g por 100 g de ácido oleico.

Aceite de orujo de oliva

El aceite de orujo de oliva se obtiene a partir de la pulpa y semilla tras la extracción del aceite de oliva virgen y debe pasar un proceso de refinado, posteriormente, se le añade aceite de oliva virgen para que sea apto para el consumo. Por tanto es el aceite constituido por una mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y de aceite de oliva virgen, con una acidez libre que no puede ser superior a 1 g por 100 g de ácido oleico.

1.4. Procesos de obtención del aceite de oliva

Procedimiento general de obtención



Recolección

Todos los procesos comienzan cuando el fruto está en el árbol. Se realiza en diferentes pasos con gran importancia en el aceite obtenido. Las operaciones previas que se realizan antes de llegar a la almazara son preparación del terreno, recogida de frutos caídos de forma natural, derribo del fruto del árbol y recogida y limpieza del mismo antes de su presentación en la industria transformadora. La recogida de la aceituna puede ser manual (por vareo ó por ordeño) ó mecanizada (con vibradores).

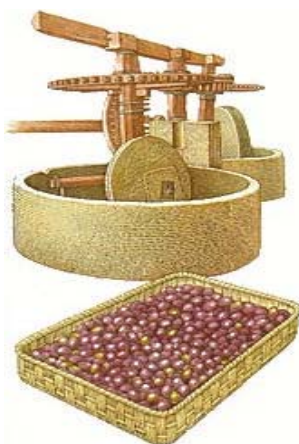
La aceituna se recoge cuando está en grado 5, es decir, cuando el mayor número de frutos han cambiado el color desde verde a violáceo oscuro, desde la epidermis hasta la mitad de la pulpa. El índice de madurez nos indica cuando la aceituna está en grado 5:

- 0 = Piel verde intenso
- 1 = Piel verde amarillenta
- 2 = Piel verde con manchas rojizas en, menos de la mitad del fruto
- 3 = Piel rojiza o morada en más de la mitad del fruto
- 4 = Piel negra y pulpa blanca
- 5 = Piel negra y pulpa morada sin llegar a la mitad de la pulpa
- 6 = Piel negra y pulpa morada sin llegar al hueso
- 7 = Piel negra y pulpa morada completamente hasta el hueso.

Sin embargo, debido a las evidencias científicas actuales, que afirman que los antioxidantes del fruto disminuyen con la maduración, actualmente se están elaborando cada vez aceites más “verdes”, para satisfacer la demanda de aceite de oliva virgen de más calidad, con mayor contenido en compuestos antioxidantes.

Molienda

La aceituna, limpia y lavada, no debe permanecer más de 48 horas sin moler porque podría fermentar y afectaría a la calidad del aceite. Esta parte del proceso tiene por objeto romper la pulpa y, con ello, las células del parénquima que contienen las vacuolas con minúsculas gotas de aceite.



Los molinos tradicionales ó de piedra molturaban las aceitunas y obtenían una pasta que se cargaba en unas prensas formadas por capachos.

En la actualidad, se realiza con molinos mecánicos (de martillos, de discos dentados, de cilindros estriados), que producen igualmente un aplastamiento que favorece la rotura celular y salida de la grasa.

Este proceso debe procurar que estas gotas de aceite no se emulsionen en el líquido acuoso, sino que conformen grandes masas formadas por la atracción que produce su propia tensión superficial. El producto de esta molienda se denomina pasta, la cual está compuesta por alpechín, aceite y materias sólidas procedentes del hueso y de la piel de la aceituna.

Batido de la pasta

La masa o pasta de aceituna obtenida en el molino se bate con objeto de favorecer la salida del aceite. Las gotas de aceite se van aglutinando para formar una fase oleosa más grande y más fácilmente separable de la fase acuosa (alpechín) y de la fase sólida u orujo (piel + pulpa + huesos rotos).

La temperatura de batido no debe sobrepasar los 30° C para que no se pierdan los compuestos aromáticos y no se aceleren los procesos de oxidación.

Separación

Para separar el aceite del resto de componentes de la aceituna, tradicionalmente se recurría al sistema de prensas con capachos, que separaba orujo de una mezcla de alpechín con aceite, que posteriormente se separaba por decantación. Este método requiere mucha limpieza y mano de obra, por lo que ha propiciado su abandono y desuso.

En la actualidad, mediante el sistema continuo con centrífugas horizontales ó decánter, se consigue la separación, por diferencia de su densidad, del orujo, el agua y el aceite. Dependiendo del número de fases que se quieran obtener encontraremos dos tipos de sistemas de obtención del aceite (Mataix, 2001).

? Sistema continuo de tres fases

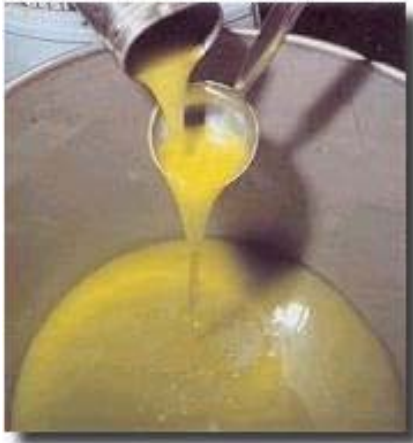
En este sistema se introduce un poco de agua del exterior para incrementar la fase acuosa y facilitar la separación del aceite. Se consume más agua y se produce más alpechín. Tras la centrifugación obtendremos una fase oleosa (aceite con restos de agua y partículas sólidas finas), una fase acuosa o alpechín (agua, algo de aceite y alguna partícula sólida) y una fase sólida (orujo con agua y algo de aceite).

Los componentes de un sistema de tres fases son el molino triturador, batidora, decantador centrífugo horizontal y las separadoras verticales de aceite y de alpechín.

Con este sistema se obtienen altas producciones de aceites de calidad. El inconveniente principal es el elevado consumo de agua (Litro de agua por Kg de aceituna), que conlleva además la producción de alpechín.

? Sistema continuo de dos fases

En la elaboración del aceite no se adiciona agua del exterior, por lo tanto el volumen de la fase acuosa o alpechín generado es muy pequeño, de ahí que se le conozca también como sistema ecológico.



Tras la centrifugación obtendremos una fase oleosa (aceite con restos de agua y partículas sólidas finas), una fase sólida con bastante humedad (orujo con más agua que el que se obtiene en el sistema continuo de tres fases y algo de aceite), que se denomina alpeorujo.

Los componentes del sistema de dos fases son el molino triturador, batidora, decantador centrífugo horizontal y separadoras verticales de aceite.

Con este sistema se obtiene un aceite de oliva virgen extra de mayor calidad y se disminuye el consumo de agua potable. Sin embargo, supone un mayor gasto económico debido a que, al no adicionar agua, el rendimiento de extracción de la pasta es menor. Además, hay mayor dificultad de manipulación de los alpeorujos, debido a que tienen un alto contenido de humedad.

El sistema de dos fases se está introduciendo cada vez más en España para obtener aceites de mayor calidad, sin embargo, en Italia se emplea este procedimiento con menos frecuencia que en nuestro país. Por otra parte, en Italia es más frecuente la elaboración de aceites de oliva vírgenes a partir de olivas deshuesadas, de manera que algunas empresas obtienen una pequeña parte de su producción moliendo sólo la pulpa del fruto, también con la finalidad de comercializar aceites de elevada calidad. Un ejemplo sería el método *Sinolea*.

? Extracción parcial

El método Sinolea es un sistema en el que se extrae el aceite por goteo natural. Es una extracción parcial basada en la diferencia de tensión superficial entre el agua y el aceite. Su obtención se realiza quitando previamente el hueso a la aceituna, y posteriormente un método de extracción parcial en frío y sin presión del aceite. Posteriormente se sacan las impurezas y partículas de agua por decantación natural y por último se procede a la extracción del resto del aceite por el sistema continuo.

Los criterios objetivos de calidad se miden por métodos de laboratorio y se basan en la determinación de parámetros que ponen de manifiesto los deterioros del aceite o la existencia de causas que los pueden producir. La mejora en la producción y extracción de este alimento, hacen que en la actualidad se disponga de unos aceites que no solo son apreciados por sus cualidades organolépticas sino que cada vez se conozcan más sus efectos beneficiosos sobre la salud.

1.5. Criterios de pureza

Debido a que el aceite de oliva es un producto natural, han de tenerse en cuenta en su elaboración una serie de factores básicos para conseguir y mantener su calidad. En este sentido, hay que destacar aspectos como la zona geográfica, tipo de suelo, climatología, variedad de aceituna y otros, que vienen determinados por el tratamiento tecnológico de la aceituna y el aceite, así como por el modo de conservación. El deterioro que sufre el aceite contenido en la aceituna a causa de cualquier actuación defectuosa sobre ella, tiene dos orígenes, la hidrólisis, es decir, la reacción entre los triglicéridos del aceite y el agua, facilitada por agentes enzimáticos que dan lugar a la formación de ácidos libres, o bien, las reacciones de oxidación que rompen las cadenas de los ácidos grasos, originando alcoholes, cetonas, aldehídos que producen mal olor y sabor y que determinan el enranciamiento.

El contenido en esteroles, eritrodíol, uvaol y alcanol es muy importante para la investigación de la calidad y pureza del aceite de oliva. Estos componentes secundarios no pueden ser transformados ni sintetizados pero, en cambio, pueden ser separados del mismo utilizando unas técnicas adecuadas.

La *composición de los esteroides* es específica de cada aceite vegetal. En lo que respecta al aceite de oliva, el β - sitosterol es el esteroles principal, y contiene también campesterol en cantidades apreciables. Si se detectan otros esteroides, sería un indicador de adulteración con otros aceites o grasas; por ejemplo, la sustitución de parte del aceite de oliva por aceite de girasol se ve reflejada por la presencia de estigmasterol, cuyo contenido en el aceite de oliva es nulo.

El *contenido de esteroles total* es mucho más elevado en los aceites de oliva vírgenes que en los aceites refinados. Así, la cantidad de esteroides puede indicar si un aceite de oliva virgen ha sido adulterado con un aceite de oliva refinado.

El contenido de *eritrodíol y uvaol* es mucho más elevado en los aceites de orujo de oliva que en los aceites de oliva, de modo que su presencia denota si parte del aceite de oliva ha sido substituida por aceite de orujo de oliva.

Otro parámetro de pureza es la distribución estereoespecífica de los principales *ácidos grasos* entre la posición 1,3 y 2 del glicerol en el aceite. Todos los aceites vegetales se caracterizan no sólo por una composición específica de ácidos grasos, sino también por una distribución específica de sus ácidos grasos en los triglicéridos: los ácidos grasos saturados se hallan concentrados en las posiciones 1, 3 y están prácticamente ausentes en la posición 2, que generalmente está ocupada por ácidos grasos insaturados. Si la proporción de ácidos grasos saturados en la posición 2 aumenta en el aceite de oliva, en tal caso podrá inferirse que se ha producido adulteración con un aceite de ésteres sintéticos.

Algunas de las técnicas generales empleadas para comprobar la pureza del aceite de oliva son: prueba de Bellier- Marcille, prueba de Vizern, índice de

saponificación, prueba de tetrabromuros, índice de Bellver, índice de yodo, índice de refracción y prueba de Hauchecorne.

1.6. Criterios de calidad del aceite de oliva e importancia de la evaluación sensorial

La calidad de un producto puede definirse como el conjunto de características propias que posee y que permiten considerarlo como mejor, igual o peor que los restantes de su misma especie.

La calidad de un aceite de oliva depende de la combinación de factores ambientales (clima y suelo), genéticos (variedad de aceituna) y agronómicos (técnicas de cultivo), y continúa con las operaciones de elaboración hasta el envasado. En el caso concreto del aceite de oliva el patrón que define la calidad viene representado por un zumo oleoso obtenido de aceitunas en perfectas condiciones de madurez, procedentes de un olivo sano; además, la extracción se habrá realizado a partir de un fruto fresco, evitando toda manipulación o tratamiento que altere la naturaleza química de sus componentes tanto a lo largo de dicha extracción como en el transcurso de su almacenamiento.

Los criterios de calidad que se aplican normalmente al aceite de oliva virgen vienen definidos por parámetros químicos y análisis sensorial de sus características organolépticas, definidas por los expertos a través de una cata.

El análisis sensorial se realiza a través de las pruebas de panel, ensayos organolépticos llevados a cabo, bajo condiciones controladas, por un grupo de catadores previamente seleccionados y entrenados, de acuerdo con técnicas sensoriales preestablecidas. Los datos de las respuestas individuales se tratan estadísticamente para conocer el error y objetivizar los resultados.

En general, los rasgos gustativos de los aceites vírgenes dependen, entre otros muchos factores, del punto de maduración de los frutos en el momento de

su recogida. Además de la variedad, los reflejos oscuro-verdosos, característicos de los aceites afrutados y amargos, corresponden a aceitunas que aún no han completado su proceso de maduración, mientras que los aceites amarillo-dorados suelen ser más dulces, obtenidos de frutos de cosecha tardía.

1.7. Composición del aceite de oliva

El aceite de oliva virgen extra, producto base de la dieta Mediterránea, es cada vez más relevante en la dieta de varios países debido a sus efectos beneficiosos en la salud humana. Los estudios epidemiológicos sobre las poblaciones mediterráneas han subrayado la correlación entre la ingesta de aceite de oliva y la reducción del riesgo cardiovascular (Mataix, 1988). Además, los datos disponibles hasta hoy permiten establecer una relación positiva entre un descenso del riesgo de desarrollar tumores. Algunos de estos efectos parece que se asocian con el contenido en compuestos fenólicos (Yang *et al.*, 2001) y una cantidad elevada de ácido oleico, además de los tocoferoles presentes en los aceites de oliva virgen extra.

El consumo de aceite de oliva se ha relacionado con un perfil lipídico con menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Galli *et al.*, 1999; Miró-Casas *et al.*, Gimeno *et al.*, 2002a) y con un menor riesgo de desarrollar varios tipos de neoplasias malignas (Owen *et al.*, 2000a; Quiles *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2005). Un número creciente de estudios apuntan al papel crucial que desempeña el aceite de oliva como integrante básico de la dieta mediterránea, de manera que, sus efectos beneficiosos sobre la salud pueden atribuirse tanto a su alto contenido en ácido oleico como a la presencia de antioxidantes (Fitó, 2003).

El aceite de oliva posee una composición de ácidos grasos muy característica, con un contenido en ácido oleico del 56-84% y un contenido del 3-21% de ácido linoleico.

En una dieta occidental, los principales ácidos grasos saturados (AGS) son el palmítico, esteárico, mirístico y láurico (Fitó, 2003). El ácido graso poliinsaturado (AGPI) más frecuente en la dieta es el ácido linoleico, mientras que el ácido araquidónico y el ácido α -linolénico representan menos del 2% del total de ácidos grasos. El AGMI más frecuente en la dieta mediterránea es el ácido oleico, ya que la fuente mayoritaria es el aceite de oliva. Se ha visto que con una dieta rica en AGMI se reducen significativamente los niveles de LDL, incluso en algunos estudios se ha incrementado levemente el colesterol HDL (Gimeno *et al.*, 2002a), de modo similar al efecto de una dieta enriquecida en AGPI.

El consumo de aceite de oliva aumenta la ingestión de AGMI, sin elevación significativa de las AGS y asegura un consumo apropiado de AGPI esenciales, mejorando el perfil lipídico asociado a patologías relacionadas con el daño oxidativo (Galli *et al.*, 1999), como la enfermedad cardiovascular y la diabetes. Además, existen evidencias científicas de un efecto hipotensivo tras seguir una dieta enriquecida con AGMI, aunque se precisan más estudios para conocer si estos resultados son fruto de un nutriente en particular ó sería más exacto hablar del bajo aporte de AGS junto con el alto nivel de polifenoles del aceite de oliva virgen ó simplemente de un efecto global de la dieta mediterránea (Fitó, 2003).

En la fracción insaponificable del aceite de oliva se encuentra el α -tocoferol (5, 7, 8-trimetiltocol), la forma más activa *in vivo* de la vitamina E y la más abundante en la naturaleza. Esta fracción no saponificable del aceite, cuando ha sido obtenida por medios puramente físicos, como la presión y centrifugación, es rica en compuestos menores polares (CMP), cuyas propiedades antioxidantes protegen al aceite de oliva de la autooxidación, desempeñan también un papel antioxidante protector en el organismo.

El aceite de oliva virgen posee un contenido de CMP superior a 120 mg/Kg de ácido gálico (Montedoro *et al.*, 1992a), mientras que en el aceite de oliva común el contenido oscila entre 10 a 100 mg/Kg y en el aceite de orujo de oliva este nivel es muy bajo.

La naturaleza y composición de las olivas, junto con los procedimientos de molturación, que son exclusivamente métodos físicos, son las razones de la mayoría de las diferencias entre los aceites de oliva virgen y otros aceites vegetales. Por ello, según Fitó (2003) es importante analizar la relación coste/beneficio de los distintos tipos de aceite de oliva y estudiar las diferencias entre los aceites de oliva vírgenes según su origen y modo de elaboración, para poder así realizar recomendaciones sobre su consumo en la prevención de procesos asociados al estrés oxidativo.

1.7.1. Composición de la fracción insaponificable del aceite de oliva

Los efectos del aceite de oliva beneficiosos para la salud se atribuyen, como ya se ha indicado, a su contenido en AGMI y a su contenido en antioxidantes, tanto vitamina E, carotenoides como polifenoles (Fitó, 2003). Los estudios observacionales en humanos y con animales de laboratorio han demostrado la asociación entre el consumo de alimentos ricos en α -tocoferol, los niveles plasmáticos de esta vitamina (Quiles *et al.*, 1999) y una reducción en la progresión de algunas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Sin embargo, en la actualidad se considera que no hay evidencia científica suficiente para recomendar la suplementación con vitamina E, existiendo resultados contradictorios por el momento también para los carotenoides (Burri *et al.*, 2003). Hay que tener en cuenta que las cantidades de vitamina E y A aportadas por un consumo diario moderado de aceite de oliva virgen son inferiores a las ensayadas en los estudios *in vitro* e *in vivo*, que tienen como finalidad comprobar sus efectos como antioxidantes (Gimeno *et al.*, 2001). La tabla 2 recoge los componentes minoritarios del aceite de oliva virgen.

Componentes	Concentración (mg/Kg)
Alcoholes terpénicos	3500
Esteroles	2500
Hidrocarburos	2000
Escualeno	1500
Compuestos fenólicos	350
β-caroteno	300
Alcoholes alifáticos	200
Tocoferoles	150
Ésteres	100
Aldehídos y cetonas	40

Tabla 2: Fracción insaponificable del aceite de oliva virgen.

Tomado de Mataix J. (2001).

Por eso, la presencia de otros componentes antioxidantes en el aceite de oliva virgen extra, como son los compuestos fenólicos, junto con el estudio de su biodisponibilidad y la determinación de las dosis a las que actuarían como protectores en el organismo sin llegar a ser prooxidantes (Lapidot *et al.*, 2002; Quiles *et al.*, 2002), son de enorme importancia en la investigación de los efectos beneficiosos del consumo de aceite de oliva.

2. ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES

2.1. Radicales libres generados en el organismo

Un radical libre es una especie química definida que tiene en su estructura uno ó más electrones desapareados, lo que lo convierte en un compuesto altamente inestable con gran capacidad de formar otros radicales libres por reacciones químicas en cadena. Una vez generados, los radicales libres aparean rápidamente el electrón desapareado uniéndose a otro radical libre, o cediendo ó tomando un electrón de una estructura molecular adyacente no radicalaria, con el fin de estabilizarse.

La reducción parcial de la molécula de oxígeno puede generar especies reactivas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales libres superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo (OH^{\cdot}) e hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}).

Los óxidos de nitrógeno, óxido nítrico (ON^{\cdot}) y dióxido nítrico (NO_2^{\cdot}) son asimismo radicales libres. Los radicales libres del oxígeno y nitrógeno se pueden convertir en otras especies reactivas no radicalarias, como el peróxido de hidrógeno ya mencionado, ácido hipocloroso, ácido hipobromoso y peroxinitrito.

A concentraciones elevadas, pueden dañar (de forma reversible ó irreversiblemente) la mayoría de los constituyentes celulares, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos libres, lípidos y carbohidratos, de manera que son peligrosos para los organismos vivos, ya que pueden alterar la actividad celular, a nivel de funciones de membrana, del metabolismo ó de expresión génica (Droge W., 2002; Violi *et al.*, 2002).

Las teorías sobre los radicales libres han aumentado el interés sobre el papel de los antioxidantes dietarios en la prevención de muchas enfermedades humanas, incluyendo lesiones inflamatorias, deficiencias nutricionales,

enfermedades autoinmunes, enfermedad de Parkinson, infartos de miocardio, neurodegeneración, envejecimiento, neoplasias, aterosclerosis y diabetes. (Ceriello *et al.*, 2001). El conocimiento de los mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos puede interesar para establecer los mejores hábitos nutricionales que aseguren una mayor “defensa biológica”.

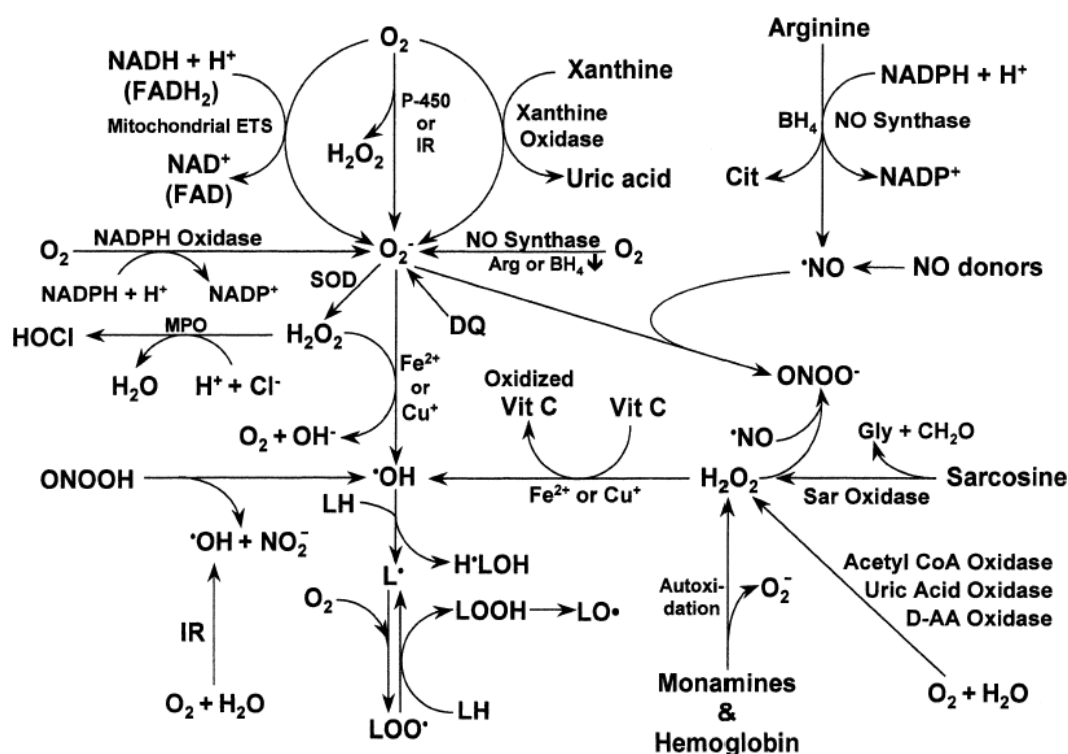


Figura 1: Producción de radicales libres del oxígeno y nitrógeno y otras especies reactivas para las células de los mamíferos. Figura tomada de Fang *et al.* (2002).

Los radicales libres pueden jugar un papel muy importante en las reacciones que tienen lugar en el organismo, como la transducción de señales, transcripción genética y regulación de la actividad de ciertas enzimas. En cuanto al óxido de nitrógeno (NO), es sabido su papel fundamental como neurotransmisor, mediador de la respuesta inmune y regulador en la agregación

plaquetaria y relajación de la musculatura vascular lisa. Por tanto, podemos decir que los radicales libres tienen “dos caras”, funcionan como moléculas reguladoras y transmisoras a niveles fisiológicos y como compuestos dañinos, oxidantes y citotóxicos a niveles mayores.

2.2. Mecanismos de defensa de los antioxidantes

Desde el punto de vista biológico, un antioxidante se define como una sustancia que, en concentraciones bajas en relación con el sustrato oxidable, puede retrasar ó evitar la oxidación del sustrato (Gutteridge *et al.*, 2000).

Los efectos dañinos de los radicales libres están controlados en el organismo mediante un amplio espectro de antioxidantes de origen endógeno (enzimas antioxidantes, glutatión, albúmina, transferrina, ceruloplasmina, ácido úrico, bilirrubina, glutatión...) y exógeno, a través de la dieta (vitaminas E y C, carotenoides, escualeno, selenio, grupo de los compuestos fenólicos...). Según sus mecanismos de acción, los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios ó terciarios:

- *Primarios*: Impiden la formación de radicales libres, frenan la reacción en cadena de los radicales libres, especialmente de las especies reactivas del oxígeno (ROS) ó son quelantes de metales de transición. Se comportan como captadores de estos ROS, como es el caso de la vitamina E, C (Niki *et al.*, 2002), polifenoles como el resveratrol (Howitz *et al.*, 2003) ó las enzimas antioxidantes, con lo que indirectamente reducen el daño en el DNA y en las membranas (Weber *et al.*, 1997; Visioli *et al.*, 1998a; O'Brien *et al.*, 2000).
- *Secundarios*: Interrumpen la reacción de propagación de los radicales libres (a-tocoferol, ácido ascórbico), ó desplazan las especies reactivas del oxígeno (ácido ascórbico, carotenoides, glutatión y la mayoría de las enzimas antioxidantes). De este modo, inhiben la generación de ROS, impidiendo la

activación metabólica de carcinógenos (Mukhtar *et al.*, 1999; Visioli *et al.*, 1999a).

- *Terciarios*: Reparar el daño causado a las moléculas por los radicales libres ó eliminan aquéllas que se han estropeado. Modifican el potencial redox, sobre todo los antioxidantes hidrosolubles, como la vitamina C, polifenoles, selenio ó *N*-acetilcisteína. El estado redox regula la actividad de muchos factores de transcripción, y puede tener un efecto positivo mejorando la eficiencia de la reparación del DNA (Brash *et al.*, 2002; Owuor *et al.*, 2002).

Muchos compuestos antioxidantes actúan por un único mecanismo, mientras que otros, como los polifenoles, pueden tener acciones combinadas. El grado de actividad de los compuestos fenólicos y de otros muchos antioxidantes está relacionado con el número de grupos hidroxilo que posee la molécula, ya que estabilizan los radicales libres al ceder un hidrógeno de sus grupos hidroxilos.

No hay que olvidar que muchos de los efectos de los antioxidantes, sobre todo aquéllos implicados en la regulación génica, dependen en gran medida de la dosis ó estado de diferenciación celular, de modo que el mismo compuesto podría actuar como anti ó prooxidante (Lapidot *et al.*, 2002; Quiles *et al.*, 2002), anti ó proapoptótico dependiendo de diversos factores.

Los antioxidantes de la dieta juegan un papel muy importante en la prevención de la citotoxicidad producida por los radicales libres, sin embargo, hay que tener en cuenta que un nivel excesivo de algunos de ellos podría tener efectos negativos. Además, muchos de los datos sobre la biología de los radicales libres y los antioxidantes proceden de estudios *in vitro* y necesitan ser verificados *in vivo*.

2.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo y el daño que éste genera están implicados en una enorme variedad de procesos naturales y patológicos como el cáncer, la diabetes mellitus, la aterosclerosis y enfermedades relacionadas con degeneraciones neurológicas como el Alzheimer, Parkinson, desórdenes autoinmunes y procesos del envejecimiento. Se debe al desequilibrio entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes del organismo.

En el organismo existe un sistema de protección contra las especies reactivas del oxígeno que están implicadas en el daño celular. Está formado por compuestos y enzimas antioxidantes que transforman estos compuestos en otros menos nocivos, para mantener el balance oxidante/prooxidante. La célula tiene varias líneas de defensa contra los radicales libres, la primera, son enzimas secuestradoras de radicales y la segunda, son sustancias antioxidantes.

Estas dos líneas de defensa han sido denominadas por algunos autores como sistemas de defensa primarios, porque actúan inactivando la producción directa de radicales libres, mientras que el sistema antioxidante secundario lo componen las enzimas encargadas de restablecer el nivel de cofactores ó reparar las biomoléculas dañadas (Lortz *et al.*, 2000; McCord J.M., 2000; Hauck *et al.*, 2002).

El estado de estrés oxidativo del organismo puede combatirse con la administración de antioxidantes exógenos, que son únicamente de origen vegetal. Las vitaminas hidrosolubles (vitamina C) y liposolubles (Vitaminas A y E), junto con los compuestos fenólicos, forman el grupo más importante de compuestos naturales con capacidad antioxidante, pero mientras que las vitaminas son nutrientes, los polifenoles no se pueden considerar como tales.

El estrés oxidativo resulta de la reacción metabólica que utiliza al oxígeno y lo reduce produciendo anión superóxido (O_2^-). Se ha definido como una alteración en el estado de equilibrio del sistema prooxidante y el antioxidante en las células.

Esta definición implica que aquellas células que tienen este sistema pro/antioxidante normal, continuamente generan y detoxifican oxidantes durante el metabolismo aeróbico, pero cuando suceden procesos oxidativos adicionales, el sistema prooxidante desequilibra el sistema antioxidante, dañando lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos y conduciendo por último a la muerte celular por estrés oxidativo severo (Gutteridge *et al.*, 2000).

El estrés oxidativo puede originarse por fuentes endógenas y exógenas a las células. El número de posibles fuentes de estrés oxidativo es variado y se debe a la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en procesos celulares de óxido-reducción, como la cadena de transporte electrónico, la exposición a radiaciones ionizantes, los procesos metabólicos y los procesos patológicos del organismo, como las oxidaciones producidas por las células fagocíticas en la defensa contra microorganismos (Sauer *et al.*, 2001).

Además hay un gran número de factores de crecimiento y citoquinas que unidos a diferentes receptores incrementan los niveles intracelulares de ROS. Se ha demostrado que adiciones externas de peróxido de hidrógeno ó radical superóxido, estimulan la proliferación y diferenciación celular en diferentes líneas celulares (Sauer *et al.*, 2001).

Está claro que el estrés oxidativo juega un papel significativo en numerosas enfermedades, pero la cuestión sería distinguir si es un factor causal ó si por el contrario es la consecuencia de la enfermedad (Abuja *et al.*, 2001).

El daño oxidativo produce diversas alteraciones sobre las macromoléculas. Cuando se dañan las proteínas se producen modificaciones en las actividades enzimáticas, en la permeabilidad iónica de las membranas y en la traducción de señales inter e intracelulares. El daño a los lípidos se produce mediante la peroxidación lipídica, produciendo alteraciones en la homeostasis y en las membranas celulares (Santini *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2000; Erba *et al.*, 2003).

Los peróxidos lipídicos, formados como consecuencia del daño en las membranas celulares son inestables y se descomponen formando una serie de compuestos, entre ellos, el más abundante es el malonildialdehído (MDA). Además, cuando este aldehído se acumula se une a las proteínas y otras macromoléculas, formando aductos con las bases del DNA que pueden ser mutagénicos (Esterbauer *et al.*, 1990).

El 4-hidroxinonenal (4-HNE) es el principal compuesto que se produce en la descomposición de los AGPI ω 6 y posee actividad citotóxica, hepatotóxica, mutagénica y genotóxica. Por eso, mayores niveles de estos compuestos y de hidroxicualquenos se han asociado con mayor peroxidación lipídica.

Por otra parte, esta oxidación lipídica puede ser prevenida por la presencia, así como la sobreexpresión, de la catalasa, superóxido dismutasa dependiente de manganeso ó la glutatión peroxidasa.

El daño oxidativo en el DNA nuclear produce alteraciones genéticas, mutaciones, enfermedades autoinmunes y cáncer, y el daño en el DNA mitocondrial está involucrado con los procesos de envejecimiento. Los carbohidratos sufren modificaciones de tipo redox, relacionados con la formación de cataratas ó la diabetes.

Los procesos de oxidación de biomoléculas pueden ser catalizados por la presencia de trazas de metales de transición. Los iones metálicos actúan acelerando las reacciones de oxidación de los lípidos, por lo que la presencia de estos iones es determinante en el daño oxidativo a macromoléculas.

El óxido nítrico también causa estrés oxidativo por diferentes vías, reacciona con el oxígeno para producir óxidos reactivos del nitrógeno (NO_x), que interaccionan principalmente con los lípidos de las membranas. Además el NO intensifica el daño causado por el peróxido de hidrógeno y tiene la capacidad de reaccionar rápidamente con otros radicales formados durante el estrés oxidativo. Durante los últimos años se ha generado un número considerable de evidencias

experimentales sobre el papel del óxido nítrico en el control de las células β en la patogénesis de la diabetes insulino dependiente (Tiedge *et al.*, 1999; Tejedo H., 2000). En células β de roedores, la generación de NO está regulada por citoquinas inflamatorias, dando como resultado alteraciones funcionales y la muerte celular por apoptosis ó necrosis.

Un estrés oxidativo ligero ó crónico modificaría el sistema antioxidante por inducción ó inhibición de las proteínas que participan en estos sistemas antioxidantes de defensa ó disminuiría la reserva celular de materiales antioxidantes como el glutatión y la vitamina E. Un estrés oxidativo ligero conduce a una apoptosis, mientras que un estrés oxidativo severo conduce a la muerte celular por necrosis (Chen *et al.*, 2000; Chandra *et al.*, 2001).

2.4. Determinación del estado oxidativo

Para evaluar la actividad antioxidante no hay un único método universal por el que se pueda cuantificar de manera exacta. En general, hay que tener en cuenta, que la eficacia de un antioxidante no depende sólo de su reactividad, sino de su concentración (Niki *et al.*, 2002) y de su localización, es decir, de que sea lipo ó hidrofílico. Por último no hay que olvidar que un factor clave es la duración de la inhibición del radical libre.

Actualmente se dispone de una amplia gama de métodos de laboratorio para determinar el estado oxidativo. Se han propuesto como marcadores del estrés oxidativo ó del estado antioxidante, métodos directos, basados en la determinación de la concentración de compuestos antioxidantes (Tuck *et al.*, 2001; Serafini *et al.*, 2003a) y métodos indirectos, como la medida de los niveles de glutatión, la relación entre el glutatión reducido y oxidado (ratio GSH/GSSG) (Giustarini *et al.*, 2003) y el poder antioxidante según la reducción de los iones férrico ó cúprico (Lissi *et al.*, 1995; Shea *et al.*, 2003).

Los métodos enzimáticos se basan en la medida de la actividad ó de la expresión de las enzimas antioxidantes (Gohil *et al.*, 2002).

Como marcadores de la oxidación proteica se emplea la cuantificación de carbonilos, pérdida de grupos tiol y nitración de tirosina (Fang *et al.*, 2002); como marcadores de la peroxidación lipídica, la determinación de equivalentes de malonildialdehído (Sakac *et al.*, 2000), 4-hidroxinonal, etano, pentano, dienos conjugados, isoprostanos, hidroperóxidos (Abuja *et al.*, 2001), 8-epi-prostaglandina F_{2a} y como marcadores del daño oxidativo a nivel del DNA, la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, 5-hidroxi citosina, 8-hidroxi adenina, 8-hidroxi guanina y timin glicol (Tammy *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2002).

Además hay otros marcadores relacionados con las rutas metabólicas de estrés oxidativo, como *N*-acetil-L-cisteína, prostaglandina E₂, coenzima Q₁₀, vitamina H, riboflavina y cianocobalamina.

2.5. Enzimas antioxidantes

Superóxido Dismutasa

La enzima superóxido dismutasa (SOD), cuya función catalítica fue descubierta por McCord y Fridovitch en 1969, ha sido denominada también eritrocupreína, indofenoloxidasas y tetrazolium oxidasas (Gutteridge *et al.*, 2000).

Entre los componentes del sistema antioxidante endógeno destacan las enzimas antioxidantes. En la figura 2 están representadas las distintas vías metabólicas de estas enzimas. La catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GT_{PX}) están consideradas las defensas antioxidantes endógenas más importantes del organismo frente a la producción de radicales libres.

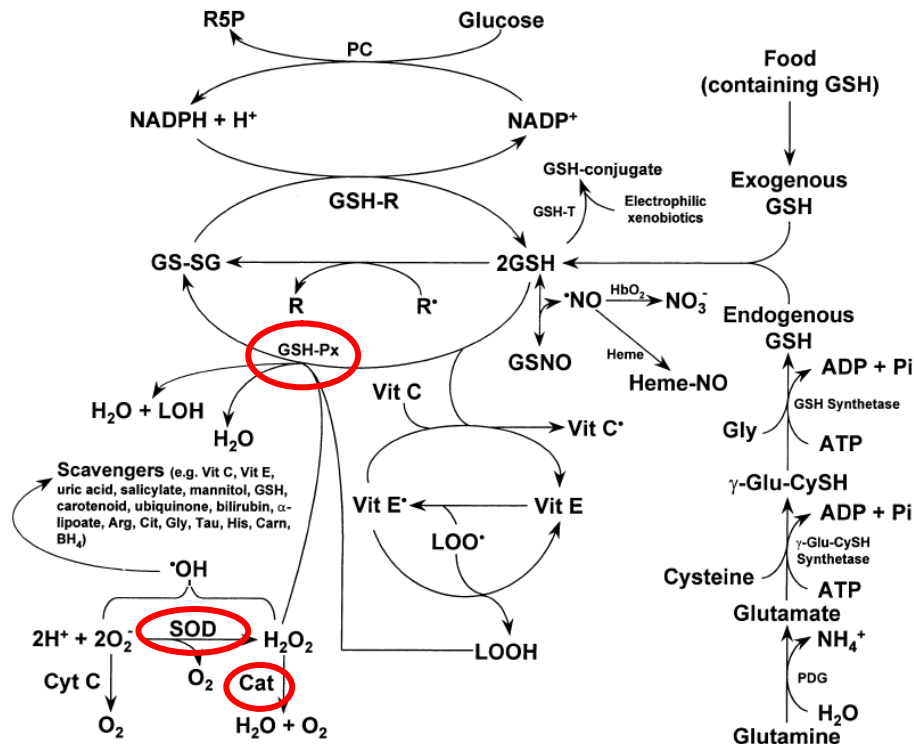


Figura 2: Eliminación de radicales libres del oxígeno y nitrógeno y de otras especies reactivas en las células de los mamíferos. Figura tomada de Fang *et al.* (2002).

La SOD es una enzima inducible presente en varias isoformas y se localiza en el citosol, mitocondria y en pequeñas cantidades en el plasma y fluidos intracelulares (líquido cefalorraquídeo y linfa). En los mamíferos existen tres isoenzimas de SOD, dos intracelulares, CuZn-SOD citosólica (SOD-1) y Mn-SOD mitocondrial (SOD-2) y una extracelular, Fe-SOD (Gutteridge *et al.*, 2000). La SOD cataliza la dismutación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a H_2O_2 y O_2 .

La expresión de la MN-SOD es esencial para la supervivencia y resistencia celular a la toxicidad inducida por ROS (McCord J.M., 2000) y su expresión está sujeta a modulaciones producidas por varios estímulos, como las citoquinas. Una actividad excesiva de SOD ha de ir acompañada de la acción de la CAT ó GT_{Px} , ya que si no es así, se acumula peróxido de hidrógeno.

Catalasa

La catalasa es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuída en el organismo humano, aunque su actividad varía según el tejido, siendo más elevada en hígado y riñón y más baja en tejido conectivo y epitelial. Se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, en los que se encuentra en el citoplasma. Esta enzima se caracteriza por su alta capacidad de reacción y presenta dos funciones, catalítica y peroxidativa. Es una enzima que contiene el grupo hemo y cataliza la dismutación del H_2O_2 a agua y oxígeno y desempeña un papel importante en la eliminación del H_2O_2 generado por las oxidasas en la β -oxidación de los ácidos grasos. Esta enzima presenta una baja afinidad por el sustrato, por lo que resulta fundamental cuando el H_2O_2 se encuentra en altas concentraciones.

Glutation Peroxidasa

El glutatión (γ -glutamil-cisteinil-glicina, GSH) es un tripéptido, el tiol no proteico más abundante de las células de los mamíferos, se encuentra en muchos tejidos, compartimentos celulares y subcelulares. Protege frente al daño oxidativo por medio de distintos mecanismos, al reaccionar con los radicales libres, restaura moléculas dañadas cediéndoles hidrógeno, estabiliza la estructura de las membranas mediante la eliminación de los peróxidos formados y mantiene los grupos tiol de las proteínas en su forma reducida, de manera que el envejecimiento está asociado con una disminución del contenido intracelular de glutatión.

Al mismo tiempo, el GSH es sustrato ó cofactor de diversas enzimas protectoras, como la GT_{PX} ó la GSH transferasa. El GSH es además el agente reductor que recicla el ácido ascórbico de su forma oxidada a su forma reducida mediante la enzima dehidroascorbato reductasa (Giustarini *et al.*, 2003; Suh *et al.*, 2004).

La reducción de GSSG a GSH está catalizada por la enzima glutathion reductasa, que es dependiente de NADPH. A su vez, el H_2O_2 es desactivado por la CAT y por la GT_{PX} , que oxida el glutathion (GSH), formándose H_2O y O_2 .

La relación entre el glutathion reducido y oxidado es uno de los marcadores de capacidad antioxidante de las células más representativo. Hay varias situaciones clínicas asociadas con la reducción de los niveles de GSH, (diabetes, enfermedad coronaria, hipertensión, procesos de inflamación, cáncer, estados de inmunodeficiencia), lo que puede tener como consecuencia una reducción del potencial redox de la célula y un efecto sobre los factores de transcripción que regulan la síntesis de citoquinas (Exner *et al.*, 2000).

Por tanto, la mejora de los niveles circulantes de GSH frente a los de su forma reducida, mejoraría la protección de las células del organismo frente al daño producido por los ROS.

Se han descrito cinco isoenzimas de la GT_{PX} , la citoplasmática ó mitocondrial ($\text{GT}_{\text{PX}}-1$), cuya actividad es selenio-dependiente, convierte los hidroperóxidos (y H_2O_2) formados por los radicales libres, en alcoholes no tóxicos, a expensas del GSH. Por tanto, su actividad depende de las concentraciones de ambas formas del glutathion y es un reflejo del estado redox de la célula.

Las actividades de las enzimas antioxidantes dependen del equilibrio entre su inactivación y su inducción, de manera que la inducción mantenida de enzimas antioxidantes representaría un factor protector frente a la generación de radicales libres. En este sentido, el incremento de la expresión de alguna de estas enzimas, que actúan de forma coordinada entre sí, supondría un mecanismo de acción beneficioso en la protección antioxidante.

Por otra parte, se han descrito grados de actividad bajos de estas enzimas en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como la enfermedad coronaria, diabetes mellitus (Kesavulu *et al.*, 2001), neoplasias y enfermedades cerebrales asociadas al envejecimiento.

Las sustancias y enzimas antioxidantes se encuentran estratégicamente distribuidas en los distintos compartimentos celulares y es así como algunas enzimas como la SOD, la CAT y la GT_{PX} , que se encuentran tanto en el citosol como en la mitocondria, serían la primera línea de defensa que eliminan el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, respectivamente. La inactivación de estos dos ROS es particularmente importante, ya que impide la formación del radical $OH\cdot$ por la reacción de Haber-Weiss.

2.6. Vitamina E

Fuentes y aspectos fisiológicos

Los tocoferoles se encuentran en semillas oleaginosas principalmente, aunque también en hojas y otras partes verdes de las plantas. Los tocotrienoles se encuentran en la corteza y en el germen de algunas semillas y cereales. Las distintas tablas de composición de alimentos señalan que los aceites vegetales son los más ricos en esta vitamina. Existe una correlación importante entre el contenido en vitamina E de los aceites vegetales y su grado de insaturación.

El α -tocoferol preserva de la oxidación al aceite de oliva virgen (Deiana *et al.*, 2002), alimento que supone una fuente adecuada de vitamina E, ya que según Mataix (2001) un consumo diario de 25 g aporta el 25% de vitamina E recomendada para el hombre y el 62,5% para la mujer. Es muy inestable frente a los tratamientos térmicos, de manera que prácticamente desaparece en la refinación del aceite de oliva.

La absorción de la vitamina E por los mamíferos tiene lugar principalmente en la parte superior del intestino delgado en forma libre, gracias a la actuación de lipasas en la hidrólisis de las formas esterificadas. Para asegurar una adecuada absorción, son necesarias tanto las sales biliares como la secreción pancreática.

En condiciones óptimas, la absorción de la vitamina E es relativamente baja, alrededor del 20-40%, así un porcentaje elevado aparece en formas oxidadas, por lo que se sospecha que el bajo porcentaje de absorción podría ser debido a la peroxidación de los AGPI.

El transporte se realiza vía quilomicrones, los cuales conducen la vitamina E a través de la sangre hacia los tejidos, donde se concentra en las membranas, incluyendo la mitocondrial, microsomal y plasmática. En casos de deficiencia de esta vitamina, se disminuyen rápidamente sus niveles en plasma e hígado, movilizándose lentamente de los tejidos adiposos y musculares.

Así, la grasa corporal podría ser un almacén de liberación lenta. El α -tocoferol, que se absorbe e incorpora a los tejidos conjuntamente con la forma β , es rápidamente eliminado de los mismos.

El α -tocoferol, la forma predominante en plasma y tejidos (Aust *et al.*, 2001), es el compuesto con actividad vitamínica. En humanos, aproximadamente el 88% de las formas de vitamina E es el α -tocoferol, con un 2% de la forma β y un 10% de la γ . La figura 3 muestra la estructura del α -tocoferol.

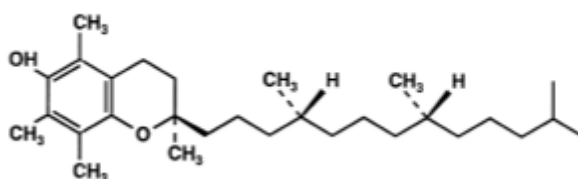


Figura 3: Estructura del α -tocoferol.

Los síndromes por deficiencia en vitamina E incluyen alteraciones en los sistemas de reproducción, nervioso, cardiovascular, hematopoyético, eritrocitos, músculo esquelético, hígado y tejido adiposo. Muchos de estos síntomas se han observado en dietas ricas en AGPI. Los síndromes por deficiencia de vitamina E en los países desarrollados son bastante raros, sin embargo, los neonatos y pacientes con problemas en la absorción ó transporte de grasa son susceptibles de sufrir hipovitaminosis. (Weber *et al.*, 1997).

Función como antioxidante

La función principal de la vitamina E es la inhibición de los procesos de oxidación de lípidos en alimentos y en sistemas biológicos (Lodge *et al.*, 2000; Coleman *et al.*, 2003). Para entender las propiedades de la vitamina E y demás tocoferoles hay que analizar sus propiedades antioxidantes observadas "*in vitro*". Las vitaminas actúan directamente como captadores de ROS y regulando la actividad de las enzimas antioxidantes. Entre ellas, la vitamina E ha sido reconocida como una de las más importantes como antioxidante (Quiles *et al.*, 1999).

La vitamina E, al igual que otros antioxidantes lipídicos, actúa como captador de radicales libres, de manera que rompe la reacción en cadena, generalmente por donación de un hidrógeno al radical peroxilo, dando hidroperóxidos. Puede transferir su hidrógeno fenólico al radical libre, rompiendo por tanto la reacción en cadena y previniendo la peroxidación de los AGPI en las membranas celulares y subcelulares. El radical α -tocoferoxilo que se origina es reducido por el GSH, ó bien reacciona con otro radical peroxilo formando un complejo estable.

Por medio de este mecanismo, se comporta como antioxidante biológico, junto con el resto de componentes del sistema protector del organismo (Wiseman *et al.*, 2002).

En casos de deficiencia de vitamina E, se ha observado un aumento de los niveles urinarios de MDA, producto final de la descomposición de muchos peróxidos de los AGPI.

Una deficiencia dietaria reduciría la actividad de la CAT hepática, GT_{PX} y GT_{RD} , induciría peroxidación lipídica en hígado y causaría desórdenes neurológicos y cardiovasculares, que se solucionarían con la suplementación dietaria de esta vitamina.

Por otra parte, la estructura del α -tocoferol, parece que facilita el empaquetamiento de las cadenas de AGPI en las membranas, de manera que contribuye a crear estabilidad, no relacionada directamente con sus propiedades antioxidantes, aunque se facilita la protección antioxidante de los AGPI al situarse próximo a los sustratos oxidables.

Además, la vitamina E está involucrada en la cadena respiratoria, actuando como catalizador en la respiración, protege de la oxidación al DNA, regulando de alguna manera la información genética (Hong *et al.*, 2004) y podría estar relacionada con la producción de prostaglandinas y la inhibición de la agregación plaquetaria (Quiles *et al.*, 1999; Jessup *et al.*, 2003). Se han publicado algunos trabajos en los que se establecen efectos sinérgicos entre el α -tocoferol y los polifenoles en la protección ante procesos oxidativos.

2.7. Compuestos fenólicos

El papel de los componentes alimenticios, como nutrientes esenciales para el mantenimiento de la vida y de la salud y como compuestos no nutricionales pero que contribuyen a prevenir o retardar las enfermedades crónicas de la edad madura, se ha convertido en una cuestión de gran interés para las grandes compañías de alimentos.

En los últimos años, se habla de alimentos funcionales cuando se ha demostrado, de forma satisfactoria, que un alimento posee un efecto beneficioso sobre una ó varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, siendo esto relevante para la mejora de la salud y la reducción del riesgo de enfermar (Instituto of Life Sciences, Europe, 1999). Son “todos aquellos productos alimenticios que proveen beneficios a la salud más allá de la nutrición básica”. En la medida que implican nuevos nutrientes ó proporciones diferentes de los mismos, pueden considerarse nuevos alimentos, según la clasificación establecida por la Unión Europea. Además, han de ser alimentos consumidos dentro de la dieta habitual.

Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos presentes en sustratos vegetales pueden utilizarse para mejorar la funcionalidad de algunos alimentos ó como suplementos alimenticios. Los residuos sólidos de la industria alimentaria, procedentes de la elaboración del vino, zumos de frutas, alpechines ó incluso orujos obtenidos de la separación del aceite de oliva virgen son buenos sustratos para la obtención de extractos ricos en compuestos fenólicos con actividad antioxidante, que pueden ser utilizados, por ejemplo, para ser añadidos a algunos alimentos y aumentar su funcionalidad.

Químicamente, los compuestos fenólicos contienen al menos un anillo aromático al que están unidos uno ó más grupos hidroxilo. Existe una gran variedad de compuestos fenólicos, que se podrían clasificar de modo general en dos grandes grupos, flavonoideos y no flavonoideos. Los primeros están formados por dos anillos aromáticos unidos por un heterociclo oxigenado y dependiendo

del grado de hidrogenación y de la sustitución del heterociclo, se diferencian a su vez en flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanoles, antocianos, proantocianidinas, flavanonas y se encuentran generalmente unidos a azúcares, formando glucósidos.

Los no flavonoideos son compuestos benzoicos y cinámicos, llamados comúnmente ácidos fenólicos, que contienen un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo y con diferentes grupos funcionales, aldehídos, alcoholes ó ácidos, que pueden estar formando ésteres con los ácidos orgánicos ó unidos a azúcares. Otros compuestos de naturaleza polifenólica son estilbenos, lignanos y en forma polimerizada, taninos y ligninas. Algunas de las propiedades de los productos de origen vegetal, como color, astringencia y aroma son debidas a la presencia de compuestos de este tipo.

En general, los compuestos fenólicos como antioxidantes, son multifuncionales y por medio de la mayoría de los mecanismos de acción ya comentados. Uno de los factores más importantes que determina la actividad antioxidante de los polifenoles es su grado de hidroxilación y la posición de los grupos hidroxilo en la molécula. A su vez, la solubilidad y los efectos estéricos de cada molécula pueden verse afectados por el tipo de estructura, como es el caso de los derivados glucosilados, lo que puede aumentar ó disminuir la actividad antioxidante.

Los polifenoles se suelen encontrar en los vegetales en forma de glucósidos, pero la acción de enzimas ó de algunos procesos, puede liberar las correspondientes agliconas, a las que se les atribuye mayor capacidad antioxidante que la de los glucósidos correspondientes (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Los mecanismos por los que actúan todos estos compuestos varían dependiendo de su concentración y tipos de compuestos presentes en los alimentos, de manera que existe sinergismo ó antagonismo entre los diferentes componentes (Pedrielli *et al.*, 2002).

2.7.1. Compuestos fenólicos de los alimentos

Los compuestos fenólicos están distribuidos en las distintas partes de la planta, pero su mayor concentración se encuentra en las frutas, hortalizas y productos derivados de ellas, como el aceite de oliva virgen, vino tinto, té y cerveza; también se encuentran en concentraciones considerables en cereales y leguminosas. Los distintos alimentos de origen vegetal contienen diferentes tipos de compuestos fenólicos y en concentraciones muy variables.

Las coloraciones azul, violeta y púrpura de frutas y hortalizas se deben al contenido fenólico de estos vegetales. Los *fenoles* protegen a las plantas contra los daños oxidativos y llevan a cabo la misma función en el organismo humano (previenen daños en el DNA y la peroxidación de lípidos). Bloquean la acción de enzimas específicas que causan inflamación, modifican los pasos metabólicos de las prostaglandinas (de la Puerta *et al.*, 1999, 2000) y por lo tanto, protegen la aglomeración de plaquetas. Inhiben la activación de carcinógenos (Qiang *et al.*, 2002).

Los alimentos ricos en *flavonoides* son la soja, las verduras de la familia de las coles (Brassica), las verduras verdes como judías, brócoli y las frutas cítricas y las frutas como los arándanos, grosellas, cerezas o manzanas constituyen una buena fuente. Las frutas contienen concentraciones relativamente altas de flavonoides, como son los derivados de la quercetina, kaempferol, hesperetina, y de ácidos fenólicos, como los derivados cinámicos. Quercetina y piceatanol (Howitz *et al.*, 2003) tienen han demostrado tener efectos *in vitro* sobre el DNA.

En otros estudios se ha visto que actúan contra alergias, inflamaciones, radicales libres, hepatotoxinas, aglomeración de plaquetas, microorganismos, úlceras, virus, tumores e inhiben ciertas enzimas. Aumentan la resistencia de los vasos sanguíneos y bloquean las enzimas que producen estrógeno.

El vino tinto, junto con las *proantocianidinas*, catequinas y antocianos, contiene compuestos benzoicos, cinámicos y resveratrol (Millar *et al.*, 1995; Peña-

Neira *et al.*, 2000; Ibern-Gómez *et al.*, 2002), relacionado con la protección cardiovascular (Wu *et al.*, 2001; Hall S., 2003). Estudios *in vitro* e *in vivo* con los polifenoles del vino, como quercetina y resveratrol (Sinclair *et al.*, 2002; Howitz *et al.*, 2003; Hall S., 2003; Finkel *et al.*, 2003) revelan que estos compuestos actúan sobre las denominadas proteínas *Sirts* (Lin *et al.*, 2000), que intervienen en la activación de genes supresores de tumores y de apoptosis, por lo que determinados compuestos polifenólicos se han relacionado con una mayor supervivencia de las células y “longevidad” (Strauss E., 2003). Sin embargo, como ya se ha comentado con anterioridad, siempre hay que tener en cuenta las dosis a las que los compuestos fenólicos son ensayados.

Las *catequinas* y ácidos gálicos confieren el color amarillo a las frutas y verduras, se encuentran en las partes más jóvenes y más expuestas al sol. El té contiene cantidades apreciables de proantocianidinas y catequinas (Chen *et al.*, 2001; Dashwood *et al.*, 2002; Higdon *et al.*, 2003).

En numerosos estudios con animales de laboratorio se ha visto que los derivados de la epicatequina (epigalocatequina, epigalocatequina-3-galato, epicatequin-3-galato) actúan como captadores de radicales libres (Sarkar *et al.*, 2001; Buetler *et al.*, 2002), quelantes de metales de transición (Rice-Evans *et al.*, 1996), antihipertensivos (Ying *et al.*, 2003), antidiabéticos (M.C. *et al.*, 2002), inhibiendo la expresión de enzimas cruciales en el desarrollo del cáncer, como metaloproteinasas (Bellosta *et al.*, 2003) y uroquinasas (Jankun *et al.*, 1997) ó incrementando la expresión de la enzima antioxidante CAT en la aorta (Negishi *et al.*, 2004). Parece que tanto el té verde como el negro inhiben el proceso de carcinogénesis en animales, aunque el té verde actúa como inhibidor más potente.

Las hortalizas contienen sobre todo altas cantidades de flavonoides, al igual que las leguminosas, donde también se encuentran compuestos benzoicos, cinámicos y en algunas de ellas, como la soja, *isoflavonas* (Boersma *et al.*, 2001; Cornwell *et al.*, 2004). Funcionan en forma bastante similar a los flavonoides

porque bloquean las enzimas que promueven los crecimientos tumoríficos. Genisteina y daidzeina, mejor conocidas por sus efectos antitumoríficos en la glándula mamaria en animales de experimentación, son "fitoestrógenos", débiles agonistas del estrógeno, y pueden actuar como tal (Nakamura *et al.*, 2000).

Por otra parte, la ingesta leguminosas en la dieta, podría tener un efecto adicional positivo en la diabetes, ya que parece que sus polifenoles son responsables, en parte, de la reducción del índice glucémico en sangre (Thompson *et al.*, 1984).

Los *lignan*os se encuentran en frutas y vegetales como el brécol y al igual que las isoflavonas (Wilkinson *et al.*, 2002) tienen una débil actividad estrogénica y compiten con las hormonas, no permitiéndoles promover el crecimiento de tumores.

Otros compuestos fenólicos, como el ácido elágico, presente en muchas frutas, también están implicados en la prevención e inhibición de tumores.

Trabajos realizados *in vivo* sobre la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos han demostrado que sólo una pequeña fracción de los compuestos flavonoideos ingeridos en la dieta se absorben en su forma inicial (Schroeter *et al.*, 2003), mientras que la mayor parte se degradan a ácidos fenólicos. Tanto los compuestos absorbidos como los metabolitos a que dan lugar muestran capacidad antioxidante *in vivo*, lo que indica que hay una serie de reacciones en las que intervienen los antioxidantes de forma diferente.

Igualmente, no hay que olvidar que la composición inicial de polifenoles de algunos alimentos puede modificarse tanto cuantitativa como cualitativamente como consecuencia de la preparación, procesado y almacenamiento a que se someten, lo que puede dar lugar a cambios en la funcionalidad de los sustratos iniciales. Así por ejemplo, es el caso de los aceites refinados, donde las altas temperaturas y demás tratamientos modifican y destruyen la mayoría de los compuestos fenólicos (Cortesi *et al.*, 1995b).

Un nivel importante de antioxidantes en la dieta se alcanza cuando el consumo medio por persona de polifenoles es aproximadamente de 1 g/día (Scalbert *et al.*, 2000), pero el aporte de estos compuestos está muy relacionado con los hábitos y preferencias de los individuos, y el aporte real es inferior a este valor, entre 50 y 800 mg/día.

2.7.2. Compuestos fenólicos del aceite de oliva

Los polifenoles del aceite de oliva virgen constituyen una fracción muy compleja, formada por un número muy elevado de compuestos, algunos todavía por identificar (Miró-Casas *et al.*, 2001a). Varios trabajos recientes han señalado cómo el aceite de oliva y sus CMP parece que actúan, en la nutrición humana, como agentes preventivos contra varias enfermedades (Owen *et al.*, 2002a, 2002b; Visioli *et al.*, 2000a, 2000c; Lambert *et al.*, 2005) y particularmente, los CMP contribuyen de manera importante a la calidad sensorial (Andrews *et al.*, 2003; Gutiérrez-Rosales *et al.*, 2003) y estabilidad del aceite (Baldioli *et al.*, 1996; Cinquanta *et al.*, 1997).

Cabe destacar que los polifenoles son una fracción compleja, constituida por más de treinta compuestos, que pertenecen a diferentes clases químicas. Entre ellos, han sido identificados los fenoles simples, como hidroxitirosol, tirosol, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, vainillina; flavonoides como luteolina y apigenina (Montedoro *et al.*, 1992a; Pirisi *et al.*, 2000; Romani *et al.*, 2001; Pinelli *et al.*, 2003) así como otros compuestos más complejos, ácido elenólico y secoiridoides, como los derivados de la oleuropeína, ligstrósidos, ligustalósidos, verbascósidos (Visioli *et al.*, 1998b; Brenes *et al.*, 1999). Recientemente, se ha descrito la presencia de lignanos en la fracción fenólica de algunos aceites de oliva, siendo el (+)-pinoresinol y el (+)-1-acetoxipinoresinol los componentes mayoritarios (Brenes *et al.*, 2000b; Owen *et al.*, 2000a, 2000b; Mateos *et al.*, 2001).

Además, esta fracción varía ampliamente dependiendo de varios factores, como la tecnología de producción, variedad de oliva, fase de crecimiento y maduración del fruto (Romani *et al.*, 1999). Dentro de los CMP, uno de los grupos principales está representado por los compuestos secoiridoides, presentes en su forma libre como agliconas ó como conjugados y que según Mulinacci *et al.* (2005b), con frecuencia constituyen el 60-80% del contenido total, sobre todo en los aceites de oliva vírgenes elaborados recientemente (frescos). Sin embargo, otros autores (Owen *et al.*, 2000c) han descrito que el tirosol e hidroxitirosol junto con los derivados secoirideos representan el 30% del contenido total de CMP del aceite de oliva virgen.

Los aceites de oliva ricos en polifenoles presentan un grado de estabilidad mayor, y unas propiedades organolépticas características, con un sabor “picante” y fuerte que es indicador de alta calidad, aunque no siempre sean las características organolépticas preferidas entre los consumidores.

La concentración final de CMP en el aceite de oliva virgen extra es fruto de varios factores. Además de las condiciones climatológicas, las características de la tierra de cultivo y la variedad de la oliva, otros factores que pueden influir en la calidad del aceite son el estado de maduración de la oliva, la tecnología empleada en su procesamiento y el tipo de envasado y almacenamiento (Gimeno *et al.*, 2002b).

La calidad del aceite de oliva virgen depende mucho de la cantidad y composición de compuestos fenólicos de los frutos en el momento de la recogida de la aceituna. Varios factores afectan a la composición y cantidad de CMP de la oliva, entre ellos, el grado de maduración. Entre las posibles técnicas para mejorar el contenido en polifenoles en el fruto estaría establecer el momento de recogida de la oliva para obtener un aceite de oliva virgen de mayor calidad.

La maduración se acompaña de una modificación de la concentración de pigmentos en la superficie. Generalmente, el desarrollo del color de verde a púrpura se debe a una acumulación de antocianos junto con la degradación de las

clorofilas y carotenoides. Estudios previos han descrito un descenso general de los polifenoles totales conforme se va produciendo la maduración de la aceituna, mientras que se observan distintas tendencias en los compuestos específicos (Agati *et al.*, 2005).

Uno de los problemas actuales para desarrollar análisis rápidos y reproducibles de los CMP, es la ausencia de estándares puros adecuados, en particular de los secoiridoides y lignanos. La cuantificación del contenido total de Tyr e OHTyr, no sólo en sus formas libres, sino sobre todo en sus formas ligadas, que no son fácilmente identificables por análisis HPLC/DAD, podría ser un objetivo importante. Estos datos podrían ser correlacionados con el potencial antioxidante del aceite, como se ha sugerido en estudios recientes (Visioli *et al.*, 1998a).

Hasta la fecha, se han realizado esfuerzos considerables hacia el desarrollo de procedimientos analíticos dedicados a la determinación cuali-cuantitativa de estos compuestos en los aceites de oliva vírgenes.

En estudios previos, los polifenoles han sido evaluados con respecto a un compuesto referencia, como Tyr (Montedoro *et al.*, 1992a; Pirisi *et al.*, 2000), y/o aplicando curvas específicas de calibración para cada subclase química, como fenoles simples, secoiridoides y flavonoides (Pinelli *et al.*, 2003; Mulinacci *et al.*, 2005a, 2005b). Recientemente, se han propuestos métodos electroquímicos (Brenes *et al.*, 2000a), de electroforesis capilar (Bendini *et al.*, 2003; Bonoli *et al.*, 2003) y una determinación enzimática, capaces de evaluar el contenido total fenólico en las muestras de aceite de oliva (Mosca *et al.*, 2000). Actualmente, no existe un método oficial de análisis de los compuestos menores polares del aceite de oliva virgen extra.

Los estudios del contenido en polifenoles en el aceite de oliva virgen consumido en los países del mediterráneo han sido enfocados en referencia a la estabilidad de los propios aceites (Gutiérrez *et al.*, 2002; Servili *et al.*, 2002; Velasco *et al.*, 2002), la biodisponibilidad de estos compuestos en animales de

experimentación y en humanos (Rein *et al.*, 2000; Miró-Casas *et al.*, 2002; Covas *et al.*, 2003; Natsume *et al.*, 2003; Visioli *et al.*, 2003), y a los efectos antioxidantes *in vitro* de compuestos puros (Berra *et al.*, 1995) ó de extractos de vino ó aceite de oliva (Miller *et al.*, 1995; Lavelli *et al.*, 2002; Morelló *et al.*, 2005; Fernández-Pachón *et al.*, 2005).

Sin embargo, pocos estudios han relacionado el contenido en antioxidantes presentes en el aceite de oliva virgen, y su efecto protector *in vivo*, como mecanismo de prevención frente a las enfermedades causadas por el estrés oxidativo.

En este sentido, los compuestos polifenólicos merecen ser analizados detalladamente ya que son buenos candidatos para explicar una parte importante de los beneficios del aceite de oliva virgen extra como componente de la dieta mediterránea (Fitó, 2003).

La distinta actividad antioxidante de los aceites con idénticas concentraciones de polifenoles totales puede deberse a la diferente naturaleza de los compuestos fenólicos. El estudio y comparación de los perfiles cromatográficos es por tanto esencial para poder establecer las diferencias entre los aceites de oliva comunes y vírgenes y los procedentes de diversas variedades de aceituna. Por ello, el grado de actividad antioxidante de los aceites de oliva depende de la cantidad, pero también de la naturaleza de los CMP.

Se requieren posteriores estudios sobre los efectos antioxidantes *in vivo* de una ingesta diaria de diferentes tipos de aceites de oliva en humanos, a fin de determinar cuál sería el mejor perfil polifenólico de un aceite de oliva virgen extra y poder establecer recomendaciones dietéticas sobre su consumo.

2.7.3. Efectos antioxidantes y otras actividades biológicas de los compuestos fenólicos del aceite de oliva

Entre los polifenoles de la aceituna y del aceite de oliva virgen tienen especial interés aquéllos que poseen grupos orto-difenólicos, principalmente el *hidroxitirosol* y la *oleuropeína*, éster heterosídico del ácido elenólico y del hidroxitirosol. La actividad antioxidante del hidroxitirosol se debe tanto a un efecto quelante de iones metálicos como a un efecto captador de radicales libres (Visioli *et al.*, 1998a). La oleuropeína y el hidroxitirosol han demostrado tener una actividad antioxidante superior a la de otros antioxidantes conocidos como las vitaminas E y C. (Gordon *et al.*, 2001; Mateos *et al.*, 2003; Bouaziz *et al.*, 2005).

En estudios *in vitro*, el hidroxitirosol y la oleuropeína, han mostrado una capacidad de inhibir la agregación plaquetaria con una concentración inhibitoria del mismo orden que la aspirina (Fitó, 2003) y pueden además inhibir la producción de la molécula proinflamatoria leucotrieno B₄. Visioli *et al.*, (1999a) demostraron que la oleuropeína incrementa la producción de óxido nítrico. También hay numerosos trabajos sobre el efecto protector de estos compuestos sobre líneas celulares con daño oxidativo, destacando el hidroxitirosol (Manna *et al.*, 1997; Lapidot *et al.*, 2002).

La identificación de los *lignan*os en el aceite de oliva virgen es también de interés (Mateos *et al.*, 2001; Milder *et al.*, 2004; Mulinacci *et al.*, 2005a), porque los estudios animales, celulares y metabólicos han revelado que tienen efectos biológicos importantes que pueden contribuir a su potencial como agentes preventivos.

En los últimos años se ha publicado que, entre los CMP presentes en el aceite virgen, los lignanos han demostrado ser potentes antioxidantes *in vitro* (Kang *et al.*, 2000; Owen *et al.*, 2000a, 2000c; Fitó, 2003) y presentar la mayor capacidad antioxidante, seguidos en orden decreciente por hidroxitirosol, algunos derivados de la oleuropeína y tirosol (Owen *et al.*, 2000a). La enterolactona, producida por la microflora intestinal a partir de precursores de lignanos presentes

en la dieta, se ha relacionado con la protección frente a la oxidación de las LDL (Kang *et al.*, 2000; Fitó, 2003).

Por otro lado, se han realizado estudios con semillas de lino (Meagher *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2000), fuente importante de lignanos. Se ha visto que inhiben el crecimiento de células cancerosas en piel, mama, colon y pulmón. Parece que inhiben la carcinogénesis por medio de su actividad como antioxidantes, antivirales y por su acción como antiestrogénicos en cánceres hormonodependientes (Cornwell *et al.*, 2004).

En estudios con animales *in vivo* (Kang *et al.*, 1998) e *in vitro* con LDL humanas, Kang *et al.* (2000) comprobaron que el pinoresinol se comportaba como un “captador” de radicales libres más potente que el α -tocoferol y que inhibía la formación de Malonildialdehído (MDA).

Además, son antioxidantes más lipofílicos que los derivados de la oleuropeína de manera que pueden complementar la acción antioxidante de fenoles y secoiridoides.

Se ha asociado la ingestión de alimentos ricos en precursores de lignanos con una protección frente a neoplasias de colon, próstata y mama (Owen *et al.*, 2000b). Las similitudes entre la estructura de los lignanos, estradiol y tamoxifeno (antiestrógeno sintético) sugieren que los lignanos pueden ejercer su efecto anticarcinógeno parcialmente por sus efectos antiestrogénicos.

Se han propuesto otros mecanismos por los que los lignanos podrían intervenir en la prevención del cáncer con una acción antiviral ó reduciendo el estrés oxidativo (Owen *et al.*, 2000a, 2000b, 2000c). Además, los CMP del aceite neutralizan las especies reactivas del oxígeno que podrían conducir a la formación de aductos del DNA, de manera que ofrecerían una posible protección frente a ciertos estímulos mutagénicos.

En estudios con ratas se ha demostrado una mejora del perfil lipídico plasmático tras una dieta rica en CMP (Friedman *et al.*, 2003). En estudios con humanos, se vió un aumento del colesterol HDL tras la administración de aceite de oliva virgen, incremento también detectado por otros autores (Asgary *et al.*, 2000) después del consumo de plantas ricas en flavonoides, que produjo además una disminución de triglicéridos y LDL-colesterol.

Por todo esto, es de enorme importancia no sólo conocer el contenido cuantitativo de compuestos polifenólicos del aceite de oliva virgen, sino también su perfil cualitativo, a la hora de estudiar y definir sus posibles propiedades biológicas (Fitó, 2003).

2.7.4. Importancia de los compuestos fenólicos en el olivo. Polifenoles en las distintas partes de la planta

El *Olea europaea* L. es un miembro de la familia Oleaceae ampliamente distribuido, que juega un papel fundamental en la vegetación de la cuenca Mediterránea. Los extractos de diferentes partes de la planta (hojas, frutos, flores, corteza) han sido utilizados en el pasado en medicina popular. La caracterización fitoquímica de los miembros de la familia del olivo se ha basado principalmente en la distribución relativa de los secoiridoides en las distintas partes de la planta (Romani *et al.*, 1999, 2000). El olivo, al igual que otras plantas aumenta la producción de polifenoles como respuesta a factores ambientales como la sequía, que suponen un ataque para los tejidos (Hall S., 2003).

El papel de los flavonoides en la planta ha sido estudiado recientemente, debido a que su biosíntesis está regulada por varios estímulos medioambientales (Romani *et al.*, 1999). Estos compuestos juegan un papel clave contrarrestando los efectos negativos del exceso de luz (absorben en la región UV del espectro solar) y del ataque de patógenos. Además, los flavonoles pueden captar radicales libres producidos bajo condiciones de estrés severo, protegiendo por tanto el

metabolismo celular de la planta de daños oxidativos. De modo similar, los glicósidos de los flavonoides han demostrado tener un efecto protector antioxidante en estudios con células animales (Boersma *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001), de manera que pueden tener un papel importante en la salud humana. Además, en estudios de Romani *et al.* (1999) se ha visto que infusiones de las hojas de éste árbol tenían una alta actividad antioxidante, estimada por el método 2,2'-difeníl-1-picril-hidrazil (DPPH).

Polifenoles de las hojas

Los polifenoles de las hojas del olivo han suscitado el interés de los investigadores por varias razones. Parece que algunos de ellos inhiben el desarrollo de la mosca del olivo (*Dacus oleae*) y se comportan como antioxidantes. En los extractos de las hojas se han encontrado derivados del tirosol y del hidroxitirosol, oleuropeína, verbascósido, ligustrósido, verbascósido y flavonoides como los glucósidos y agliconas de la luteolina, apigenina, rutina, quercetina (Tsimidou *et al.*, 1996).

Polifenoles de la pulpa

Han sido descritos los siguientes grupos de compuestos ácidos fenólicos y derivados (Romero *et al.*, 2002), como glucósidos del ácido cafeico y p-cumárico, derivados de la oleuropeína (Bianchi *et al.*, 1994), como el hidroxitirosol, ácido elenólico, verbascósido, derivados de los flavonoides (Romani *et al.*, 2000), como los glucósidos de la luteolina y rutina y, sólo en las aceitunas maduras, derivados de las antocianinas, como los glucósidos de la cianidina, peonidina, petunidina, delphinidina y malvidina.

Polifenoles del hueso

En la bibliografía se recoge cómo, junto a cantidades relativamente pequeñas de oleuropeína, en el hueso se han encontrado glucósidos de los secoiridoides de estructura muy compleja y que contienen el tirosol (Servili *et al.*, 1999). Estos compuestos son la nüzhenida y el oleósido.

Sin embargo, y al contrario de lo que cabría pensar, apenas hay trabajos publicados sobre la presencia de los lignanos en el hueso de la aceituna (Bonoli *et al.*, 2004), probablemente debido a la dificultad de extracción.

Los procesos de molturación actuales se basan en el tratamiento del fruto completo, de manera que se extrae el aceite por presión y triturado de la aceituna, por lo que la pasta está formada por aceite, pulpa y fragmentos de hueso. La idea de obtener aceites de oliva vírgenes sólo de la pulpa ha sido sugerida por varios autores (Frega *et al.*, 1999; Mulinacci *et al.*, 2005b).

Este procedimiento reduciría el rendimiento sólo en un 1,5% y como ventajas, permitiría obtener unos aceites de mayor calidad, menos oxidables, y se obtendría además una matriz con cantidades elevadas de polifenoles glucosilados (como la nuzheína) ó de lignanos.

El proceso de extracción del aceite de oliva virgen extra a partir de aceitunas deshuesadas es diferente de los procesos normales, con una pasta más homogénea comparada con la que se obtiene de la molturación de las aceitunas completas (Amirante *et al.*, 2002). La eliminación de los huesos podría disminuir la presencia de enzimas lipooxigenasas y peroxidasas, más abundantes en el hueso, y reducir los procesos oxidativos.

Polifenoles del orujo y del alpechín

Durante los últimos años se ha incrementado el interés por los componentes fenólicos del orujo y sobre todo del alpechín, por ser los principales componentes de la contaminación que producen estas aguas. En el orujo se han detectado ácidos fenólicos y derivados, aldehídos y alcoholes fenólicos, algunos flavonoides y también un número elevado de fenilpropanoides. Diversos estudios han atribuido una interesante actividad a este grupo de compuestos, en particular el verbascósido posee actividad antioxidante, neurosedativa, antiinflamatoria, antiviral y anticancerígena (Deepak *et al.*, 2000; Obied *et al.*, 2005).

En cuanto a los polifenoles de las aguas de vegetación, debido a que más del 90% de la fracción fenólica del fruto se separa con el alpechín, la finalidad de los estudios es evaluar la concentración de CMP presentes en estos residuos de la industria olivarera (Visioli *et al.*, 1999b) y conocer la posibilidad de recuperar algunos de estos compuestos. Estos estudios contribuyen a aumentar el valor de estos productos “de desecho”, de manera que, además de los múltiples usos que ya tienen, se puedan emplear para extraer determinados compuestos fenólicos que pueden ser empleados en terapéutica.

Según el trabajo realizado por Mulinacci *et al.* (2001), el contenido medio de polifenoles totales en muestras de alpechín de variedades italianas representativas variaba entre 150-400 mg/100 mL, valores superiores al de los alpechines de variedades españolas, portuguesas ó francesas. Lesage-Meessen *et al.* (2001) estudiaron las diferencias entre los residuos obtenidos con sistemas de extracción de dos y tres fases, encontrando mayores cantidades de polifenoles en el primero.

Este producto podría por tanto, ser una alternativa para la industria y una fuente interesante de polifenoles. En concreto, el hidroxitirosol puede ser recuperado tanto de las aguas de vegetación como del alpeorujo (Allouche *et al.*, 2004; Obied *et al.*, 2005).

Las moléculas más abundantes son el hidroxitirosol, tirosol y luteolina, seguidos de la rutina y el grupo de fenilpropanoides ya comentado para el orujo. Además, se ha visto que, debido a los procesos de hidrólisis enzimática, la concentración de OHTyr se incrementa días después de la molienda. Sin embargo, a diferencia con el aceite de oliva, las pérdidas de polifenoles durante el almacenamiento son muy elevadas, superiores al 95% después de un año (Baddi *et al.*, 2003).

Otros compuestos más hidrofílicos, como el verbascósido, que no se encuentran en el aceite pero que están presentes en las aguas de vegetación (Mulinacci *et al.*, 2001), son también de interés desde un punto de vista farmacológico, por sus propiedades antioxidantes.

3. ISLOTES PANCREÁTICOS Y DIABETES.

3.1. El islote de Langerhans y la célula β . Estructura y función.

Los islotes de Langerhans, descritos en 1869 por Paul Langerhans, son pequeñas estructuras pluricelulares con forma ovoidal compuestas por tejido endocrino que se hayan distribuidas por el páncreas exocrino. Cada islote es una mezcla compleja de células y puede funcionar separadamente, como un microórgano, o también concertado como páncreas endocrino. El páncreas humano contiene aproximadamente un millón de islotes. En los mamíferos, constituyen únicamente del 1 al 2 % de la masa total del páncreas en el adulto, pudiendo variar de tamaño y número de células, desde tener unas pocas células y un diámetro inferior a 40 μ m hasta estar formado por alrededor de 5000 células y superar los 400 μ m de diámetro (Bonner-Weir S., 1991).

Composición celular

Los islotes están compuestos por varios tipos de células endocrinas, entre las cuales destacan las células β (células secretoras de insulina), las células α (células secretoras de glucagón) y las células δ (células secretoras de somatostatina). También pueden encontrarse células PP (secretoras de polipéptido pancreático), células D1 (secretoras de péptido intestinal vasoactivo (VIP) y bombesina), células EC (secretoras de sustancia P y serotonina) y células G (secretoras de gastrina).

Entre todos los tipos celulares que forman el islote, la célula β es la más abundante y comprende más del 80 % del islote adulto (Bonner-Weir S., 1991). Esta se localiza, principalmente, en la parte central de la estructura, a diferencia de las demás células que se sitúan en la periferia del islote. En el caso de los islotes de ratón (Figura 4) las células β forman grupos celulares que se intercalan entre células no β . Las células no endocrinas incluyen células endoteliales, células nerviosas y fibroblastos. El islote está cubierto por una cápsula formada por una capa de fibroblastos y fibras de colágeno. En el humano no existe esta separación global entre diferentes tipos celulares, pero sí dentro de cada lóbulo.

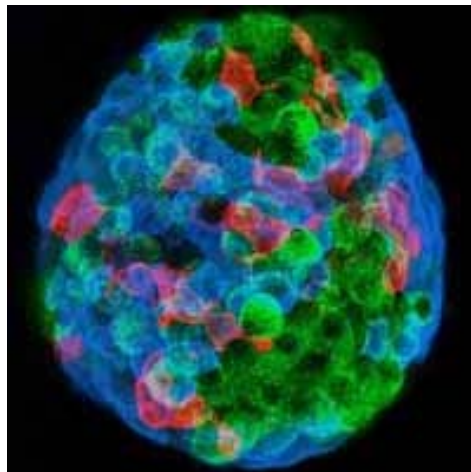


Figura 4: Imagen del islote de Langerhans. Distribución celular en islote pancreático de ratón. Las células β aparecen de color verde, las células α de color azul y las células δ de color rojo.
Figura tomada de la Tesis Doctoral de González Pertusa J.

Vascularización e inervación

Los microcapilares forman la infraestructura de un islote. La arteriola entra en el islote de Langerhans donde se ramifica, finalmente continúa con microcapilares eferentes que confluyen en vénulas colectoras. El tipo de vascularización varía según el tamaño del islote (Bonner-Weir S., 1991).

El páncreas está innervado por fibras autónomas cuyas terminaciones quedan próximas a las células de los islotes y juegan un papel fisiológico importante en la regulación de la secreción de insulina. No se han hallado sinapsis en los tejidos de los islotes, pero se aprecian asociaciones estrechas entre los terminales nerviosos y células endocrinas o endoteliales. Los agentes colinérgicos ejercen un efecto estimulador mediado por receptores muscarínicos, mientras que los adrenérgicos suprimen la actividad secretora de las células β por medio de los receptores β_2 -adrenérgicos.

El islote de Langerhans se comporta como un sincitio. Las células β están conectadas entre sí por uniones en hendidura, lo que explica la sincronía eléctrica y secretora de todas las células β que componen un islote (Nadal *et al.*, 1999), de forma que el islote de Langerhans funciona como un todo.

La célula β

Las células β pancreáticas son poliédricas, con un tamaño aproximado de 10 μ m de diámetro. En cada célula hay una media de 13000 gránulos de secreción de insulina, maduros e inmaduros, que ocupan aproximadamente el 10% del volumen de toda la célula.

La célula β se comporta como un sensor de glucosa, capaz de reaccionar al aumento de glucosa en sangre con la secreción activa de insulina. La eficacia de la célula β como sensor de glucosa se debe a un transportador de glucosa (GLUT-2) situado en la membrana plasmática, capaz de equilibrar las concentraciones extracelulares y citosólicas rápidamente y, a un aparato enzimático glucolítico especializado.

En condiciones fisiológicas, la secreción de insulina, y probablemente de otras hormonas pancreáticas es regulada principalmente, por la concentración de nutrientes circulantes, especialmente la glucemia.

En condiciones basales, la glucemia en sangre se mantiene entre 5 y 7 mM por acción simultánea y opuesta de insulina y glucagón. Cuando los niveles de glucosa en sangre aumentan tras la ingesta, las células β pancreáticas secretan insulina. Por el contrario, cuando los niveles quedan por debajo de la concentración basal de glucosa, las células α pancreáticas secretan glucagón, que activa la glucogenólisis y la gluconeogénesis en hígado, liberando D-glucosa al torrente circulatorio.

Aunque el principal determinante del aumento en la liberación de insulina es la elevación de los niveles de glucosa en sangre, otros nutrientes, como aminoácidos y ácidos grasos, tienen también un efecto sobre la actividad secretora de la célula (Opara *et al.*, 1994). Las hormonas y los neurotransmisores actúan en la célula β modulando la respuesta secretora inducida por nutrientes.

La célula β es eléctricamente excitable, ésta actividad eléctrica y su asociación con el flujo de Ca^{2+} al interior de la célula es el paso clave en la iniciación de la secreción (Martín *et al.*, 1997), de manera que los aumentos en la concentración de Ca^{2+} intracelular activan la exocitosis.

La insulina liberada en sangre actúa sobre los receptores de varios tipos celulares diferentes. Son más importantes las acciones de la insulina sobre las células hepáticas, musculares y del tejido adiposo. La misión de la insulina es incrementar la admisión de glucosa en las células, donde es metabolizada y almacenada como glucógeno o utilizada como un sustrato energético en la síntesis de proteínas y grasas.

La regulación fisiológica de la secreción del islote puede ser reproducida *in vitro*. El modelo de islotes aislados ha permitido clasificar diferentes compuestos como inhibidores, potenciadores e iniciadores de la secreción de insulina.

3.2. Diabetes y estrés oxidativo. Apoptosis.

Los pacientes diabéticos están expuestos al estrés oxidativo y las complicaciones de la enfermedad parecen también estar mediadas por el estrés oxidativo. La toxicidad de la glucosa en el islote es un daño no fisiológico y potencialmente irreversible de la célula β , causado por la exposición crónica a concentraciones de glucosa suprafisiológicas.

En los estados iniciales, este daño se caracteriza por una expresión defectuosa del gen de la insulina, que continúa con una desensibilización progresiva respecto a la estimulación por glucosa y un daño irreversible en los componentes de la síntesis de insulina, función mitocondrial y mecanismos de excitotoxicidad, que termina con la apoptosis celular (Robertson *et al.*, 2003).

La *hiperglucemia* es una de las causas principales del estrés oxidativo en la *diabetes tipo 2*, debido a que cuando se produce, el incremento del nivel en sangre de los azúcares reductores promueve la glicosilación de las proteínas a través de la reacción de Maillard, con la consecuente formación de las bases de Schiff, productos de Amadori y productos finales de la glicosilación.

En este proceso se forman especies reactivas del oxígeno (ROS) que producen daño tisular (Kimoto *et al.*, 2003). Recientemente, se ha descrito que el deterioro progresivo de la función de la célula beta en la diabetes tipo 2 se debe al daño tisular inducido por el estrés oxidativo.

Debido a la expresión relativamente baja de enzimas antioxidantes, las células β son más vulnerables al estrés oxidativo que otros tejidos (Lenzen *et al.*, 1996). Además, el estrés oxidativo incrementa la apoptosis de las células beta y suprime la biosíntesis de la insulina (Kaneto *et al.*, 1996; Matsuoka *et al.*, 1997).

La *diabetes autoinmune tipo 1* se caracteriza por la aparición de anticuerpos circulantes frente a proteínas de la célula β antes de la manifestación

clínica de la enfermedad. Estos anticuerpos están dirigidos frente a insulina y otras proteínas involucradas en la ruta de regulación de la secreción.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son también un elemento importante en el proceso de destrucción de las células β pancreáticas en la diabetes autoinmune tipo 1 (Tiedge *et al.*, 1999; Martín-Gallán *et al.*, 2003). Las citoquinas proinflamatorias inducen la generación de radicales libres del oxígeno, lo que conduce a un daño no selectivo de las estructuras de las células β , como proteínas y DNA, dando lugar a la muerte celular por necrosis y apoptosis (Lortz *et al.*, 2000).

Cada vez hay mayores evidencias de que la apoptosis es el mecanismo principal de la muerte de la célula β que conduce a la diabetes tipo 1, y que la destrucción de estas células es causada por la infiltración de linfocitos en los islotes pancreáticos (Kay *et al.*, 2000). Por otra parte, las células β también sufren apoptosis en la diabetes tipo 2 (Laybutt *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2003), como ya se ha comentado anteriormente.

Los mecanismos por los que tiene lugar la apoptosis han sido estudiados por numerosos autores, sobre todo en células β . La inducción de ciertos genes, como el antioxidante hemo oxigenasa-1 (HO-1), antiapoptóticos A20, Bcl-xl y Bcl-2 supone una protección, mientras que la expresión de los factores de transcripción p53, p38 ó la proteína termosensible 70 (HSP70) desencadenaría la apoptosis mediada por estrés (Tobiasch *et al.*, 2001; Gohil *et al.*, 2002; Owuor *et al.*, 2002; Kimoto *et al.*, 2003).

Tanto la inhibición de esta muerte celular programada, como su desarrollo, tienen lugar por medio de la ruta bioquímica de las MAP kinasas y caspasas (Chen *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2001; Owuor *et al.*, 2002).

En esta cadena, pueden intervenir algunos compuestos fenólicos, como las catequinas del té (Mukhtar *et al.*, 1999; Kundu *et al.*, 2003) y otros flavonoides presentes en frutas y verduras (Gohil *et al.*, 2002), de manera que la regulación genética de este proceso ha sido propuesta como mecanismo anticarcinogénico en modelos animales de experimentación (Yu *et al.*, 2000; ; Brash *et al.*, 2002; Owuor *et al.*, 2002) y como prevención frente a enfermedades como diabetes, obesidad ó aterosclerosis (Orzechowski *et al.*, 2002).

II. OBJETIVOS

Las defensas antioxidantes del organismo son claves en las patologías crónicas y el envejecimiento. Asimismo, la dieta, fuente principal de antioxidantes, es fundamental en la prevención de enfermedades. En la actualidad, la investigación está orientada a establecer los mecanismos por los que el aceite de oliva virgen extra ejerce efectos beneficiosos para la salud. En este sentido, se pretende estudiar los componentes antioxidantes presentes en el aceite de oliva virgen extra, como la vitamina E y los polifenoles, así como conocer sus posibles efectos biológicos. Por tanto, en este trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Realizar un estudio preliminar de algunos parámetros que definen la *calidad* de aceites de oliva virgen extra con Denominación de Origen.
2. Determinar la composición de *a-tocoferol* en las muestras de aceite de oliva virgen extra.
3. Estudiar la composición cuali-cuantitativa de *compuestos fenólicos* en las muestras analizadas.
4. Comparar el perfil polifenólico de muestras de aceites de oliva virgen extra de *variedades españolas e italianas*.
5. Conocer la distribución de *lignanos*, en *aceitunas* de variedades *españolas e italianas*.
6. Investigar los posibles *efectos biológicos in vivo* del aceite de oliva virgen extra.

II. OBJECTIVES

1. Preliminary assay to evaluate some parameters defining *quality* from extra virgin olive oils with origin designation.
2. Determination of *α-tocopherol* composition in the samples of extra virgin olive oil.
3. Study of qualitative-quantitative composition of *phenolic compounds* in the analysed samples.
4. Comparison of the phenolic profile from diverse *Spanish and Italian monocultivar* extra virgin olive oils.
5. Study of *lignans* distribution in *Spanish and Italian Olea europea* fruits.
6. Research of *in vivo biologic properties* of extra virgin olive oil.

III. PARTE EXPERIMENTAL

1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO - QUÍMICA DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los análisis realizados en este apartado llevaron a cabo siguiendo el Reglamento (CEE) nº2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis, vigente en el momento del estudio. Posteriormente, el Reglamento (CE) nº1989/2003, modificó al anterior. Las muestras empleadas han sido aceites de oliva virgen extra de la variedad Picual con Denominación de Origen, obtenidas en la campaña olivareras 2001-2002.

La medida de los índices físico-químicos de calidad de un aceite de oliva, junto con la valoración organoléptica, permiten clasificarlo como virgen extra. Todos los reactivos empleados en la medida de estos índices han sido de calidad analítica reconocida.

1.1. Determinación del grado de acidez

La medida del grado de acidez del aceite expresa el contenido en ácidos grasos libres, expresado como porcentaje de ácido oleico y calculado según el método convencional.

Material y Reactivos

- Balanza analítica monoplano AE200. Mettler -Toledo.
- Material necesario para volumetría.
- Fenolftaleína. Disolución al 1% (m/v) en etanol al 95% (v/v). Panreac. (Barcelona, España).
- Disolución valorada de hidróxido potásico 0,1 M en etanol. Panreac.
- Disolución de éter dietílico y etanol al 95% (v/v) en proporción 1:1(v/v) PAI, Panreac. Neutralizada en el momento de su utilización con la disolución de hidróxido potásico.

Procedimiento

Las muestras de aceite (20 g), perfectamente homogéneas ó filtradas se disolvieron en 150 mL de la disolución de éter y etanol, previamente neutralizada. Se realizó una valoración ácido-base con la disolución de hidróxido potásico, hasta viraje del indicador (coloración rosa permanente al menos diez segundos).

1.2. Determinación del índice de peróxidos

La medida del índice de peróxidos se basa en determinar la cantidad (mEq de O₂ activo/Kg de aceite) de peróxidos presentes en la muestras, que ocasionan la oxidación del yoduro potásico en las condiciones de trabajo.

Material y Reactivos

- Balanza analítica.
- Material necesario para volumetría.
- Cloroformo PAI. Panreac.
- Ácido acético glacial PAI. Panreac.
- Disolución acuosa saturada de yoduro potásico recién preparada. PRS. Panreac.
- Disolución acuosa de tiosulfato sódico 0,01 N valorada. Panreac.
- Disolución acuosa de almidón 10g/L. Panreac.
- Disolución acuosa de dicromato potásico. Panreac.

Procedimiento

Las muestras de aceite (5g), protegidas de la luz a lo largo del análisis, se mezclaron con 10 mL de cloroformo, 15 mL de acético y 1 mL de yoduro potásico, se taparon y se agitaron durante 1 minuto, manteniéndolas en oscuridad durante 5 minutos (20 °C). Se añadieron 75 mL de agua destilada y se valoró el yodo liberado con la disolución de tiosulfato sódico, empleando la solución de almidón como indicador.

1.3. Prueba espectrofotométrica en el U.V.

Determinación del K_{232} y K_{270}

La prueba espectrofotométrica en el U.V proporciona indicaciones sobre la calidad del aceite, su estado de conservación y las modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos. Las absorciones a estas longitudes de onda se deben a la presencia de dienos y trienos conjugados. Los valores de estas absorbancias se expresan en extinción específica, convencionalmente como K, denominado coeficiente de extinción.

Material y Reactivos

- Cubetas de cuarzo de 1 cm. PE.
- Espectrofotómetro U.V-vis. Boeco S-22.
- Isooctano PAI. Panreac.

Procedimiento

Las muestras de aceite (0,25 g), perfectamente homogéneas, filtradas y disueltas en isooctano se midieron en el espectrofotómetro a 232 y 270 nm de longitud de onda. Se realizaron diluciones en los casos en los que los valores de extinción obtenidos se encontraban fuera del rango 0,1-0,8.

1.4. Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos

La determinación por cromatografía en fase gaseosa de la composición cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos del aceite de oliva virgen extra se llevó a cabo mediante la obtención de los correspondientes ésteres metílicos.

Material y Reactivos

- Cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Autosystem (HP 5890), equipado con una columna capilar supelco spTM 2380 30 m ? 0,25 mm, 0,2 µ de espesor film, con sistema inyector estándar y detector de ionización de llama (FID).
- Microjeringa de 10 µL. Hamilton.
- Nitrógeno e Hidrógeno. Air Liquide. Alpha Gaz.
- Baño de agua termostatzado. P-Selecta.
- Metilato sódico 0,2 N en metanol absoluto.
- Disolución de ácido sulfúrico al 3-4 % (v/v) en metanol absoluto. Panreac.
- Hexano PAI. Panreac.
- Éter de petróleo PAI. Panreac.
- Disolución acuosa saturada de NaCl. Panreac.
- Patrones de ácidos grasos. Sigma.

- El programa de temperaturas empleado para la separación de los ésteres metílicos fue el siguiente: 60 °C durante 3 minutos, rampa de 5 °C/min, 170 °C durante 9 minutos, rampa de 10 °C/min y 230 °C durante 4 minutos. Temperatura del inyector: 250 °C. Temperatura del detector: 270 °C.

Procedimiento

Las muestras de aceite se llevaron a ebullición con reflujo durante 5 minutos con 6 mL de la solución de hidróxido potásico. Se interrumpió la calefacción para agregar 6 mL de disolución de sulfúrico en metanol, manteniendo la ebullición otros 5 minutos para lograr la formación de los ésteres metílicos. La disolución de estos ésteres con hexano y disolución acuosa saturada de cloruro sódico, permitió separar la fracción saponificable, que una vez filtrada se inyectó en el cromatógrafo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.1. Grado de acidez, índice de peróxidos y absorción en el ultravioleta

La figura 1 muestra los resultados obtenidos en la determinación de los índices de calidad de las muestras estudiadas. La acidez ha oscilado entre 0,15 y 0,49, con un valor medio del 0,28 %. Los resultados obtenidos en los demás índices físico-químicos también indicaron que existía un nivel bajo de oxidación en las muestras estudiadas. Estos aceites se encontraban dentro de la normativa europea vigente en el momento en que se realizaron los análisis (Reglamento CEE nº 2568/91), que establecía un valor de grado de acidez menor del 1 %, índice de peróxidos de 20 mEq O₂/Kg y valores de 0,22 y 2,5 para la absorción a 270 y 232 nm, respectivamente, en el aceite de oliva virgen extra. En la actualidad, el Reglamento (CE) nº 1989/2003, que modifica al anterior, reduce los índices físico-químicos para clasificar un aceite de oliva como virgen extra, hasta el 0,8 % de acidez, de manera que estos aceites se pueden seguir considerando como vírgenes extra.

DETERMINACIONES	MEDIA	S.D.	MÁXIMO	MÍNIMO
GRADO DE ACIDEZ (%)	0,28	0,08	0,49	0,15
ÍNDICE DE PERÓXIDOS (mEqO ₂ /Kg)	5,33	2,35	10,17	1,97
K270	0,12	0,01	0,15	0,09
K232	1,69	0,22	2,25	1,42

Figura 1. Resultados de los índices de calidad de las muestras de aceite de oliva virgen extra estudiadas.

Los valores son similares e incluso menores que los encontrados en la bibliografía para otros aceites españoles, como los de la variedad Arbequina, con una acidez más próxima al 1%, un valor de 7-11 mEq/Kg de peróxidos y un 72 % de oleico (Tous *et al.*, 1997; Motilva *et al.*, 1998; Gracia *et al.*, 2001). Estos resultados son comparables a los estudios sobre aceites italianos (Angerosa *et al.*, 1996; Ranalli *et al.*, 1999; Giacometti *et al.*, 2001; Lavelli *et al.*, 2005). Algunos autores (Jiménez *et al.*, 1995; Amirante *et al.*, 2001; Vekiari *et al.*, 2002b) han estudiado la calidad del aceite de oliva virgen extra en función del método de extracción, comprobando que la acidez es menor conforme se añaden menores cantidades de agua a la pasta.

1.2. Perfil de ácidos grasos

La calidad nutricional del aceite de oliva virgen extra depende también del perfil de ácidos grasos, conveniente para una adecuada función celular, de ahí la importancia de su contenido en ácido oleico y ácidos grasos esenciales, además de su composición en antioxidantes. El ácido graso mayoritario en el aceite de oliva es el oleico, que representa aproximadamente el 79% del total de ácidos grasos. Dependiendo de la región de origen y el tipo de aceituna, esa cantidad puede variar ampliamente, de modo que hay aceites en los que el oleico es mínimo, del orden del 57%, mientras que en otros, puede alcanzar el 82%, como sucedería en el caso de la variedad Picual, con un 15% de saturados y un 6% de poliinsaturados. El ácido monoinsaturado oleico ayuda a la formación de una membrana celular más estable frente a la oxidación y además, parece que es capaz, junto con los poliinsaturados, de regular la expresión de determinados genes, por lo que adquiere gran importancia el papel de los ácidos grasos como reguladores de la expresión génica.

Las muestras de aceite analizadas muestran un elevado contenido en ácido oleico, superior al 80% ($80,44 \pm 0,72$) en su mayoría. Los ácidos grasos que

siguen en cantidad, son los saturados, que se encuentran en unas concentraciones próximas al 15%, aportadas fundamentalmente por el palmítico ($10,39 \pm 0,35$ %) y el esteárico ($2,76 \pm 0,69$ %).

En cuanto a los poliinsaturados, el linoleico se encuentra en una proporción media del 4 %, mientras que el α -linolénico se sitúa en valores próximos al 0,6%. Los análisis demuestran que la composición en ácidos grasos de los aceites estudiados, se encuentra dentro del rango establecido por la normativa europea para el aceite de oliva virgen extra. Se aprecian diferencias en el contenido en ácido oleico, con aceites procedentes de otras variedades de aceituna, como la Arbequina (Motilva *et al.*, 2001; Gracia *et al.*, 2001).

Además, el porcentaje de los ácidos mirístico, linolénico, aráquico, behénico y lignocérico en estas muestras se encuentra dentro de los límites marcados por la legislación para los aceites de oliva virgen extra.

ÁCIDO GRASO(%)	MEDIA	S.D.	MÁXIMO	MÍNIMO
Mirístico	0,03	0,04	0,17	0
Palmítico	10,39	0,35	10,89	9,86
Palmitoleico	0,63	0,06	0,74	0,54
Margárico	0,05	0,02	0,11	0,02
Margaroleico	0,1	0,02	0,18	0,07
Esteárico	2,76	0,69	3,37	0,25
Oleico	80,44	0,72	82	79,52
Linoleico	4,13	1,27	7,32	2,81
Aráquico	0,35	0,01	0,4	0,33
Linolénico	0,57	0,03	0,66	0,52
Gadoleico	0,2	0,07	0,25	0
C21	$7,8 \cdot 10^{-3}$	0,01	0,03	0
Behénico	0,1	0,02	0,16	0,08
C23	0,6	0,16	0,7	0,02
Lignocérico	0,1	0,14	0,5	0,03

Figura 2. Porcentaje de los ácidos grasos cuantificados en las muestras de aceite estudiadas.

Por último, se ha estudiado la relación $\omega 6/\omega 3$, ya que en la actualidad, se considera que un moderado aporte de ácido linoleico va a ser más acorde con las tendencias actuales de alimentación saludable. En este sentido, se recomienda que esta relación $\omega 6/\omega 3$ oscile entre valores 5 y 10. En los aceites objeto de estudio se han encontrado valores que oscilan entre 5,31 y 7,55 ($6,37 \pm 0,68$), que podemos considerar muy adecuados desde el punto de vista nutricional.

Los estudios sobre los ácidos grasos $\omega 3$ son cada vez más numerosos, por el papel del ácido eicosapentaenoico (EPA) en la regulación de las citoquinas (Gómez C., 2002). Cuando el EPA está disponible, reemplaza al ácido araquidónico en los fosfolípidos de las membranas celulares y se sintetizan eicosanoides menos proinflamatorios. Además, hay estudios con animales de experimentación sobre el efecto protector en el desarrollo y la progresión de distintos modelos tumorales.

La regulación de la expresión génica por parte de los nutrientes, se realiza principalmente a través de su interacción con proteínas, que da lugar a un aumento ó disminución de la transcripción de DNA a RNA_m del gen diana. Hay estudios (Ntambi J.M., 1999; Young V.R., 2002) sobre el efecto de los $\omega 6$ y $\omega 3$ sobre la expresión génica de enzimas hepáticas, mientras que no se ha observado ningún efecto con los ácidos grasos saturados.

2. ESTUDIO DE ANTIOXIDANTES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Estudio del contenido en vitamina E del aceite de oliva virgen extra

MATERIAL Y REACTIVOS

La extracción del α -tocoferol de las muestras de aceite y su posterior análisis cuantitativo mediante HPLC se ha realizado empleando los siguientes materiales y reactivos de laboratorio:

✍ Material

- Balanza analítica monoplano AE200. Mettler –Toledo.
- Baño de agua termostatzado. P-Selecta.
- Cubetas plástico 10x10mm. Boeco (Hamburgo, Alemania).
- Espectrofotómetro UV-vis. Boeco S-22.
- Insertos automuestreador 150 μ L. Scharlau. (Barcelona, España)
- Jeringas de 5 mL. Plastipak BD (Madrid, España)
- Kitasato, equipo de filtración y Filtros de celulosa de 47mm, 17 mm y 0,45 μ m tamaño poro. Millipore.
- Material necesario para volumetría de vidrio color ámbar.
- Viales automuestreador 12x32mm, 1.8mL. Kimble K633. Scharlau

✍ Reactivos

- Ácido acético glacial. Panreac. (Barcelona, España).
- Ácido ascórbico. Panreac.
- Agua MilliQ para HPLC. Millipore (Madrid, España)
- Estándar de (\pm)- α -Acetato de Tocoferol. Sigma.
- Estándar de (\pm)- α -Tocoferol de 95% de pureza. Sigma.
- Etanol de pureza analítica para HPLC. Panreac.
- Éter de petróleo de pureza analítica para HPLC. Panreac.
- Éter dietílico de pureza analítica para HPLC. Panreac.
- Fenolftaleína. Disolución al 1% (m/v) en etanol. Panreac.
- Helio N50. Air Liquide. Alpha Gaz (Madrid, España).
- Hidróxido potásico al 85%. Disolución al 50% (m/v) en agua. Panreac.
- Metanol de pureza analítica para HPLC. Panreac.
- Nitrógeno. Air Liquide. Alpha Gaz.
- Pirogalol. Disolución al 1% (m/v) en etanol. Panreac.

✍ Muestras de aceite de oliva analizadas y área de origen seleccionada

Las muestras analizadas en este estudio son los aceites de oliva virgen extra de la última campaña estudiada en esta tesis (2003-2004). Al igual que en el estudio de los polifenoles, la extracción de todas las muestras se realizó por duplicado.

PROCEDIMIENTO

2.1.1. Saponificación y Extracción del α -Tocoferol

La determinación de la vitamina E mediante cromatografía HPLC requiere el tratamiento previo de la muestra, que consistió en una saponificación de los ácidos grasos para eliminar la interferencia producida por los triglicéridos, seguida de una extracción de la fracción insaponificable con disolvente apolar. Las muestras se mantuvieron protegidas de la luz durante todo el proceso de análisis.

La saponificación se ha realizado en un matraz de vidrio color topacio, de acuerdo con la técnica de Ruiz *et al.* (1995), con algunas modificaciones. La mezcla fue gaseada con N_2 , tapada, agitada y se mantuvo a reflujo en un baño de agua a $60^\circ C$ durante 30 minutos. Durante este tiempo, los matraces se gasearon con N_2 y fueron agitados periódicamente, para asegurar la completa saponificación de la grasa. A continuación, las muestras, neutralizadas con ácido acético, fueron enfriadas, colocando los matraces en un baño de hielo.

La fracción insaponificable fue extraída con 100 mL de éter dietílico:éter de petróleo 1:1 (v/v), fraccionados en dos extracciones. Las dos fases orgánicas obtenidas se recogieron y se lavaron repetidamente con agua hasta pH neutro del líquido de lavado.

La mezcla extractante fue evaporada primero en un rotavapor a temperatura suave hasta un volumen aproximado de 2 mL. El extracto se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno, para posteriormente redisolverlo en metanol. Una vez filtrados los extractos se inyectaron en el HPLC inmediatamente, para evitar la oxidación y descomposición de la vitamina E.

2.1.2. Determinación cuantitativa de a-Tocoferol mediante HPLC-DAD

El análisis de la vitamina E se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido Waters 2690 equipado con inyector automático, bomba binaria y detector diodo-array Waters 996 (Barcelona, España).

La columna de separación empleada ha sido previamente descrita en el apartado 2.1. de este mismo capítulo. En este caso, la columna se mantuvo a una temperatura de 24.9°C durante el desarrollo cromatográfico.

La fase móvil estaba constituida por metanol y un 2% (v/v) de agua, con un gradiente de elución isocrático a un flujo de 0.75 mL/minuto. La duración de cada ciclo cromatográfico fue de 20 minutos.

La cuantificación se realizó como en el apartado anterior (2.1.), pero en este caso, la recta de calibración de la vitamina E fue de orden uno, es decir, se emplearon concentraciones crecientes del patrón para construirla. El estándar interno empleado para la cuantificación fue el acetato de tocoferol, de manera que se adicionaron 100 mg/Kg a cada muestra.

Las soluciones stock (1000 mg/Kg) del estándar interno y del estándar de a-tocoferol se prepararon nuevas cada semana y se mantuvieron en refrigeración, en oscuridad y fueron gaseadas con gas inerte cada vez que se manipularon.

La concentración de las disoluciones estándar (en metanol) fue contrastada antes de cada análisis, sustituyendo en la siguiente fórmula el coeficiente de extinción específica del a-tocoferol (72) y acetato de tocoferol (40) y la absorbancia medida a 290 nm (Talwar *et al.*, 1998):

$$\text{Concentración (mg/L)} = \text{Absorbancia} \times 10^4 / E_{1\text{cm}}^{1\%}$$

La vitamina E se cuantificó en el HPLC a 291 nm, mientras que la longitud de onda de máxima absorción del acetato de tocoferol fue 284 nm. La inyección de disoluciones de ambos compuestos con distinta concentración permitió obtener los correspondientes tiempos de retención, espectros de absorción UV, así como realizar la calibración.

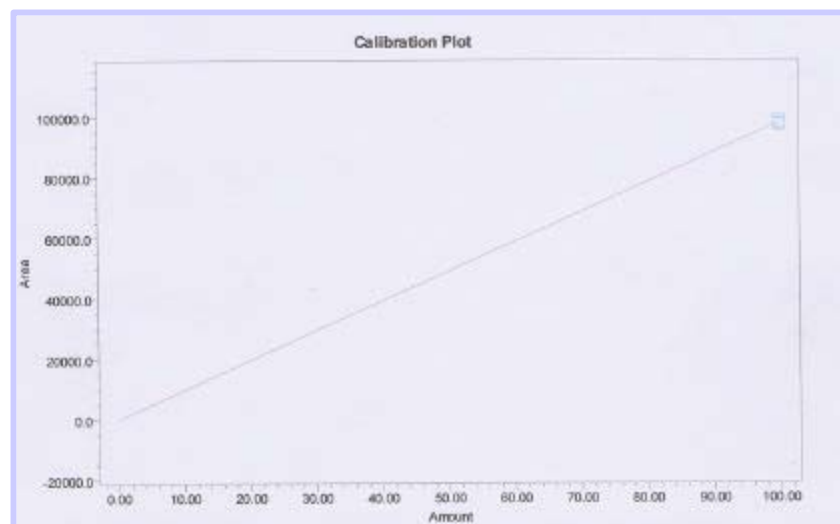
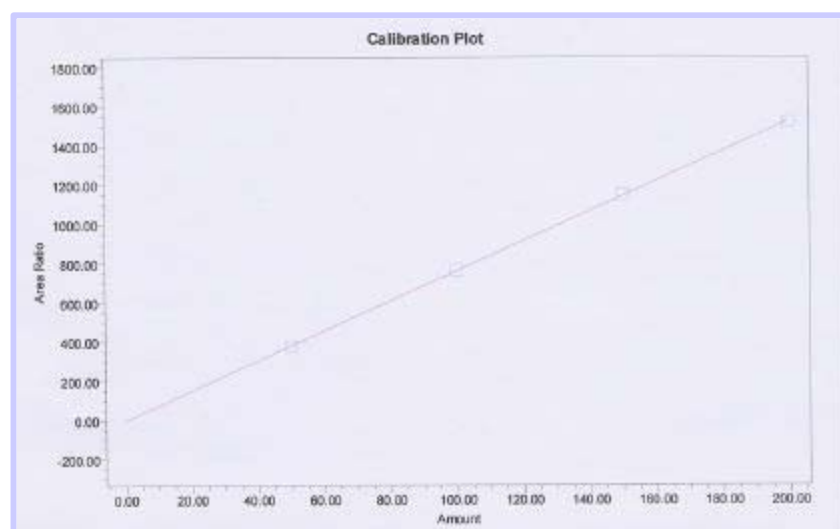


Figura 1: Rectas de calibración del α -tocoferol y acetato de tocoferol

Las rectas de calibrado se prepararon a partir de las disoluciones estándar antes de cada inyección de muestras en el HPLC. La figura muestra una recta de calibración de la vitamina E ($r^2=0.9998$), preparada a partir de una solución stock de 1000 mg/Kg.

La determinación por HPLC con fluorescencia se realizó en el mismo HPLC acoplado a un detector Waters M474, empleando una λ_{exc} a 295 nm y una λ_{em} a 330 nm. La columna fue una Lichrosorb S.I.60 250x4 mm (5 μ m) y las demás condiciones cromatográficas se mantuvieron iguales.

Se ha realizado un ensayo interlaboratorio (Laboratorio Agroalimentario de Atarfe) con tres muestras de los aceites estudiados, con el fin de comprobar los resultados.

2.2. Estudio de la composición polifenólica del aceite de oliva virgen extra a lo largo de varias campañas

MATERIAL Y REACTIVOS

Para la realización de los métodos de cromatografía líquida de alta eficacia, se han empleado los siguientes materiales y reactivos de laboratorio:

✍ Material

- Balanza analítica monoplano AE200. Mettler – Toledo.
- Baño de agua termostatzado. P-Selecta.
- Cromatógrafo de gases HP 5890, equipado con una columna capilar OV-101, 30 m x 0.25 mm d.i. (0.25 µm espesor).
- Cubetas plástico 10x10mm. Boeco (Hamburgo, Alemania).
- Espectrofotómetro UV-vis. Boeco S-22.
- Insertos automuestreador 150 µL. Scharlau. (Barcelona, España)
- Jeringas de 5 mL. Plastipak BD (Madrid, España)
- Kitasato, equipo de filtración y Filtros de celulosa de 47mm, 17 mm y 0,45 µm tamaño poro. Millipore.
- Material necesario para volumetría.

- Rotavapor 144 Büchi (Suiza) y baño termostatzado P-Selecta.
- Viales automuestreador 12x32mm, 1.8mL. Kimble K633. Scharlau

✍ Reactivos

- Acetonitrilo de pureza analítica para HPLC. Panreac. (Barcelona, España).
- Ácido acético glacial de pureza analítica para HPLC. Panreac.
- Agua MilliQ para HPLC. Millipore (Madrid, España)
- Carbonato sódico. Panreac. Disolución preparada al 20% (m/v).
- Cromato potásico. Panreac.
- Helio N50. Air Liquide. Alpha Gaz.
- Hexano de pureza analítica para HPLC. Panreac.
- Hidróxido potásico. Panreac.
- Metanol de pureza analítica para HPLC. Panreac.
- Nitrógeno. Air Liquide. Alpha Gaz (Madrid, España)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu. Merck. (Darmstadt, Alemania)
- Reactivo de trimetilsilano (hexametildisilazano-trimetilclorosilano-piridina anhidra 45:35:50 v/v/v). Sigma

✍ Sustancias patrón

- Ácido Cafeico. Fluka (Barcelona, España)
- Ácido o-Cumárico. Fluka.
- Ácido p-Cumárico. Sigma (Madrid, España)

- Ácido Ferúlico. Sigma.
- Ácido Gálico. Sigma.
- Ácido Sirínquico. Sigma.
- Ácido Vaníllico. Sigma.
- Apigenina. Sigma.
- Hidroxitirosol 2-(3,4-Dihidroxifenil) etanol del 95% de pureza, sintetizado por reducción con LiAlH_4 a partir del ácido 3,4-dihidroxifenil acético, siguiendo la técnica descrita por Baraldi *et al.* (1983)
- Luteolina. Sigma.
- Tirosol. Sigma.
- Vainillina. Merck.

☞ Muestras de aceite de oliva analizadas y área de origen seleccionada

Las muestras analizadas en este estudio son 45 aceites de oliva virgen extra monovarietales españoles con Denominación de Origen. El estudio se ha realizado a lo largo de tres campañas olivareras: 2001-2002, 2002-2003 y 2003-2004.

Las muestras de aceite pertenecen a la variedad *Picual*, la más abundante en Andalucía y han sido obtenidas por el sistema bifásico de extracción. Algunas muestras de aceite del periodo 2002-2003 se obtuvieron por un proceso de molturación bajo patente, basado en el empleo de rodillos. Todos los aceites se almacenaron a 4°C en ausencia de luz, empleando botellas de vidrio color ámbar hasta su análisis.

PROCEDIMIENTO

2.2.1. Determinación espectrofotométrica de los polifenoles totales

La determinación de los polifenoles se ha realizado por el método descrito por Vázquez *et al.* (1973). El conjunto de los compuestos fenólicos del aceite se oxidan por el reactivo de Folin-Ciocalteu, mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) en un medio alcalino (pH 11.5) y son reducidos por acción de los polifenoles dando lugar a la formación de óxidos de tungsteno y molibdeno (W_8O_{23} , Mo_8O_{23}) de color azul. La coloración azul producida posee una absorción máxima en torno a los 725 nm, proporcional al contenido en compuestos fenólicos.

Con la finalidad de asegurar la fiabilidad de la medida de la absorbancia se realizó la comprobación del espectrofotómetro, preparando una disolución de 0.2 g de cromato potásico en un litro de hidróxido potásico 0.05 N. Una dilución 1:20 de esta solución fue medida por triplicado a 275 nm y como la lectura se encontraba dentro del rango 0.2 ± 0.005 de absorbancia, se procedió a la determinación de los polifenoles totales.

La recta de calibración se realizó a partir de una disolución madre de ácido gálico de 0.5 g/L, de modo que a partir de ella se prepararon los cinco puntos de la recta de calibrado ($r^2=0.9994$).

La reacción de oxidación-reducción del reactivo de Folin tiene lugar en medio básico y se pone de manifiesto al medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 725 nm pasados 30 minutos.

Preparación de la muestra

La extracción de los polifenoles del aceite se ha realizado con 50 mL de mezcla MeOH:H₂O 40:60 (v/v), fraccionados en tres volúmenes. Posteriormente, se realizaron tres lavados con hexano y se separó la fase acuosa, donde se habían extraído los compuestos fenólicos. La medida de la absorbancia en las mismas condiciones que con la recta de calibrado permite conocer la concentración de polifenoles totales, por extrapolación en la recta.

2.2.2. Análisis cuali-cuantitativo de los polifenoles por HPLC-DAD y GC-MS

Extracción líquido – líquido de las muestras de aceite de oliva

Para la extracción de los polifenoles del aceite se ha seguido el método descrito por varios autores (Montedoro *et al.*, 1992a; Brenes *et al.*, 1999, Brenes *et al.*, 2000a; Pirisi *et al.*, 2000; Mateos *et al.*, 2001) con pequeñas modificaciones. Cada muestra de aceite (10g) se extrajo con 4x40 mL de la mezcla MeOH:H₂O 80:20 (v/v). El extracto alcohólico así obtenido se concentró bajo vacío (30°C) hasta sequedad, dejando un residuo que se disolvió en acetonitrilo. Se realizaron tres lavados con hexano, con la finalidad de eliminar completamente la fracción lipídica. La fase inferior decantada se recogió y se evaporó de nuevo en el rotavapor, de manera que el residuo final se redisolvió en 2 mL de metanol y se filtró antes de ser analizado por HPLC/DAD para la determinación de los compuestos menores polares.

Análisis de los compuestos fenólicos por HPLC-DAD

El análisis de los polifenoles extraídos de las muestras de aceite de oliva se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido Perkin-Elmer Series 200 equipado con inyector automático, bomba binaria y detector diodo-array (P-E., Madrid, España)

y software TotalChrom v6.2 con LCI. Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

- La columna de separación empleada ha sido una Lichrospher 100 RP18 para Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de 250x4mm (5 μ m), termostaticada a 37°C. Teknokrom (Barcelona, España).
- Para la elución de las muestras se emplearon dos solventes desgasificados compuestos por (A) Agua:Acético 97:3 (v/v) y (B) Metanol:Acetonitrilo 50:50 (v/v).
- El gradiente de elución lineal utilizado para obtener una separación correcta comenzaba con un 95% de la fase A, que disminuía hasta alcanzar un 100% de fase B, manteniendo un flujo de solvente de 1 mL/min. La duración del método fue de 60 minutos, con un tiempo de recuperación entre cada inyección de 15 minutos. Para llegar a este programa se realizó un estudio previo de optimización tanto del flujo como del gradiente a seguir.

Tiempo (min)	% Agua:Acético (90:70)	% Metanol:Acetonitrilo (50:50)
0	95	5
25	70	30
35	65	35
40	60	40
50	30	70
55	0	100
60	0	100

Se prepararon varias disoluciones de distinta concentración con cada uno de los patrones puros, de manera que se inyectaron individualmente en el HPLC en las condiciones arriba descritas, para así obtener el tiempo de elución de cada compuesto y espectro UV, así como su factor de respuesta.

De igual modo, se preparó una solución madre stock en metanol, con todos los polifenoles que se querían estudiar en las muestras de aceite, realizando diluciones que se inyectaron en el HPLC para obtener el orden de elución de los compuestos y longitud de onda de máxima absorción y para optimizar el método cromatográfico en la separación de los polifenoles deseados.

Para confirmar la presencia e identidad de los compuestos fenólicos estudiados, se contrastaron los t_R de cada pico con los de los estándares y se obtuvieron sus espectros de absorción UV, para compararlos con los correspondientes espectros obtenidos de los patrones puros. Además, se realizó la adición de los patrones a varias muestras problema, para comprobar el aumento de área de los picos cromatográficos. La cuantificación individual de los compuestos fenólicos identificados en cada muestra de aceite, se realizó siguiendo la técnica del estándar interno.

La ventaja de este método radica en que los resultados son independientes del volumen de muestra inyectado. Trabaja con factor de respuesta, definido como la relación entre la concentración del estándar y el área de pico cromatográfico, factor que fue calculado para cada compuesto.

El estándar interno empleado para la cuantificación fue el ácido o-cumárico. Se adicionó a la muestra una cantidad conocida de este compuesto, no presente en la muestra pero químicamente parecido a algunos compuestos fenólicos y todos los cálculos se hicieron con referencia a él. Para ello, se emplearon dos soluciones stock ($100 \cdot 10^{-3} \text{mg/mL}$) del patrón interno, en concentraciones similares a las empleadas por otros autores (Mateos *et al.*, 2001).

Una de ellas se preparó en metanol, con la finalidad de obtener el correspondiente espectro UV y conocer el orden de elución en el cromatograma, y otra, en la mezcla extractiva MeOH:H₂O; de esta última se tomó un volumen determinado y se adicionó a todas las muestras de aceite antes de cada extracción.

Estudio de la estructura de los polifenoles por GC- MS

La identificación de los compuestos polifenólicos se confirmó empleando además la técnica de espectrometría de masas en la detección, asociada a un cromatógrafo de gases previamente descrito. Los derivados volátiles de los polifenoles se prepararon añadiendo 0.5 mL del reactivo TMS al extracto de polifenoles (2mL) y calentando la mezcla en un baño (80°C) durante 10 minutos. El programa de temperaturas de cromatógrafo fue el siguiente: temperatura inicial 100°C, 100-270°C a 4°C/min, 20 minutos a 270°C. La temperatura del inyector fue de 250°C. (Owen *et al.*, 2000c).

La interfase empleada fue un HP 1100 MSD API-electrospray (espectrometría de masas con ionización por electrospray). Las condiciones experimentales fueron similares a las encontradas en bibliografía para el estudio de polifenoles (Romani *et al.*, 1999, 2000; Pinelli *et al.*, 2003; Cardoso *et al.*, 2005; Obied *et al.*, 2005; Mulinacci *et al.*, 2005b). Se ha trabajado en modo negativo, empleando bajas energías de fragmentación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Estudio del contenido en vitamina E del aceite de oliva virgen extra

2.1.1. Influencia de las condiciones de extracción del α -Tocoferol en el aceite de oliva virgen extra variedad Picual

El análisis de la vitamina E en el aceite ha estado condicionado por las propiedades de los tocoferoles, tanto en el empleo de los estándares de α -tocoferol y acetato de tocoferol como en la manipulación y tratamiento de las muestras de aceite.

Los tocoferoles son sustancias viscosas de color amarillo, de manera que se ha tenido la precaución de que los estándares comerciales no se oscurecieran con la exposición al oxígeno, debido a que la oxidación de la vitamina E da lugar a la formación de quinonas sin actividad biológica. A lo largo de todo el proceso, tanto las muestras como las soluciones patrón se protegieron de la luz y se gasearon con N_2 .

Los tocoferoles son inestables en presencia de oxígeno, esta oxidación es catalizada por la exposición a la luz, medio ácido y alcalino (sobre todo a temperaturas próximas a los $100^\circ C$) y por la presencia de iones metálicos como férrico y cúprico. Por eso, se añadió a la muestra ácido ascórbico (Hurtado *et al.*, 1997; Paulo *et al.*, 1999; Gimeno *et al.*, 2000; Albalá-Escrivá *et al.*, 2002; Deiana *et al.*, 2002), por su papel protector frente a la oxidación de la vitamina, ya que las formas reducidas de estos iones no tienen efecto sobre la estabilidad de los tocoferoles.

Según Talwar *et al.* (1998) los tocoferoles de los extractos con ascórbico no se degradan cuando se almacenan durante 16 horas a temperatura ambiente ó 24 horas a 10°C. Con la misma finalidad se empleó la disolución de pirogalol, que protege de la oxidación a la vitamina E durante la saponificación, sin interferir en el proceso cromatográfico. Aunque en algunos trabajos añaden además BHT a la muestra como antioxidante (Albalá-Hurtado *et al.*, 1997; Deiana *et al.*, 2002; Burri *et al.*, 2003), en nuestro estudio no se ha empleado porque coeluye con la vitamina E. Además, se han utilizado estándares de pureza elevada (98%), para evitar la presencia de trazas metálicas.

La saponificación tiene como finalidad la hidrólisis de los enlaces éster y la liberación de los ácidos grasos, de manera que muchas sustancias liposolubles que podrían interferir se descomponen y se separan de la fracción que contiene el a-tocoferol. La mayoría de los autores recomiendan la saponificación en solución etanólica (Albalá-Hurtado *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 1995; Gimeno *et al.*, 2000; Deiana *et al.*, 2002; Escrivá *et al.*, 2002), aunque algunos la realizan en metanol (Botsoglou *et al.*, 1998; Directiva 2000/45/CEE; Sánchez-Machado *et al.*, 2002), por la disminución de la temperatura de saponificación (punto ebullición metanol 65°C, punto ebullición etanol 78°C) y por tanto, menor riesgo de descomposición.

En la mayoría de los trabajos la temperatura de saponificación empleada es de 70°C (Romera, 1994; Gimeno *et al.*, 2000; Sánchez-Machado *et al.*, 2002), aunque también se ha propuesto realizarla durante toda la noche a temperatura ambiente (Albalá-Hurtado *et al.*, 1997) ó a 37°C (Escrivá *et al.*, 2002).

Para establecer las condiciones de saponificación óptimas de nuestro estudio se han llevado a cabo varios ensayos. Se ha podido comprobar que a bajas temperaturas (30°C) se produce un bajo índice de hidrólisis, que aumenta al incrementar la temperatura de saponificación hasta 50°C, 60°C y 70°C. En el análisis por HPLC se ha visto que con temperaturas de saponificación superiores a 70°C se producía pérdida de a-tocoferol, mientras que el estándar interno se

descomponía a partir de los 60°C, liberando el acetato y formando a-tocoferol, con lo que se sobreestimaba el contenido de vitamina E de la muestra.

Por este motivo, en nuestro estudio se ha realizado la saponificación a temperatura menor a expensas de aumentar el tiempo de saponificación. El control de la ebullición y gaseo con N₂ fueron dos factores esenciales en el mantenimiento de la estabilidad de la vitamina durante la saponificación. El estándar interno se degradaba a más de 50°C y el nivel de vitamina E se reducía un 83% y 90% en las muestras saponificadas a 50°C y 70°C respectivamente, en una placa calefactora (sin refrigerante) y expuestas al oxígeno.

La extracción de las muestras y la preparación de las disoluciones estándar ha estado condicionada por la solubilidad de estos compuestos, oleosos e insolubles en agua pero solubles en alcoholes y otros solventes orgánicos. Las formas esterificadas, como el acetato, son menos solubles en metanol que la forma libre.

El disolvente de extracción elegido ha sido una mezcla de éter dietílico y de petróleo a partes iguales, que presenta el inconveniente de la volatilidad y solubilidad de diversas sustancias del saponificable, aunque en menor grado que cuando la extracción se realiza sólo con éter dietílico (Escrivá *et al.*, 2002). Otros autores emplean hexano y afirman que se obtienen mayores porcentajes de recuperación (Albalá-Hurtado *et al.*, 1997; Su *et al.*, 1998; Psomiadou *et al.*, 2000; Deiana *et al.*, 2002; Sánchez-Machado *et al.*, 2002; Burri *et al.*, 2003), aunque la extracción depende de la concentración de etanol en el medio de saponificación y disminuye a mayores porcentajes del alcohol. Las mezclas de hexano con acetato de etilo (Gimeno *et al.*, 2000) producen formación de emulsiones con mayor facilidad que en el caso de la mezcla de éteres.

Después de la extracción, los extractos, neutralizados con ácido acético, se lavaron sucesivas veces con elevados volúmenes de agua bidestilada, para eliminar el exceso de álcalis e impedir la degradación de la vitamina E.

Los tocoferoles son moléculas minoritarias en la fracción grasa, por lo que fue necesario concentrar los extractos con corriente de gas inerte previo a la inyección en el HPLC. Algunos autores encuentran pérdidas de α -tocoferol durante la evaporación de la fase extrayente (Talwar *et al.*, 1998; Gimeno *et al.*, 2000), de forma proporcional al tiempo de duración del proceso.

Para evitar las pérdidas, el análisis por HPLC se realizó inmediatamente después de la extracción de las muestras, y hasta el momento de su inyección los extractos se mantuvieron refrigerados. Su *et al.* (1998) estudiaron que a -20°C los tocoferoles se degradaban más que cuando los extractos se almacenaban a 4°C , aunque su destrucción tampoco fue significativa a temperatura ambiente (48 h a 20°C).

2.1.2. Contenido de α -Tocoferol e influencia de la temperatura en el aceite de oliva virgen extra variedad Picual

La vitamina E se ha identificado y cuantificado en los extractos de los aceites mediante cromatografía HPLC en fase reversa, sistema que aporta mayor estabilidad y reproducción de los tiempos de retención. La fase móvil empleada, previamente desgasificada con gas inerte y con flujo isocrático, coincide con la mayoría de los estudios publicados sobre determinación de vitaminas liposolubles (Albalá-Hurtado *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 1995; Paulo *et al.*, 1999; Directiva 2000/45/CEE; Escrivá *et al.*, 2002), donde se emplea metanol con un 2-30% de agua, debido a que el acetonitrilo da recuperaciones menores.

En otros trabajos incorporan además butanol para obtener picos más limpios en el análisis simultáneo de tocoferoles y carotenos (Gimeno *et al.*, 2000) ó mezclas hexano-acetato de etilo (Rodrigo *et al.*, 2002). Hay autores que prefieren la cromatografía gaseosa para la determinación del tocoferol (Botsoglou *et al.*, 1998), aunque quizás sea más adecuada para el análisis en otros alimentos.

Los diferentes tocoferoles muestran baja intensidad de absorción ultravioleta, con un rango de absorción máxima entre 292 y 298 nm. Algunos autores (Psomiadou *et al.*, 2000; Escrivá *et al.*, 2002) cuantifican el α -tocoferol a 294-295 nm ($E^{1\%}_{1\text{cm}}=71$) en etanol y otros, a longitudes de onda donde esta vitamina absorbe menos, como 205 nm (Sánchez-Machado *et al.*, 2002) y 300 nm (Paulo *et al.*, 1999), ya que realizan análisis simultáneos de otras vitaminas.

En nuestro estudio, la cuantificación se llevó a cabo a 291 nm, longitud de onda de máxima absorción de la vitamina en metanol. La siguiente figura muestra el espectro de absorción del estándar interno empleado.

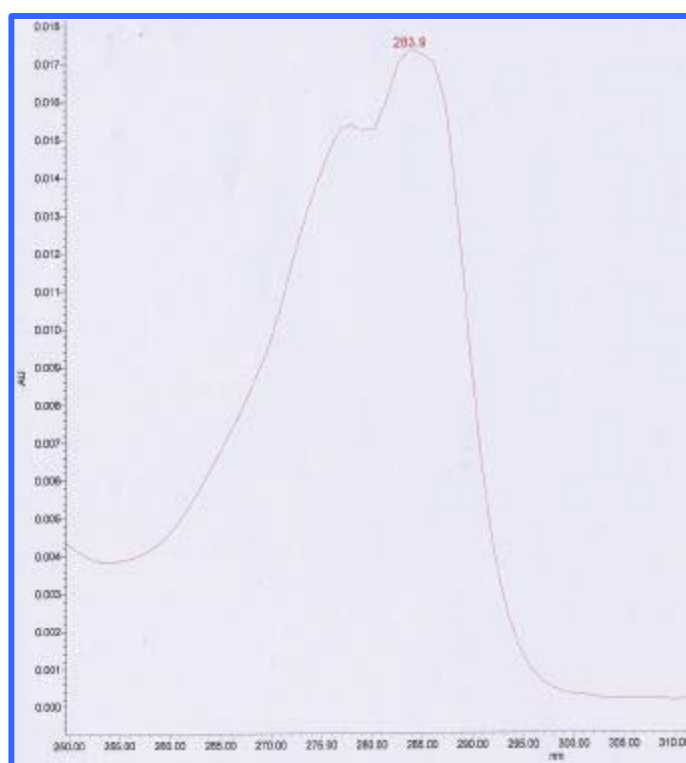


Figura 1: Espectro de absorción UV del acetato de tocoferol (estándar interno). El espectro del pico correspondiente al acetato de tocoferol presentó un máximo de absorción a 284 nm.

Los detectores electroquímicos son poco empleados en el análisis de los tocoferoles (Deiana *et al.*, 2002), en cambio, la fluorescencia natural de estas sustancias hace que se emplee este tipo de detección en muchos estudios (Directiva 2000/45/CEE; Iwase H., 2000; Psomiadou *et al.*, 2000; Rodrigo *et al.*, 2002; Sánchez-Machado *et al.*, 2002; Mateos *et al.*, 2003). La utilización de detectores fluorimétricos aporta alta sensibilidad y especificidad al análisis mediante HPLC.

Las formas libres del tocoferol muestran una elevada fluorescencia, en cambio, el acetato de α -tocoferol presenta menor fluorescencia (90%) que la forma libre. El α -tocoferol tiene una λ_{exc} a 295 nm y una λ_{em} a 330 nm (Zandomeneghi *et al.*, 2005). Estas condiciones se siguieron en nuestro estudio, para comprobar si el empleo de esta técnica era más adecuado para el análisis del α -tocoferol en el aceite de oliva, pero la separación de los picos registrados en los cromatogramas obtenidos con detector diodoarray fue mejor.

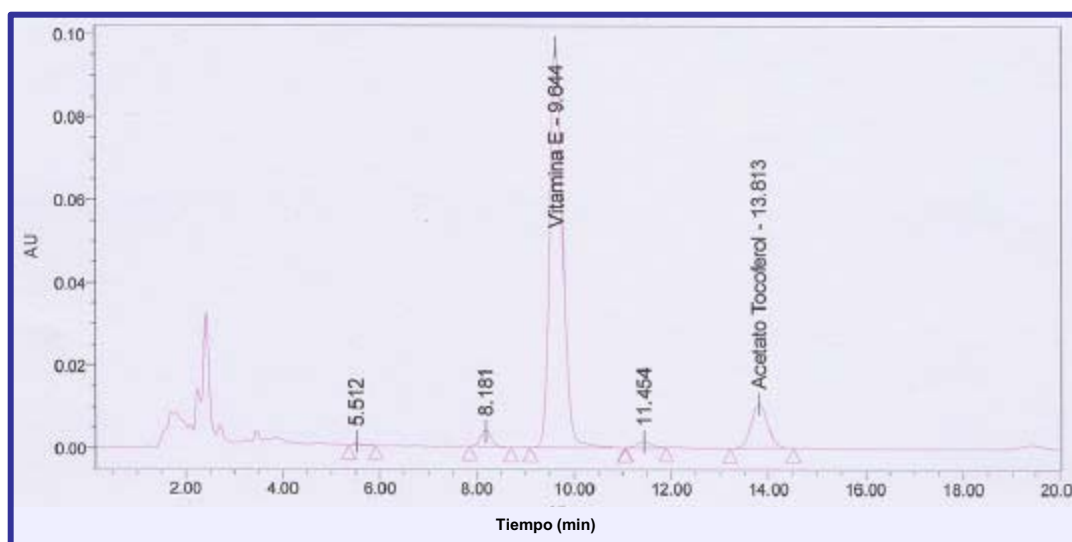


Figura 2: Cromatograma HPLC-UV de una muestra de aceite de oliva virgen extra.

El empleo de la espectrometría de masas es poco frecuente, aunque hay autores que utilizan este tipo de detección en positivo, en el análisis de tocoferoles conjuntamente con carotenos, debido al solapamiento de los picos. Los fragmentos mayoritarios son el m/z 430 y m/z 165 para el α -tocoferol y el m/z 502 para el acetato (Sánchez-Machado *et al.*, 2002).

En cuanto a la cuantificación de la vitamina, en la bibliografía se recoge el método del estándar externo y del estándar interno, debido a que el uso de curvas de calibración con estándar externo es más sencillo (Albalá-Hurtado *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 1995; Talwar *et al.*, 1998; Gimeno *et al.*, 2000; Marín *et al.*, 2001; Rodrigo *et al.*, 2002; Sánchez-Machado *et al.*, 2002), mientras que el empleo de un estándar interno resulta más exacto.

En nuestro estudio se ha empleado el acetato de tocoferol como estándar interno (Su *et al.*, 1998; Su *et al.*, 1999; Directiva 2000/45/CEE; Aust *et al.*, 2001), con un tiempo de elución cuatro minutos después de la vitamina, de manera que los ciclos cromatográficos fueron bastante cortos.

Como inconveniente, se presenta la inestabilidad frente a los álcalis y las altas temperaturas, problema que se solventa considerablemente trabajando en atmósfera inerte. También se han propuesto como estándares internos el análogo hidrófilo del α -tocoferol, el trolox (Lodge *et al.*, 2000), el nicotinato de tocoferol y el acetato de retinol (Paulo *et al.*, 1999; Escrivá *et al.*, 2002), éste último para cuantificarla conjuntamente con vitamina A, C y β -caroteno.

A continuación se muestra el contenido de α -tocoferol, principal antioxidante lipofílico, de las muestras de aceite correspondientes a la última campaña de nuestro estudio.

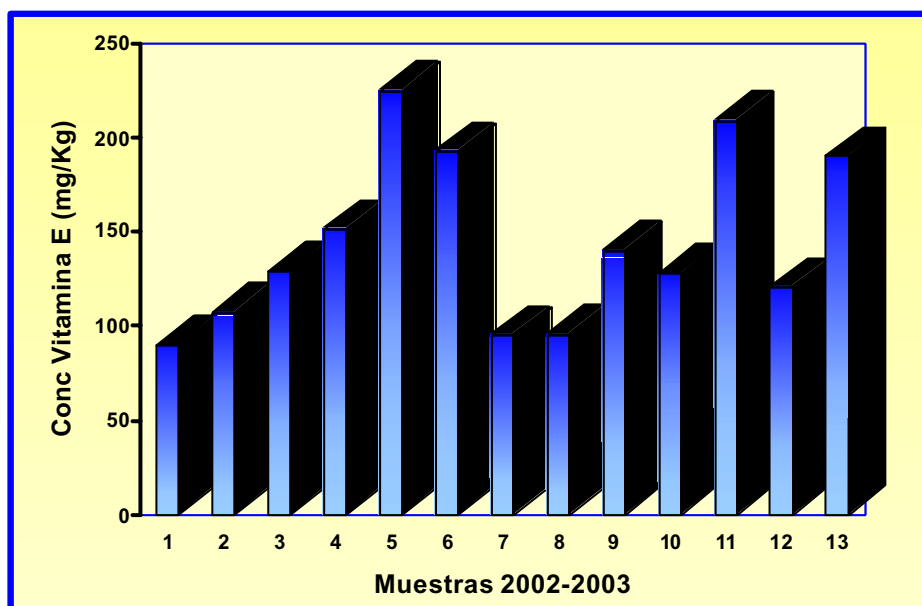


Figura 3: Concentración de a-tocoferol en las muestras de aceite de oliva virgen del 2002-2003. La concentración media de vitamina E ha sido 143.93 ± 45.92 mg/Kg aceite ($n=13$).

Los niveles de vitamina E en los aceites de oliva virgen extra estudiados oscilaron entre 89.67 y 224.58 mg/Kg. Estos niveles están de acuerdo con los valores recogidos en bibliografía para el aceite de oliva virgen, que pueden variar desde 50 hasta 200 mg/Kg (Mataix, 2001).

En aceites de oliva vírgenes españoles, se han cuantificado niveles similares a los encontrados por nosotros, 86.6 mg/kg (Gimeno *et al.*, 2000), 121 mg/Kg (Ruiz *et al.*, 1995), 103-283 mg/Kg (Cert *et al.*, 1996), 55-234 mg/Kg (Salvador *et al.*, 1998). Sin embargo, las concentraciones medidas por García *et al.* (2002) en aceites de oliva Picual de la provincia de Jaén fueron superiores, 211-247.6 mg/Kg (campaña 1999-2000) y 310.9-339 mg/Kg (2000-2001). En este sentido podemos destacar que dos de las muestras estudiadas por nosotros, también de la variedad Picual, superaron los 200 mg/Kg.

Las concentraciones de α -tocoferol también oscilan mucho en los aceites de oliva italianos. Los resultados obtenidos en los estudios de Conte *et al.*, 1993 (55-264 mg/Kg), Fedeli *et al.*, 1993 (97-315 mg/Kg), Esti *et al.*, 1996 (100-320 mg/Kg), Ranalli *et al.*, 1996 (147-187 mg/Kg) y Manzi *et al.*, 1998 (160-253 mg/Kg) son comparables al contenido en aceites españoles, con medias superiores a los 250 mg/Kg en algunos aceites. Según Psomiadou *et al* (2000), en aceites de oliva vírgenes griegos, los niveles son superiores a los aceites españoles e italianos, con concentraciones que oscilan entre 98-370 mg/Kg.

En este trabajo se ha realizado también el análisis de la concentración de vitamina E en tres muestras de aceite de oliva, en el laboratorio Agroalimentario de Atarfe (Granada), con la finalidad de realizar estudios interlaboratorio y comprobar la metodología utilizada por nosotros. En este sentido, no se han encontrado diferencias significativas entre los resultados obtenidos por nosotros frente a los de este laboratorio, con cantidades de α -tocoferol de 121.702 mg/Kg, 136.028 mg/Kg y 88.835 mg/Kg, para las muestras 2, 5 y 13 respectivamente. Se cuantificaron además el β -tocoferol (2.52 ± 0.07 mg/Kg), δ -tocoferol (17.21 ± 1.35 mg/Kg) y γ -tocoferol, presente en valores traza.

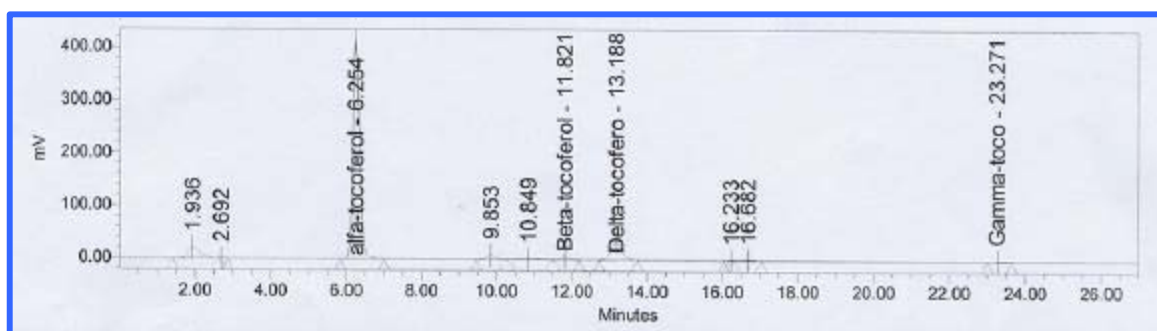


Figura 4: Cromatograma HPLC-UV de una muestra de aceite de oliva virgen extra. Los tocoferoles eluyen en el orden α -tocoferol, β -tocoferol, δ -tocoferol, γ -tocoferol.

El orden de elución no coincide con el de otros autores, como Rodrigo *et al.*, 2002 (a-tocoferol, γ -tocoferol, d-tocoferol) ó Su *et al.*, 1998 y Talwar *et al.*, 1998 (γ -tocoferol, a-tocoferol).

En cuanto al tratamiento tecnológico, éste es un factor muy importante en el mantenimiento de la estabilidad del aceite. Así, hemos podido comprobar en las muestras de aceite de una de las empresas, que conforme se va incrementando la temperatura de obtención del aceite para mejorar el rendimiento, la composición en a-tocoferol va disminuyendo, y puede llegar incluso a degradarse totalmente. Así, el contenido en vitamina E ha disminuido desde 192.57 mg/Kg, cuando el aceite se obtiene en frío (9°C), hasta 52 mg/Kg, al aumentar la temperatura del proceso por encima de los 33°C.

En cambio, el contenido de vitamina del mismo aceite obtenido a 21.5°C disminuyó con respecto al aceite molturado a 9°C, aunque no de manera significativa. Psomiadou *et al.* (2000) estudiaron la concentración de vitamina E en aceites griegos elaborados por el sistema tradicional, de dos y tres fases, obtenidos a 30°C ó 45°C y han indicado que las condiciones de molturación no influyeron en el nivel de vitamina E.

En este sentido, otros autores han estudiado la estabilidad del aceite de oliva virgen al aumentar la temperatura y tiempo de exposición a determinados sistemas de oxidación, en función del contenido en vitamina E. En estudios *in vitro* sobre la formación de conjugados dienos (Deiana *et al.*, 2002) se vió que por debajo de 60-70 mg/Kg de vitamina E en el aceite los niveles de hidroperóxidos aumentaban. Mateos *et al.* (2003) afirman que la vitamina E mostró mayor actividad que el tirosol en estudios de estabilidad al Rancimat.

Con el almacenamiento también disminuye el contenido en a-tocoferol del aceite de oliva (García *et al.*, 2002) aunque menos del 20% después de 2 años. La luz y exposición al oxígeno son factores más relevantes en la degradación de la vitamina que la temperatura (Psomiadou *et al.*, 2000).

En la bibliografía se recogen varios estudios sobre los efectos antioxidantes de la vitamina E en humanos (Jessup *et al.*, 2003). Gimeno *et al.*, (2002b) comprobaron que la oxidación de las LDL era menor al aumentar los niveles plasmáticos de vitamina E, tras una ingesta diaria de aceite de oliva durante una semana.

Resultados similares obtuvieron Upritchard *et al.* (2003) tras una suplementación diaria con 40 mg de esta vitamina y Quilez *et al.* (2003) al enriquecer productos de panadería. Los estudios realizados con animales sobre la oxidación del colesterol (Maraschiello *et al.*, 1998) y estrés oxidativo (Ibrahim *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 2004) corroboran los datos obtenidos en el hombre.

Podemos concluir que los niveles de a-tocoferol son importantes en la estabilidad del aceite de oliva virgen extra y además ofrecen protección frente a la peroxidación tanto *in vitro* como *in vivo* (Baldioli *et al.*, 1996; Quiles *et al.*, 1999).

2.2. Estudio de la composición polifenólica del aceite de oliva virgen extra a lo largo varias campañas

2.2.1. Polifenoles totales del aceite de oliva virgen extra variedad Picual

Los análisis realizados tienen como finalidad caracterizar la fracción fenólica de estos aceites, mediante identificación y cuantificación de los polifenoles presentes. Para cuantificar los polifenoles se emplean generalmente métodos espectrofotométricos y los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico, ácido cafeico, ácido tánico ó tirosol. Entre los dos reactivos empleados para la determinación de fenoles en la fracción polar del aceite de oliva, Folin-Ciocalteu y Folin-Denis (Gutfinger *et al.*, 1981), se ha empleado el primero, al producirse soluciones menos turbias y reducirse el tiempo de reacción.

Los métodos colorimétricos son métodos simples, pero no específicos para los fenoles, de manera que a veces se puede tender a sobreestimar las cantidades de polifenoles presentes. Cualquier sustancia capaz de reducir el complejo fosfotúngstico-fosfomolibdénico podría interferir (Obied *et al.*, 2005). Además, este método responde de manera diferente a los distintos fenoles (Escarpa *et al.*, 2001), por lo que los datos de esta medida del conjunto de polifenoles no deben considerarse como resultados absolutos.

Los métodos enzimáticos también son muy adecuados para medir la cantidad total de fenoles y se caracterizan porque son más sencillos y rápidos que el Folin-Ciocalteu y que las técnicas cromatográficas. Además, su especificidad y sensibilidad es mayor que la del método colorimétrico. Sin embargo, parece que

sobreestiman los niveles de polifenoles totales del aceite, comparados con el método de Folin-Ciocalteu.

El empleo de la técnica de HPLC para determinar los polifenoles totales se basa en la suma de los picos de manera individual, usando curvas de calibración ó factores de respuesta, estándares comerciales y distintas longitudes de onda. Las limitaciones de esta técnica para cuantificar polifenoles totales se deben a la complejidad de los cromatogramas de HPLC y al elevado solapamiento de los picos. No obstante, el empleo de HPLC con espectrometría de masas, sobre todo si es HPLC-MS-MS, sería la mejor alternativa para la cuantificación de polifenoles totales en el aceite de oliva (Wolfender *et al.*, 2003).

En este estudio se ha empleado el método de Folin-Ciocalteu por ser el método de cuantificación más común y más encontrado en bibliografía para polifenoles totales en el aceite. Además, se sabe que la estabilidad frente a la oxidación es directamente proporcional al contenido en polifenoles totales (Gutfinger *et al.*, 1981), como se estima con el método colorimétrico. Por tanto, la actividad antioxidante es proporcional al contenido fenólico.

De manera que los resultados obtenidos con este método espectrofotométrico se pueden correlacionar perfectamente con los tests enzimáticos de capacidad antioxidante realizados en el aceite por otros autores (Mosca *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2001; Lavelli *et al.*, 2005) y, en general, nos han permitido iniciar el estudio de antioxidantes de nuestras muestras de aceite, dando una idea bastante aproximada de cuales tenían un mayor contenido en compuestos fenólicos.

El aceite de oliva virgen extra contiene cantidades significativamente mayores de compuestos fenólicos que el refinado ó que el aceite de girasol (cantidades mínimas). Sin embargo, se debe destacar que también existe una variación considerable en la cantidad de polifenoles antioxidantes presentes en el virgen.

Los niveles de polifenoles totales de las muestras de aceite de oliva virgen procedentes de las campañas 2001-2003 están recogidos en la tabla 1, expresados como mg de ácido gálico/Kg.

MUESTRAS 2002-2003	CONCENTRACIÓN mg/Kg	MUESTRAS 2001-2002	CONCENTRACIÓN mg/Kg
1	1293.62	1	1067.91
2	790.76	2	1052.82
3	996.06	3	877.33
4	852.89	4	1042.83
5	958.93	5	1187.5
6	1419.58	6	1077.17
7	1178.25	7	1029.63
8	1564.88	8	1155.87
9	1895.28	9	600.2
10	1773.36	10	925.39
11	885.03	11	1785.18
12	2000.05	12	853.07
13	1929.33	13	802.15
<i>MEDIA±S.D.(n=13)</i>	<i>1349.08±444.66</i>	<i>MEDIA±S.D.(n=13)</i>	<i>1035.16±276.46</i>

Tabla 1: Polifenoles totales. Concentración de polifenoles totales (expresados como mg ácido gálico / Kg de aceite) calculados por espectrofotometría en las muestras de aceite de oliva de las dos primeras campañas del estudio realizado.

Como se puede observar, existen diferencias entre las muestras procedentes de las distintas almazaras que componen una misma denominación de origen. En general, los niveles de polifenoles están alrededor de los 1000 mg/Kg para ambas campañas, y en algunos casos superan los 1500 mg/Kg, sobre todo en las muestras del 2002-2003.

Por otra parte, se han comparado los aceites obtenidos en las diferentes campañas olivareras. No se han encontrado diferencias significativas entre los aceites obtenidos en años consecutivos, aunque las concentraciones del 2002-2003 fueron más elevadas, con valores próximos a los 2000 mg/Kg para las muestras 9,10,12 y 13.

Los polifenoles totales se cuantificaron también en aceites elaborados en las diferentes etapas de la campaña. Se compararon las muestras obtenidas en los meses de enero-febrero, a partir de aceitunas con mayor grado de maduración, con aquéllos “aceites verdes”, elaborados al inicio de la campaña, para comprobar las posibles diferencias en antioxidantes.

Para ello, se compararon muestras tomadas al final de la campaña 2001-2002 (aceites 6, 12, 13) con las mismas muestras molturadas al inicio de la campaña. De igual modo, este procedimiento se realizó al año siguiente con las muestras 2, 5 y 11. Se observó que, en ambas campañas, las concentraciones de polifenoles disminuían de forma significativa ($p < 0.01$) al aumentar el grado de la maduración de la oliva, descendiendo hasta niveles de 433.15 ± 195.93 mg/Kg y 478.24 ± 84.3 mg/Kg respectivamente.

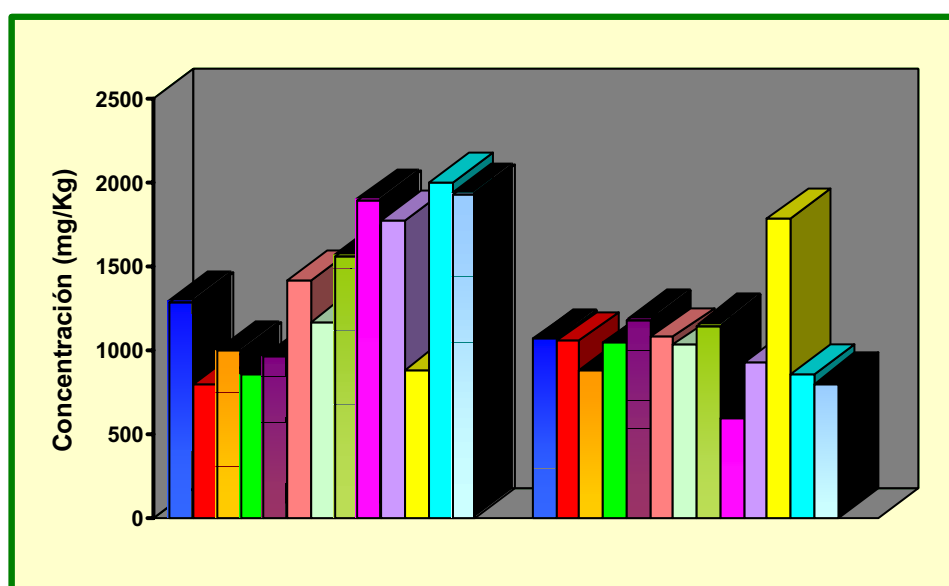


Figura 5: Polifenoles totales en los aceites de oliva virgen extra estudiados. Concentración de polifenoles totales (expresados como mg ácido gálico / Kg de aceite) calculados por espectrofotometría en las muestras de aceite de oliva de las dos primeras campañas del estudio realizado.

Los valores normales de polifenoles totales en el aceite de oliva virgen pueden variar desde 50 hasta 800 mg/Kg, debido a que el contenido depende de diversos factores, como son la variedad de aceituna, el sistema de elaboración y el grado de maduración de la aceituna.

La elevada concentración encontrada por nosotros se debe en gran medida, a la variedad de aceituna predominante en esta Denominación de Origen, como es la Picual. Entre las variedades de aceituna españolas, la Picual, es junto con la Picuda, la de mayor contenido en polifenoles, con unos niveles que suelen oscilar entre los 500 y 1000 mg/Kg (Mataix, 2001).

Existe correlación lineal entre el contenido en polifenoles y la estabilidad de los aceites. Se ha visto que la estabilidad de los aceites de la variedad española Arbequina es baja, son poco estables según la medida de oxidación del Rancimat (Beltrán *et al.*, 2000).

El aceite de oliva virgen extra obtenido de la variedad Arbequina presenta niveles de polifenoles 5-10 veces menores que los de la Picual. En la bibliografía (Humantes *et al.*, 1993; Uceda *et al.*, 1994; Tous *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 1995; Motilva *et al.*, 1998) se recogen cantidades muy variables según la zona, con valores en las D.O. de Cataluña y Aragón que oscilan entre 161-319 mg ácido cafeico/Kg aceite (Siurana), 152-443 mg/Kg (Les Garrigues), 149-443 mg/Kg (otras zonas Cataluña) y 347 mg/Kg (Aragón).

Estos autores han encontrado que los polifenoles totales de la Arbequina son inferiores en la zona de Andalucía (47-185 mg/Kg), aunque existen otros trabajos donde se obtienen mayores contenidos, en un rango amplio de 100 a 904 mg/Kg, del orden de 312 mg/Kg en seco y 156 mg/Kg en regadío (Beltrán *et al.*, 1995; Beltrán *et al.*, 2000).

Las muestras de aceitunas de las variedades italianas Frantoio, Leccino y Moraiolo, procesadas con el mismo molino de aceite ponen de manifiesto que los parámetros de calidad y vida útil del aceite están bastante influenciados por la

zona de origen y factores climáticos (Ranalli *et al.*, 1999). Esta influencia se observa en los polifenoles, que se encuentran en niveles mayores, similares a los de la variedad Picual, en los aceites procedentes de la Toscana (*var.* Frantoio, Leccino, Moraiolo, Pendolino), comparados con los de otras zonas, más al norte como la región de la Liguria, (*var.* Taggiasca, Lavagnina, Razzola, Pignola), regiones del centro de Italia, Umbría (Dolce Agogia) ó con aceites procedentes de las regiones del sur, como Puglia, Basilicata, Calabria, Sicilia (*var.* Coratina, Peranzana).

Estas diferencias en el contenido de polifenoles se han podido observar en los estudios de Ranalli *et al.* (1999), con niveles entre 150-500 mg/Kg para 3 variedades toscanas; Pinelli *et al.* (2003), con 232-449 mg/L en 10 variedades toscanas; Lavelli *et al.* (2005) que cuantifican entre 106 y 1072 mg/Kg en 4 variedades toscanas mientras que los niveles en Taggiasca y Colombaia son de 423-437 mg/Kg, similares a los 249.5-661.5 mg/L recogidos en el trabajo de Mulinacci *et al.* (2005b) para Coratina y Peranzana.

Durante la maduración del fruto tienen lugar una serie de reacciones de hidrólisis que dan lugar cambios en el perfil polifenólico. También se sabe que la concentración de polifenoles totales en aceites, determinada por métodos colorimétricos, disminuye con la maduración (Uceda *et al.*, 1997, Brenes *et al.*, 2000a). Romero *et al.* (2004) comprobaron también que el contenido total disminuía hasta 667 mg/Kg en aceites Picual a lo largo de la campaña. Como ya se ha visto previamente, en nuestro estudio se ha podido comprobar cómo el contenido total de los aceites obtenidos de aceitunas con mayor grado de maduración se reducía hasta la mitad.

En el sector de la elaboración del aceite de oliva virgen cada vez se hace más necesario el conocimiento de cómo puede afectar a determinados parámetros del aceite las diferentes formas de conducir el proceso. Existen estudios sobre la distribución de la fracción fenólica en las distintas fases de

extracción del aceite de oliva, comparando los sistemas clásicos y de centrifugación (Vekiari *et al.*, 2002).

En los aceites de oliva extraídos mediante centrifuga se ha observado una gran reducción en el contenido de polifenoles, hasta el 50% comparado con el sistema clásico, independientemente de la variedad de aceituna.

En la elaboración del aceite tienen lugar pérdidas de antioxidantes debido al calentamiento y a la adición de agua, se produce mayor oxidación y arrastre de los polifenoles más solubles con las aguas de vegetación (Visioli *et al.*, 1999b). Por eso, hay numerosos estudios sobre la influencia en la calidad de las variaciones de temperatura, tiempo de batido y el grado de dilución de la pasta de aceituna. Jiménez *et al.* (1995) observaron que cuanto mayor era la temperatura y cantidad de agua, el aceite obtenido era de menor estabilidad, contenido más bajo en polifenoles y menos amargo. Los resultados obtenidos por Angerosa *et al.* (1996) probaron que los aceites italianos extraídos sin adición de agua a la pasta tenían concentraciones más altas de polifenoles totales (376-242 mg/Kg *var.* Leccino, 397-270 mg/Kg *var.* Dritta, 359 mg/Kg *var.* Castiglione), especialmente de o-difenoles como el hidroxitirosol.

Otros autores (Ranalli *et al.*, 1996a, 1996b) han estudiado los efectos de los nuevos procesos tecnológicos, como Amirante *et al.* (2001) que han encontrado variaciones en la calidad del aceite de oliva Toscano, obtenido a distintas condiciones de temperatura en el batido y con diferente % de agua añadida en el molino.

En nuestro estudio hemos podido comprobar que el tratamiento tecnológico es un factor muy importante en el mantenimiento de la estabilidad del aceite. Así, se ha visto que conforme se va incrementando la temperatura de obtención del aceite para mejorar el rendimiento, la composición de polifenoles ha ido disminuyendo desde los 1000-1500 mg/Kg estudiados con anterioridad, hasta niveles de 300 mg/Kg, valores adecuados para ejercer su función como antioxidantes y similares a los cuantificados por Gracia *et al.*, 2001 (346±131 mg

cafeico/Kg); Brenes *et al.*, 2000a (>400 mg cafeico/Kg aceite Picual); Mosca *et al.*, 2000 (74.45±39.85 mg cafeico/Kg) en aceites españoles y por Tsimidou *et al.*, 1996; Giacometti *et al.*, 2001 (214.67±141.48 mg cafeico/Kg); Owen *et al.*, 2000c (232±15 mg/Kg) y Bendini *et al.*, 2003 (286.7 mg gálico/Kg) en aceites italianos. A mayores temperaturas, los niveles de polifenoles fueron mínimos, inferiores a 55 mg/Kg.

Algunas muestras de la campaña 2002-2003 que presentan mayor contenido en polifenoles se obtuvieron por un proceso de molturación bajo patente, basado en el empleo de rodillos. Este molino no requiere adición de agua caliente a la pasta de aceituna y produce cantidades muy limitadas de agua de vegetación, lo que hace interesante esta innovación tecnológica. Su efectividad en relación con la composición cuali-cuantitativa de compuestos fenólicos se determinó sobre muestras de aceites de oliva vírgenes de las dos últimas campañas.

Una vez conocida la cantidad total de estos compuestos en nuestras muestras, se procedió a estudiar los aceites por el método cromatográfico, con la finalidad de realizar la determinación cuali-cuantitativa de varios compuestos fenólicos, fenoles simples y flavonoides más importantes en el aceite de oliva virgen extra de la variedad Picual.

2.2.2. Perfil polifenólico del aceite de oliva virgen extra variedad Picual

El propósito de este trabajo ha sido caracterizar la fracción fenólica (ácidos y alcoholes simples, flavonoides) de aceites de oliva virgen de la variedad Picual con Denominación de Origen.

Los extractos fenólicos de los aceites se obtuvieron siguiendo el procedimiento de Brenes *et al.* (1999, 2000a), ya que la extracción líquido-líquido es el método más usado y las cantidades de fenoles simples y flavonoides extraídos con esta técnica son similares ó algo superiores al empleo de la SPE (extracción en fase sólida). La proporción óptima de disolventes para la extracción de la fracción polar del aceite es metanol:agua 80:20 (v/v), ya que el metanol puro disolvería también algunos lípidos polares (Montedoro *et al.*, 1992a). El coste del método de extracción es menor que el del SPE, aunque esta técnica es más larga y laboriosa (Bendini *et al.*, 2003).

Análisis de los compuestos fenólicos por HPLC

La cromatografía HPLC en fase reversa (RP) ha sido señalada como el método de elección para la obtención del perfil de polifenoles del aceite de oliva. Es un procedimiento largo y laborioso, no adecuado para la determinación rutinaria de polifenoles totales, pero es muy útil para estudiar la presencia de los de mayor actividad antioxidante y relacionarlo con el estado de calidad del aceite de oliva virgen extra.

La separación RP-HPLC se realiza con fases móviles agua-metanol ó agua-acetonitrilo, con ácido acético en baja proporción (1-3%), para reducir la cola de los picos cromatográficos. Además, con agua acidificada y metanol:acetonitrilo 50:50 (v/v), Bendini *et al.* (2003) comprobaron que el método les dio los mejores

resultados de recuperación en una solución madre de 15 compuestos, y en aceite de oliva virgen obtuvieron una mayor extracción de los polifenoles totales, OHTyr, Tyr y secoiridoides. En nuestro caso, el empleo del ácido en la fase móvil A permitió obtener picos más estrechos.

Para el análisis cuantitativo de los polifenoles algunos autores prefieren emplear la técnica del estándar externo, pero en nuestro estudio se emplearon en un principio dos estándares internos (Mateos *et al.*, 2001). Se pensó emplear el ácido *p*-hidroxifenilacético para cuantificar los fenoles simples, excepto el ácido ferúlico, a 280 nm, y el ácido *o*-cumárico para cuantificar este último y las flavonas a 335 nm. El estándar de ácido *p*-hidroxifenilacético eluía a un tiempo de retención de 12.89 ± 0.13 minutos, de manera que con frecuencia solapaba con el tirosol ($t_R = 12.15 \pm 0.05$).

Otros autores usan como estándar interno ácido siríngico (Romero *et al.*, 2002) o ácido gálico (Montedoro *et al.*, 1992a; Angerosa *et al.*, 1996; Visioli *et al.*, 1998b) pero, teniendo en cuenta que el ácido *o*-cumárico presentó dos máximos de absorción ($\lambda_{\max 1} = 278$ nm, $\lambda_{\max 2} = 321$ nm), se decidió emplearlo como estándar interno para cuantificar todos los fenoles simples a 280 nm y las flavonas a 350 nm.

Además, se eligió el *o*-cumárico porque otros flavonoides comerciales (catequina, quercetina) se solapan con los picos del aceite de oliva. La detección a esta última longitud de onda incrementa la respuesta de estos compuestos y disminuye la de la mayoría de los compuestos fenólicos.

En la tabla 2 se muestran los valores medios y desviación estándar de los tiempos de retención de cada compuesto, obtenidos a partir de 10 determinaciones de las soluciones patrón.

POLIFENOLES	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)		
	MEDIA	S.D.	?(nm)
HIDROXITIRO SOL	9.85	0.051	280
TIROSOL	12.15	0.058	280
ÁC. VANÍLLICO	17.025	0.031	280
ÁC.CAFEICO	18.579	0.062	280/335
ÁC.SIRÍNGUICO	18.818	0.059	280
VAINILLINA	21.508	0.03	280
ÁC.p-CUMÁRICO	25.859	0.152	280
ÁC.FERÚLICO	28.021	0.051	280/335
ÁC.o-CUMÁRICO	31.118	0.076	280/335
APIGENINA	49.096	0.174	335
LUTEOLINA	44.906	0.956	335

Tabla 2: Tiempos de retención (media \pm S.D) y longitud de onda de máxima absorción de los compuestos fenólicos estudiados.

La tabla recoge además la longitud de onda con la que se obtuvo una mejor respuesta en la detección. La λ de máxima absorción de los polifenoles cuantificados fue próxima a 280 nm para el Tyr (275.2 nm), OHTyr (281.3nm), vainillina, ácidos sirínguico (274 nm) y o-cumárico (278 nm); 292 nm para el ácido vanílico, 230 nm para el ácido p-cumárico, 321 nm para los ácidos cafeico, ferúlico y o-cumárico, y 350 y 340 nm respectivamente para la luteolina y apigenina.

La longitud de onda fijada en el DAD coincide con los trabajos de Tisimidou *et al.* (1997), Mateos *et al.* (2001), Bouaziz *et al.* (2005) aunque en aceites italianos también se ha realizado la identificación a bajas longitudes de onda, afirmando que a 225 nm la respuesta de los polifenoles fue mayor que a 280 nm (Pirisi *et al.*, 1997).

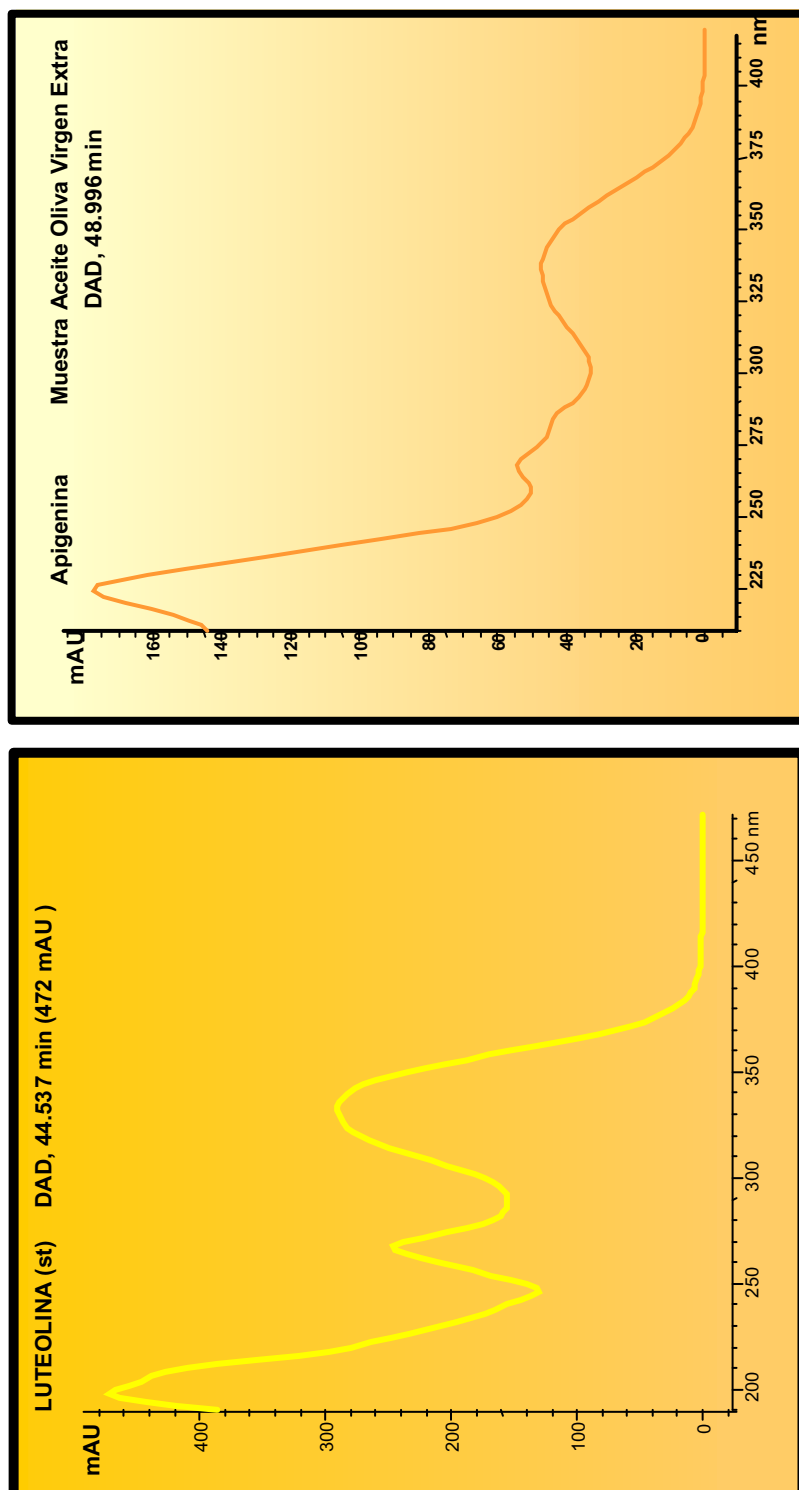


Figura 6: Espectros de absorción UV de Luteolina (estándar) y Apigenina (muestra). Los flavonoides presentaron un máx₁ entre 320 y 350 nm y un máx₂ entre 250 y 275 nm.

El tiempo total de elución es superior a los cuarenta minutos en la mayoría de los trabajos consultados. En nuestro caso, la separación por HPLC se realizó en un tiempo total de elución similar al propuesto por Brenes *et al.* (1999, 2000a), aunque la composición de las fases móviles y el gradiente de elución empleados se modificaron para optimizar la separación de los picos estudiados.

La temperatura de la columna en el desarrollo cromatográfico fue un factor importante a tener en cuenta para la mejora del procedimiento. El control de la temperatura a 37°C durante el análisis, menor a la propuesta en bibliografía, facilitó la reproducibilidad de los tiempos de retención y cuantificación de los picos.

A continuación se muestra el cromatograma de una muestra de aceite a 280 nm. Las diferencias en los perfiles cromatográficos a distintas longitudes de onda confirmaron la presencia de componentes con diverso máximo de absorción en el UV.

Los picos correspondientes a las flavonas son menores que los registrados a 335 nm, longitud de onda a la que fueron cuantificadas. La figura 7 recoge además el espectro de absorción UV del hidroxitirosol.

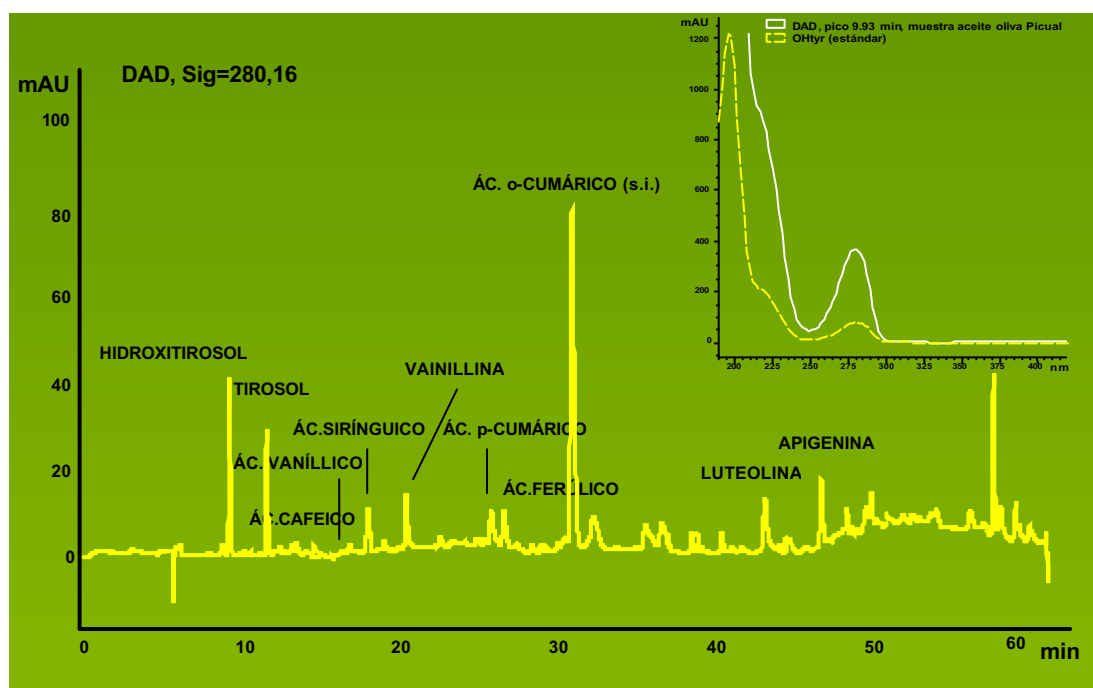


Figura 7: Cromatograma de un extracto metanólico de una muestra de aceite de oliva virgen extra Picual con ácido o-cumárico como estándar interno. Se representa la señal registrada por el detector UV-Vis (mAU) frente al tiempo de retención en la columna cromatográfica (minutos). **Espectro de absorción UV del hidroxitirosol de la muestra comparado con el del estándar.** El hidroxitirosol presenta un rango de absorción entre 200 y 300 nm, con un máximo a 281.32 nm. Este espectro obtenido en la muestra coincide con el del patrón puro de hidroxitirosol.

Los tiempos de retención de los polifenoles estudiados fueron los siguientes: OHTyr, 9.8 minutos; Tyr, 12.15 min; AVan, 17.025; ACaf, 18.579; ASir, 18.818; Van, 21.508; ApCum, 25.859; AFer, 28.021; AoCum, 31.118; Luteo, 44.906; Apig, 49.096.

Fenoles simples ya descritos en la literatura, como hidroxitirosol, tirosol, ácido vanílico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico (Montedoro *et al.*, 1993; Pirisi *et al.*, 1997; Brenes *et al.*, 1999) se encontraron en los extractos fenólicos de la mayoría de los aceites estudiados. Además, otros fenoles simples como ácido cafeico y ácido sirínquico, no identificados por otros autores (Brenes *et al.*, 1999; Mateos *et al.*, 2001) se determinaron en este estudio.

Los métodos cromatográficos para el análisis de flavonoides han demostrado la presencia de algunos de estos compuestos en hojas, frutos y aceites de oliva. Estos picos han sido también descritos en aceites italianos (Rovellini *et al.*, 1997; Pinelli *et al.*, 2003; Mulinacci *et al.* 2005a, 2005b). La luteolina parece que se origina del 7-glucósido de luteolina y la apigenina de sus glucósidos, compuestos que se han encontrado en la pulpa de la oliva (Rovellini *et al.*, 1997, Romani *et al.* 1999). Su posición en el cromatograma completo de los extractos fenólicos coincide con los estudios de Brenes *et al.* (1999), con tiempos de retención alrededor de los 50 minutos.

Los picos correspondientes al Tyr e OHTyr fueron los más representativos en el cromatograma, como se esperaba al tratarse de aceites Picual. Estos dos compuestos también fueron mayoritarios en aceites italianos (Angerosa *et al.*, 1996; Bendini *et al.*, 2003), identificados a los 10-15 minutos de programa cromatográfico.

El orden de elución de los compuestos polifenólicos estudiados coincide con el de todos los trabajos consultados en bibliografía. Los tiempos de retención de extractos de aceites Picual estudiados por Brenes *et al.* (2000) y Mateos *et al.* (2001) son similares, aunque ellos no identificaron los ácidos cafeico y sirínquico. Igual sucede con el estudio de Morelló *et al.* (2005) sobre la *var.* Arbequina, donde identifican además los derivados de la oleuropeína (25-35 min) y el grupo de los lignanos (~30 min).

Los perfiles cromatográficos de aceites italianos *var.* Moraiolo estudiados por Visioli *et al.* (1998a) a 278 nm y de aceites marroquíes *var.* Chemlali cuantificados por Bouaziz *et al.* (2005) a 280 nm, confirmaron que los polifenoles identificados por nosotros son los más estudiados en el aceite de oliva virgen extra por su importancia como antioxidantes.

En general, los perfiles cromatográficos del aceite de oliva virgen a 280 nm deberían considerarse en dos partes. En la primera parte eluyen los fenoles simples y ácidos fenólicos, compuestos estudiados en este trabajo. Los picos que

eluyen inmediatamente después se conocen en su conjunto como secoiridoides, compuestos de alto peso molecular derivados de la oleuropeína, ácido elenólico y ligustrósido. Este grupo de polifenoles ha sido estudiado en aceites españoles e italianos en el capítulo 3.

Para confirmar la identidad de los compuestos estudiados, se obtuvieron sus espectros de absorción y se compararon con los correspondientes espectros obtenidos de los patrones puros.

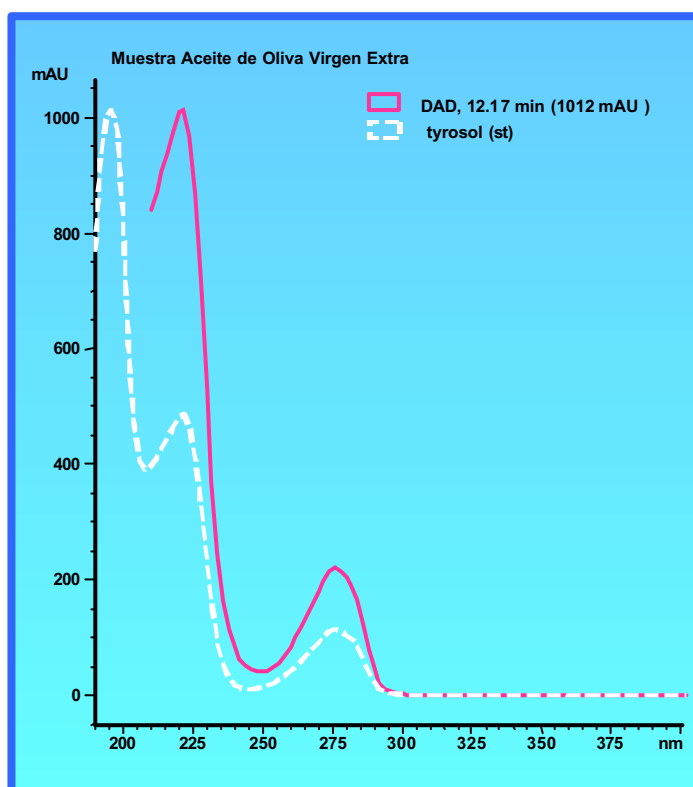


Figura 8: Espectro de absorción UV del tirosol. El hidroxitirosol, vainillina y los ácidos vanílico, siríngico presentaron espectros similares, con máximos de absorción alrededor de 270 a 285 nm, por lo que se suelen incluir como derivados del tirosol.

Estudio de la estructura de los polifenoles por MS

En general, la presencia de algunos de estos fenoles en cantidades mínimas, a veces trazas, junto a los dos componentes principales identificados, hizo difícil su identificación y cuantificación (Cortesi *et al.*, 1995a). Por eso, la caracterización realizada por HPLC-DAD se completó con análisis GC-MS. La cromatografía de gases de los componentes fenólicos requiere la preparación de derivados volátiles, principalmente de trimetilsilil éteres (TMS) y temperaturas elevadas del horno. No hay muchas aplicaciones del análisis por cromatografía de gases de los fenoles del aceite de oliva, pero en este estudio se empleó como técnica complementaria al HPLC, acoplada a la espectrometría de masas para aclarar la identidad de algunos compuestos. (Angerosa *et al.*, 1996)

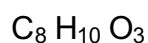
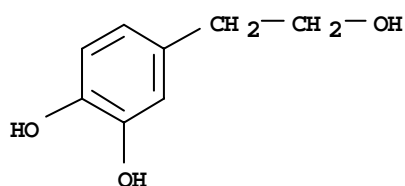
La detección por espectrometría de masas (ionización por electrospray) se realizó en modo negativo, a pesar de la menor intensidad de los picos con respecto al modo positivo, debido a que se obtienen espectros de masas más limpios. Esta técnica es seguida por numerosos autores (Romani *et al.*, 1999, 2000; Gutiérrez-Rosales *et al.*, 2003; Pinelli *et al.*, 2003; Cardoso *et al.*, 2005; Obied *et al.*, 2005; Mulinacci *et al.*, 2005b), aunque en otros trabajos consideran que el modo APCI (ionización química a presión atmosférica) es más adecuado para identificar estos compuestos en negativo (Bendini *et al.*, 2003; Bouaziz *et al.*, 2005).

Los picos se identificaron por espectrometría de masas y confirmaron la presencia de los siguientes compuestos: vainillina, tirosol, ácido dihidroxifenilacético, catecol, ácido vanílico, hidroxitirosol, ácido o-cumárico, ácido 3,4-dihidroxifenil acético, ácido homovanílico, ácido siríngico, ácido isoferúlico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico. A partir de la información obtenida al inyectar distintas disoluciones patrón y soluciones madre, el análisis de la masa permitió elucidar la estructura del compuesto correspondiente a cada pico cromatográfico y asegurar la presencia de los compuestos polifenólicos enumerados con anterioridad.

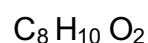
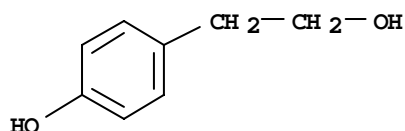
Se identificaron también otros dos polifenoles, como el ácido isoferúlico y el homovanílico ($M_w=182$), éste último de detección difícil por HPLC-UV ya que con frecuencia eluye solapado con el tirosol. El ácido dihidroxifenil acético ($M_w=152$) es el precursor en la síntesis del hidroxitirosol y el catecol, el núcleo dihidroxifenílico común a varios de los compuestos estudiados. Los compuestos fenólicos identificados han sido los siguientes:

- Derivados de la tirosina

- ? Hidroxitirosol: (3,4-Dihidroxifenil) etanol; 4-(2-Hidroxietil) - 1,2-bencenodiol. $M_w = 154$



- ? Tirosol: (4-Hidroxifenil) etanol; 4-Hidroxi - bencenetanol. $M_w = 138$



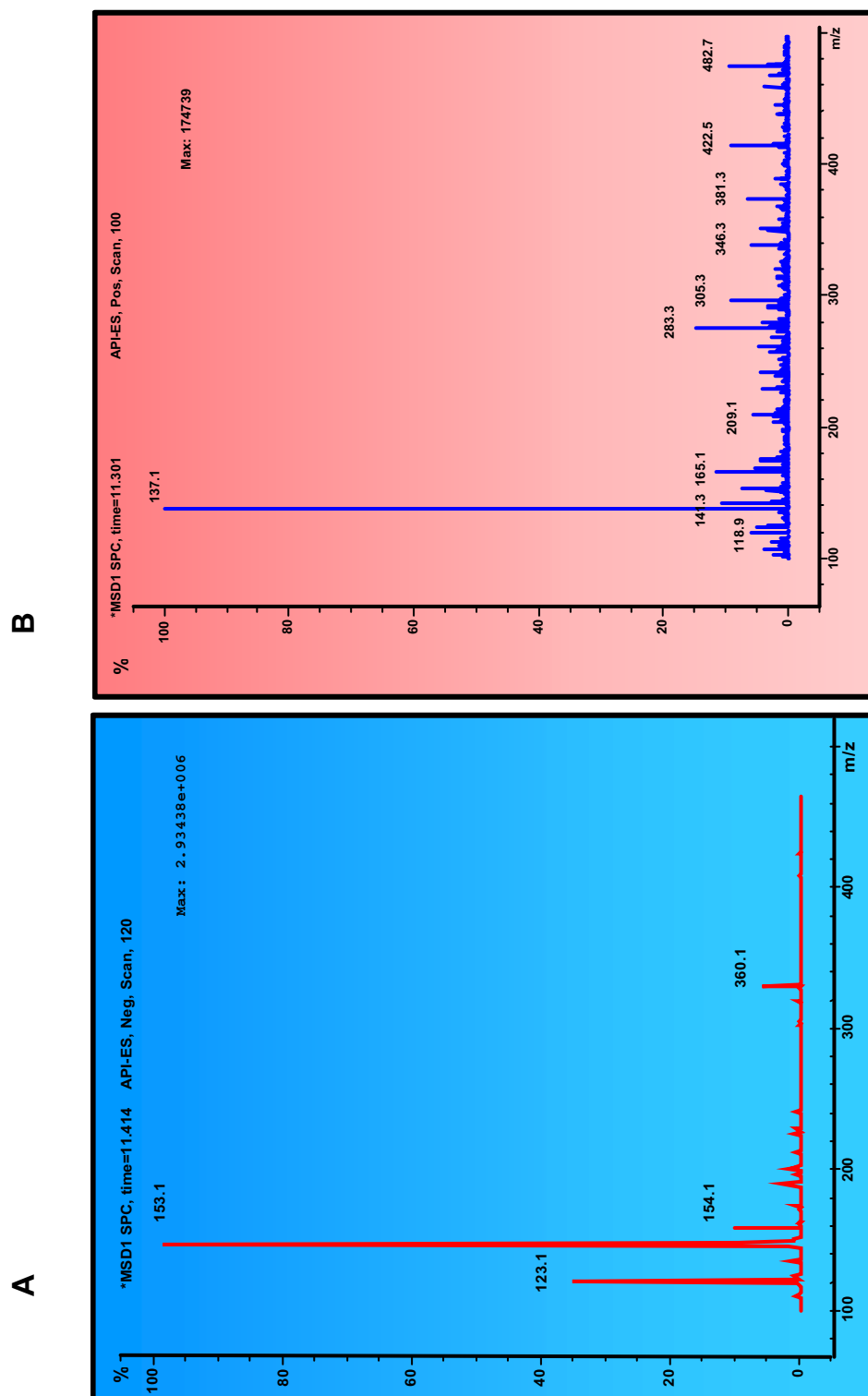
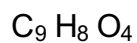
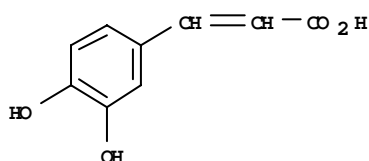


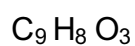
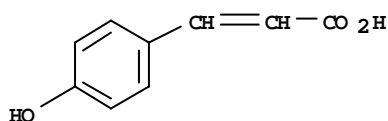
Figura 9: Espectro de masas del Hidroxitirosol (A) y Tirosol (B).

- Ácidos cinámicos

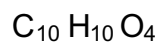
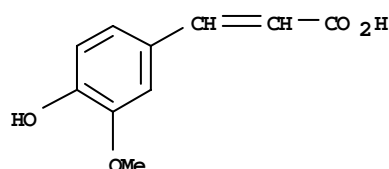
? Ácido Cafeico: Ácido 3-(3,4-Dihidroxifenil)-2-propenoico. $M_w = 180$



? Ácido p-Cumárico: Ácido 3-(4-Hidroxifenil)-2-propenoico. $M_w = 164$

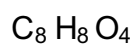
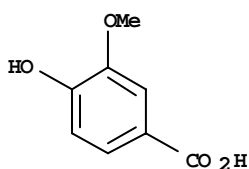


? Ácido Ferúlico: Ácido 3-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoico.
 $M_w = 194$

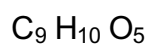
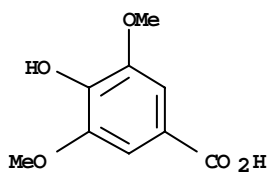


- Ácidos benzoicos

? Ácido Vanílico: Ácido 4-Hidroxi-3-metoxibenzoico. $M_w = 168$

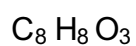
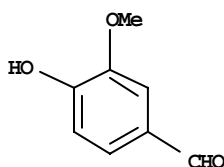


? Ácido Sirínquico: Ácido 4-Hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico. $M_w = 198$



- Aldehídos

? Vainillina: 4-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído. $M_w = 152$



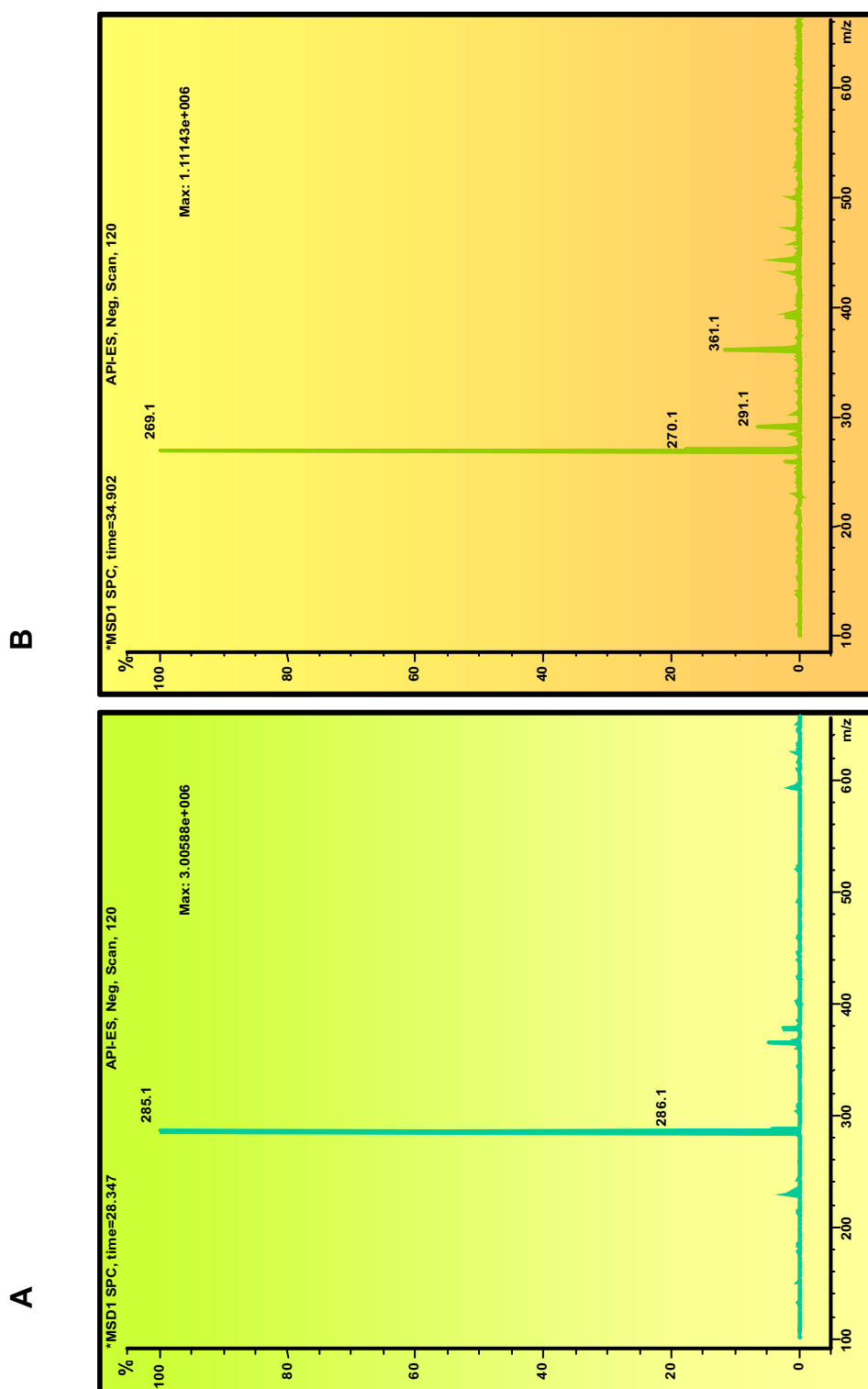
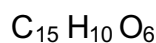
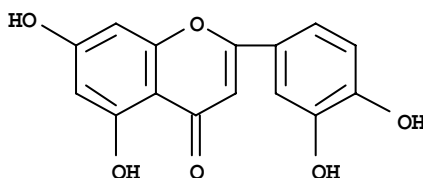


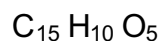
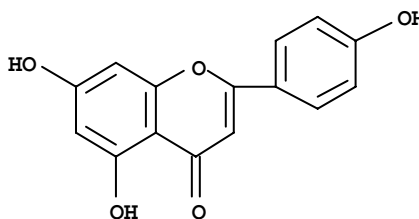
Figura 10: Espectro de masas de las agliconas de la Luteolina (A) y Apigenina (B).

- Flavonas:

- ? Luteolina: 5,7-Dihidroxi-2-(3,4-dihidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona;
3',4',5,7-Tetrahidroflavona. $M_w = 286$



- ? Apigenina: 5,7-Dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona;
4',5,7-Trihidroxiflavona. $M_w = 270$



Cuantificación de los polifenoles identificados

Se identificaron y cuantificaron 10 compuestos polifenólicos, agrupados como fenoles simples y flavonoides, en los aceites vírgenes extra *var.* Picual, de las tres campañas olivareras. Estos aceites mostraron diferencias en su composición, probablemente debido a las diferencias en el área de origen, molturación e índice de madurez de la oliva en el momento de elaboración del aceite. La tabla 3 recoge el contenido (media \pm S.D. en mg/Kg aceite) de cada compuesto polifenólico identificado en las 45 muestras analizadas mediante tres determinaciones.

Tabla 3: Compuestos fenólicos identificados en las muestras de aceite de las tres campañas estudiadas.

MUESTRAS	HIDROXITIRO SOL	TIROSOL	ÁC. VANILICO	ÁC. CAFEICO	ÁC. SIRINGUICO	VAINILLINA	ÁC. p-CUMÁRICO	ÁC. FERÚLICO	LUTEOLINA	APIGENINA
2003-2004										
1	9,082	0,000	0,195	0,000	0,000	0,518	0,255	0,082	0,803	2,288
2	9,151	0,874	0,000	0,000	0,187	0,163	0,035	0,000	1,056	1,096
3	4,127	0,728	0,000	0,000	0,301	0,177	0,118	0,020	0,744	0,495
4	3,301	0,000	0,024	0,000	0,000	0,283	0,054	0,137	3,421	0,504
5	0,252	4,168	0,000	0,000	0,155	0,226	0,152	0,052	0,350	17,838
6	0,000	3,967	0,000	0,000	0,109	0,336	0,085	0,011	0,164	2,998
7	6,137	0,000	0,153	0,000	0,083	2,208	0,318	1,005	21,283	0,580
8	5,819	0,000	0,000	0,000	0,000	1,918	0,149	0,921	15,012	0,583
9	5,154	1,031	0,000	0,000	0,368	0,215	0,136	0,026	0,859	0,644
10	17,467	10,162	0,000	0,000	0,175	0,919	0,546	0,141	1,702	0,436
11	23,688	11,084	0,000	0,000	0,237	1,247	0,740	0,191	0,476	0,482
12	3,891	21,854	0,022	0,000	0,079	0,069	0,015	0,000	0,851	0,862
13	21,925	55,653	0,000	0,000	1,566	0,953	0,626	0,109	0,851	0,284
MEDIA (n=13)	8,461	8,425	0,030	0,000	0,251	0,710	0,248	0,207	3,659	2,238
S.D.	7,766	15,583	0,065	0,000	0,411	0,703	0,240	0,341	6,606	4,755
2002-2003										
1	11,361	8,861	0,000	0,000	0,112	0,601	0,354	0,092	2,039	0,000
2	43,437	0,461	0,000	0,000	0,227	0,023	0,012	0,049	0,385	0,851
3	11,118	0,000	0,000	0,129	0,000	0,024	0,045	0,081	0,242	0,785
4	43,489	0,000	0,072	0,000	0,000	0,039	0,195	0,025	0,261	0,171
5	63,638	11,594	0,000	0,000	0,071	0,097	0,000	0,063	0,378	0,774
6	40,245	0,000	0,000	0,000	0,000	0,284	0,119	0,369	0,488	2,751
7	4,517	0,172	0,000	0,000	0,258	0,000	0,163	0,020	0,000	1,362
8	26,530	0,860	0,000	0,088	0,063	0,000	0,000	0,000	0,407	1,470
9	31,845	0,273	0,000	0,000	0,000	0,021	0,000	0,026	0,000	0,463
10	31,822	0,000	0,000	0,000	0,000	0,046	0,232	0,029	8,496	0,975
11	49,928	0,000	0,000	0,000	0,176	0,328	0,225	0,043	3,185	1,217
12	67,789	34,686	0,000	0,218	0,000	0,062	0,058	0,023	0,000	0,000
13	22,580	0,000	0,261	0,000	0,000	0,379	0,232	0,027	0,359	0,913
MEDIA (n=13)	34,674	3,557	0,046	0,027	0,063	0,156	0,126	0,060	1,015	0,775
S.D.	19,402	8,999	0,074	0,063	0,088	0,190	0,114	0,089	2,175	0,715
2001-2002										
1	7,657	0,000	0,000	0,000	0,000	0,781	0,121	0,000	19,551	0,000
2	3,829	0,000	0,000	0,000	0,000	0,391	0,060	0,000	9,775	0,000
3	11,486	0,000	0,000	0,000	0,000	1,172	0,181	0,000	14,663	0,000
4	12,550	0,583	0,000	0,000	0,929	0,217	0,812	0,096	4,850	0,912
5	0,803	0,000	0,000	0,000	0,000	0,064	0,011	0,033	0,000	0,000
6	1,205	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,006	0,016	9,813	0,000
7	0,402	0,000	0,000	0,000	0,000	0,097	0,017	0,049	0,000	0,000
8	7,657	0,000	0,000	0,000	0,000	0,781	0,121	0,000	9,496	0,228
9	12,550	0,583	0,000	0,000	0,000	0,064	0,011	0,033	0,000	0,000
10	8,395	0,362	0,000	0,000	0,929	0,217	0,812	0,096	4,850	0,912
11	6,275	0,291	0,000	0,000	0,465	0,109	0,406	0,048	4,850	0,456
12	18,825	0,874	0,000	0,000	1,394	0,326	1,219	0,144	10,055	0,912
13	12,592	0,543	0,000	0,000	0,362	0,164	0,445	0,100	0,000	0,228
MEDIA (n=13)	7,351	0,236	0,000	0,000	0,323	0,307	0,347	0,057	4,888	0,228
S.D.	5,341	0,286	0,000	0,000	0,433	0,326	0,359	0,046	5,989	0,363
MEDIA 3 CAMPAÑAS	16,829	4,073	0,026	0,009	0,212	0,391	0,240	0,108	3,187	1,080
S.D.	15,464	4,119	0,023	0,016	0,134	0,286	0,111	0,086	1,979	1,039

La Tabla 3 muestra las concentraciones de los 10 polifenoles cuantificados en las muestras de aceite de oliva de las tres campañas estudiadas, expresadas como media de tres determinaciones en mg/Kg de aceite.

En la mayoría de los aceites el pico correspondiente al hidroxitirosol fue el de mayor área. Las concentraciones oscilaron entre los 5-20 mg/Kg, sobre todo para la campaña 1ª (2001-2002) y la 3ª (2003-2004), con medias próximas a los 10 mg/Kg. Sin embargo, en la 2ª campaña el nivel medio fue muy elevado, del orden de cuatro veces mayor ($p < 0.001$ vs 1ª y 3ª).

Esto se debe a que algunos aceites de ese año presentaron cantidades muy altas de OHTyr, lo cual no siempre significa que el aceite tenga mayor calidad. Se ha asociado el aumento del OHTyr con un mayor envejecimiento del aceite (Pinelli *et al.*, 2003; Lavelli *et al.*, 2005), debido a que en la hidrólisis espontánea del mismo los compuestos secoiridoides liberan el Tyr e OHTyr que se encuentran ligados en su estructura.

En este estudio no podemos concluir si el alto contenido en OHTyr se debía a que algunos aceites estaban más envejecidos, ya que se debería tener en cuenta la concentración de secoiridoides (derivados de la oleuropeína). Además, otros autores han encontrado en aceites italianos concentraciones muy elevadas tanto de OHTyr, 61.8 mg/Kg, como de Tyr, 39.3 mg/Kg (Bendini *et al.*, 2003).

Los niveles de OHTyr encontrados por nosotros son superiores a la mayoría de los trabajos consultados en bibliografía: Brenes *et al.* (2000a) cuantifican 2.7 mg/Kg en aceites Picual; Lavelli *et al.* (2005) encuentran concentraciones inferiores a 1 mg/Kg en las variedades italianas Pendolino, Frantoio y Leccino, mientras que en Taggiasca y Colombaia los niveles son próximos a 10 mg/Kg.

En cuanto al Tyr, en algunos aceites el área fue significativa, aunque su concentración fue generalmente menor que la de hidroxitirosol. En general, las concentraciones fueron similares ó ligeramente inferiores a las de otros autores, como Brenes *et al.* (2000a), Lavelli *et al.* (2005). En cambio, la cantidad de tirosol en estas muestras fue bastante superior al contenido en aceites de otras variedades, como Arbequina ó aceites de la D.O. "Empeltre" (Brenes *et al.*, 1999).

En la figura 11 se describen las cantidades de los dos fenoles simples principales, OHTyr y Tyr, considerados entre los antioxidantes más activos de la fracción fenólica. La concentración media de Tyr de la 3ª campaña fue la más elevada, similar a la de OHTyr, aunque esta diferencia sólo fue significativa al compararla con la 1ª campaña.

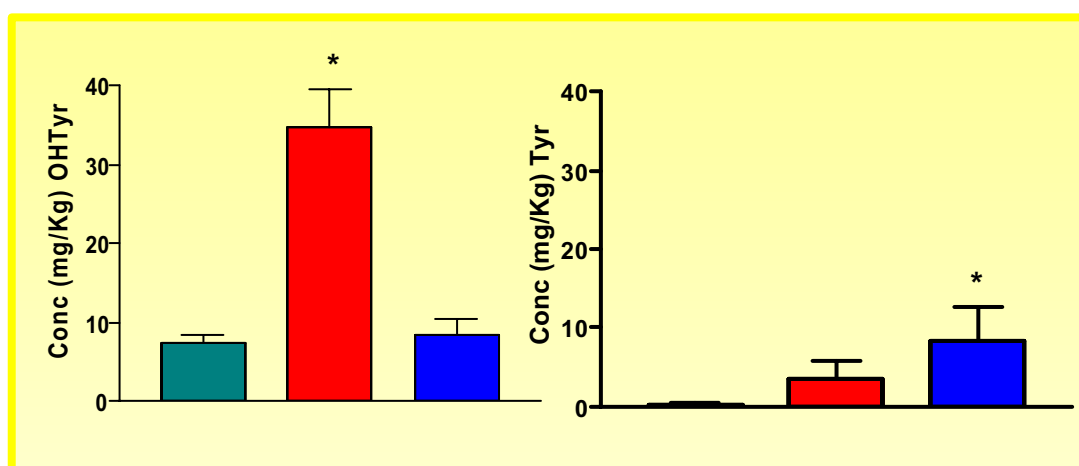


Figura 11: Concentración media de OHTyr y Tyr en las 3 campañas de aceite. El nivel de OHTyr fue significativamente mayor en la 2ª campaña ($***p < 0.001$ vs 1ª, 3ª). La cantidad media de Tyr de la 3ª campaña fue superior a la de las otras dos (n.s. vs 2ª; $p < 0.05$ vs 1ª). Campañas: 2001-2002 ■; 2002-2003 ■; 2003-2004 ■

Por orden de elución siguen los ácidos cinámicos y benzoicos, vanílicico, cafeico, siríngico, vainillina (aldehído), p-cumárico y ferúlico. Las cantidades de estos compuestos en los aceites estudiados pueden considerarse valores traza (< 0.5 mg/Kg). Angerosa *et al.* (1996) cuantifican niveles mayores, que oscilan entre los 4.3 y 31.4 mg/Kg, en las variedades italianas Leccino, Dritta y Castiglione, ya que incluyen otros compuestos como el acetato de OHTyr en el grupo de los derivados del OHTyr.

Nuestros resultados van en concordancia con otros estudios, como los de Brenes *et al.* (2000a), Bonoli *et al.* (2003) y Lavelli *et al.* (2005) que afirman que

los ácidos fenílicos están presentes en pequeñas cantidades en el aceite de oliva virgen extra recién elaborado. Las concentraciones de vanílico, vainillina y p-cumárico fueron similares a las cuantificadas en otros estudios sobre aceites de las variedades Cornicabra y Hojiblanca y superiores a las cantidades encontradas en Arbequina y Picuda (Brenes *et al.*, 1999).

En nuestro estudio, la concentración de vainillina fue la más alta de este grupo, próxima a los 0.4 mg/Kg, seguida de los ácidos p-cumárico, sirínquico y ferúlico. Estos resultados fueron 10 veces superiores a los valores medios de las tres campañas de vanílico y cafeico, que no fueron identificados en los aceites del 2001-2002 y 2003-2004. El contenido de vanílico, sirínquico y p-cumárico fue mayor en la segunda campaña ($*p < 0.05$ vs 1^a), mientras que la media para vainillina en la 3^a campaña fue la más elevada ($*p < 0.05$ vs 2^a), oscilando entre los 0.9-2.2 mg/Kg. Aún así, para todos estos compuestos hubo grandes variaciones entre los aceites de un mismo año.

La presencia en el aceite de todos estos fenoles simples es importante por sus efectos beneficiosos en la salud, cada vez más estudiados. En estudios de capacidad antioxidante realizados con los compuestos aislados, se ha visto que el poder anti-radicales libres decrece en el sentido OHTyr > Oleuropeína > ACaf > Tyr > ApCum > Van > AVan (Gordon *et al.*, 2001; Bouaziz *et al.*, 2005; Morelló *et al.*, 2005).

La presencia de un sólo grupo hidroxilo (Tyr, Apcum, AVan, Van) dota de una capacidad antioxidante limitada, mientras que la presencia del o-difenol, como sucede en el OHTyr y ACaf incrementa la habilidad de los fenoles como antioxidantes. El Apcum, Caf y Fer poseen un comportamiento mejor como scavengers, que les proporciona el ácido propenoico unido al anillo.

Luteolina y apigenina fueron caracterizados en la mayoría de los aceites Picual estudiados, pero en más del 50% de las muestras se encontraron en cantidades traza (< 0.5 mg/Kg). Las concentraciones de luteolina en la mayoría de

los aceites (media tres años: 3.19 ± 1.9 mg/Kg) fueron mayores que las de apigenina (1.08 ± 1.03 mg/Kg).

En los aceites en los que la luteolina presentaba mayores niveles, la apigenina se encontró en menor cantidad, como puede apreciarse en la figura siguiente.

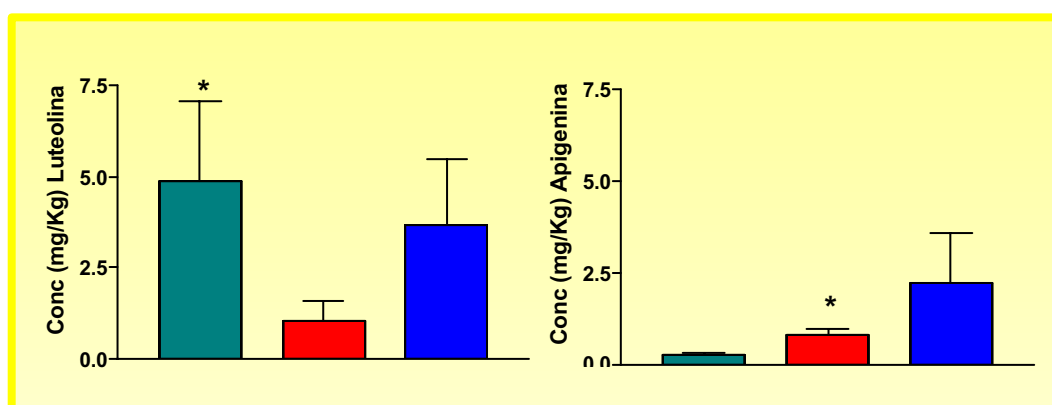


Figura 12: Concentración media de luteolina y apigenina en las 3 campañas de aceite. La luteolina fue significativamente menor en la 2ª campaña (* $p < 0.05$ vs 1ª). La cantidad media de apigenina de la 3ª campaña fue la más alta, aunque el valor de la 2ª campaña fue significativamente mayor que el de la 1ª ($p < 0.05$). Campañas: 2001-2002 ■; 2002-2003 ■; 2003-2004 ■

El contenido de ambas flavonas en estos aceites fue superior al encontrado por otros autores (Brenes *et al.*, 2000a; Mateos *et al.*, 2001).

En algunos aceites, la cantidad de luteolina fue superior a 10 mg/kg, suficiente para ser considerados de interés desde el punto de vista de la salud y la nutrición, por los numerosos efectos atribuidos a los flavonoides (Rodrigo *et al.*, 2002). El poder anti-radicales libres de la luteolina, similar al de la oleuropeína es superior al de la apigenina (Bouaziz *et al.*, 2005; Morelló *et al.*, 2005). Las diferencias como antioxidantes entre Luteo y Apig se deben a su estructura química, debido a la presencia del grupo hidroxilo en posición orto de la primera, aunque ambas pueden además actuar como quelantes, formando complejo con el ión cúprico (oxidante).

Influencia de la maduración

Con la maduración se produjeron cambios fenólicos en el aceite. La oleuropeína es el compuesto fenólico principal en el fruto de la oliva y su contenido disminuye con la maduración (Paiva-Martins *et al.*, 2005; Bouaziz *et al.*, 2005). El OHTyr, importante compuesto antioxidante originado por degradación de la oleuropeína durante la maduración del fruto, procesamiento y almacenamiento del aceite (Cinquanta *et al.*, 1997), podría ser útil para evaluar su estabilidad. De hecho, un elevado porcentaje de hidrólisis del aceite está relacionado con su envejecimiento, es decir, con un avanzado estado de oxidación. (Pinelli *et al.*, 2003).

Se encontraron dos tendencias en la evolución de los fenoles simples con la maduración. Los ácidos vanílico, siríngico, *p*-cumárico, ferúlico y vainillina, prácticamente se mantuvieron constantes, y sus concentraciones fueron <1 mg/kg. Sin embargo, un aumento de la maduración siempre provocó mayores concentraciones de tirosol e hidroxitirosol en los aceites.

Estos compuestos no se encuentran normalmente en frutos no maduros, en cambio, con la elaboración del aceite y sobre todo con la maduración de la oliva se producen algunas degradaciones químicas y enzimáticas de sus correspondientes glucósidos, y en consecuencia, se puede observar un incremento de sus contenidos en aceites obtenidos de frutos más maduros. Así sucede en algunos de los aceites elaborados en los meses de enero-febrero, como son las muestras 2, 5 y 12 del 2002-2003 y 6, 9, 12 y 13 del 2001-2002.

Generalmente, los glucósidos de los flavonoides disminuyen con la maduración (Bonoli *et al.*, 2004) y la producción de agliconas libres podría aumentar, por lo que los aceites con mayor grado de maduración tendrían mayores concentraciones. Algunos autores como Brenes *et al.* (1999), han encontrado que la concentración de luteolina aumenta con la maduración en los aceites de oliva vírgenes, pero en nuestro estudio las flavonas no mostraron ninguna tendencia relacionada con la maduración.

El perfil de polifenoles de un aceite ó de un extracto con el que se vayan a llevar a cabo estudios *in vitro* y/o *in vivo* es más importante y tiene mayor influencia en la actividad antioxidante que la cantidad total de polifenoles. En este sentido, tras la hidrólisis ácida de un extracto ó hidrólisis espontánea del aceite, el aumento de la concentración de tirosol e hidroxitirosol y la disminución de la oleuropeína y derivados podría variar el potencial antioxidante del extracto ó aceite.

Por otra parte, a la hora de evaluar la calidad de un aceite de oliva virgen extra en base a su perfil fenólico habría que tener en cuenta que los polifenoles se encuentran en una matriz oleosa, muy diferente de los medios en los que generalmente se estudia la actividad antioxidante de cada compuesto *in vitro*.

En este sentido, hay autores que hablan de la paradoja polar, según la cual, los antioxidantes más polares son más efectivos en medios menos polares (Porter *et al.*, 1993; Hopia *et al.*, 1999; Gordon *et al.* 2001). Así, aunque el hidroxitirosol y su acetato tienen una actividad anti-radicales similar, éste último tendría una capacidad antioxidante en el aceite bastante menor.

Además, no sólo se debería considerar cada compuesto de manera individual, sino que es importante estudiar el poder antioxidante de los extractos fenólicos en su conjunto, como se está haciendo en los últimos años.

Owen *et al.* (2000c) señalan que, debido a las diferencias entre los aceites de oliva vírgenes, en los estudios sobre sus posibles efectos biológicos, habría que tener en cuenta el origen y la elaboración del aceite.

En este sentido, una vez llevado a cabo el estudio de antioxidantes del aceite de oliva virgen extra, se decidió elegir una muestra para realizar los ensayos *in vivo* con animales de experimentación. La muestra nº 12 de la campaña 2002-2003 fue la seccionada, por su elevado contenido en polifenoles totales, su adecuado perfil polifenólico y contenido en vitamina E.

3. COMPARATIVE STUDY OF PHENOLIC ANTIOXIDANTS IN SPANISH AND ITALIAN CULTIVARS

MATERIALS AND METHODS

3.1. Analysis and comparison of the minor polar compound profile in Spanish and Italian monocultivar extra virgin olive oils

3.1.1. Olive oil sampling and origin areas selected

The samples analyzed in this research have been eleven Spanish and Italian extra virgin olive oils. Samples belonging to different cultivars and obtained by traditional and innovative milling processes were analyzed. The following monocultivar virgin olive oils were considered:

? Picual

Samples of oils were classified into the categories explained in Table 1 as Pa, Pb, Pc, Pd, Pa-04. Four of these five samples of olive oil were obtained in 2003 year, whereas one of them was a fresh oil. The samples Pc and Pd came from the same farm but Pd was obtained from an experimental mill. The study of this Picual cv. has been more exhaustive because is the most abundant in our area (Andalucía). Thus, Pa sample has been chosen as representative for made the main comparison with the Italian olive oils.

? **Other Spanish cultivars**

Pda, Hj, Ab were commercial olive oils from *Picuda*, *Hojiblanca* and *Arbequina* varieties. The olives were picked in their different harvest periods during the 2003 crop season.

? **Italian olive oils**

Two *Taggiasca* olive oil samples (Tg and Tg-04) from Liguria Region (north-west) and a *Seggianese* fresh oil (Tu-04) were analyzed and compared with the Spanish ones.

Oils were obtained by dual-phase system. All samples were stored at 4°C in darkness using amber glass bottles until analysis.

SAMPLES	ORIGIN AREA	MILLING DATE	TYPE OF MILL	MILLING TEMP.	TYPE OF CONSERVATION	WATER ADDITION	FILTER	OLIVE QUANTITY
Pa	D.O. Sierra de Segura. Orcera (Jaén)	1-15 November 2003	Alfa-Laval 75000Kg/h Continuous dual-phase system	18 – 22°C	Bottled under N ₂ atmosphere. Stored at 4°C in darkness	0 – 10% volume (depends on olive paste humidity)	3 days of decanting and filtered after	2000 Kg/h
Pb	D.O. Montes de Granada. Iznalloz (Granada)	15-30 November 2003	Pieralisi 70000Kg/h Continuous dual-phase system	< 28°C	Stored at 4°C in darkness	0 – 10% volume (depends on olive paste humidity)	Filter	3000 Kg/h
Pc	D.O. Montes de Granada. Deifontes (Granada)	15-30 November 2003	Pieralisi 70000Kg/h Continuous dual-phase system	< 28°C	Stored at 4°C in darkness	0 – 10% volume (depends on olive paste humidity)	Decanting Filter No	3000 Kg/h
Pd	D.O. Montes de Granada. Deifontes (Granada)	15-30 November 2003	Lacerator. 70000 Kg/h Experimental model based on rollers	< 28°C	Stored at 4°C in darkness	No	Decanting Filter No	3000 Kg/h
Pa-04	D.O. Sierra de Segura. Orcera (Jaén)	1-15 November 2004	Alfa-Laval 75000Kg/h Continuous dual-phase system	18 – 22°C	Bottled under N ₂ atmosphere. Stored at 4°C in darkness	0 – 10% volume (depends on olive paste humidity)	3 days of decanting and filtered after	2000 Kg/h

Table 1: Picual olive oil samples analyzed in our study.

3.1.2. Sample preparation

Liquid-Liquid extraction of oil samples

A volume of 20 ml of each oil sample was extracted in triplicate with 180 mL of the following solution: EtOH/H₂O 70:30 v/v; the water was acidified by formic acid (pH=2.5). Defatting with n-hexane was performed to completely remove the lipid fraction. The raw alcoholic extract of each sample was concentrated under vacuum (28°C), giving a residue that was dissolved in 2 ml of extraction solvent and then analysed by HPLC/DAD and HPLC/MS for the minor polar compounds determination (Mulinacci *et al.*, 2005b).

Acid hydrolysis of the oil extracts

This type of hydrolysis has been achieved according to previous papers (Owen *et al.*, 2000; Mulinacci *et al.*, 2005a). Samples of 200 µL, exactly measured, were drawn from their respective aqueous alcohol solutions and added with 200 µL of H₂SO₄ 0.9 N. The samples were maintained in an oven for 2 h at 80 °C, then diluted using 200µL of ethanol, filtered with a 0.45 µm regenerated cellulose filter and analyzed by HPLC/DAD.

Basic hydrolysis of the oil extracts

Samples of 300 µL, exactly measured, were drawn from the MPC extracts of all the oils and added to 300 µL of KOH 5.0 N in MeOH. The samples remained at 37 °C for 3 h and then were acidified with 140 µL of HCl 10 N and added with 160 µL of ethanol to obtain a solution to be directly analyzed by HPLC/DAD and HPLC/MS.

3.1.3. Minor polar compounds analyses

The analysis of the minor polar compounds was performed on an Agilent 1100 liquid chromatograph equipped with 1100 autosampler, column heater module, binary pump, DAD and MS detectors (Agilent Tech., Palo Alto, AC, USA). The interface was an HP 1100 MSD API-electrospray. The experimental conditions were similar to those previously reported (Romani *et al.*, 1999).

- The used columns were a Luna C18 (Phenomenex-Torrance CA) and a LiChrosorb C18 (Merk Hibar), both with 250x4,6mm (5 μ m), maintained at 26°C, and equipped with a 10x4 mm LiChrosorb RP18 pre-column of the same phase.
- The eluents were H₂O at pH 3.2 by formic acid (A) and acetonitrile (B). A four-step linear solvent gradient was used, starting from 100% H₂O up to 100% CH₃CN, at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹ during a 50 min period, for equilibration of the system after 5 min. For deacetoxyoleuropein aglycon and elenolic acid separation, a longer method was used.
- The operative conditions of the capillary voltage were 3000 and 3500V. We have worked in negative and positive ionization, with a variable fragmentor in interval between 80 - 200 for improving the fragmentation conditions of the different analyzed compounds.

All reagents used were of analytical of HPLC grade. Phenolic compounds were identified using standard substances and their UV characteristic spectra, relative t_R and mass spectra.

3.1.4. Quantitative evaluation of minor polar compounds

The quantitative evaluation of individual phenols was performed using four-point regression curves ($r^2=0.999$), through the use of authentic standards purchased from Extrasynthese (Lyon, France). Oleuropein was purchased from Extrasynthese (Geney-France), tyrosol was from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO-USA) and hydroxy-tyrosol was purchased from Cayman Chemical (SPI-BIO-Europe). The tyrosol (Tyr) and hydroxytyrosol (OH-Tyr) amounts were calculated at 280 nm using tyrosol as reference; the deacetoxyoleuropein aglycon (DAcOLag) and the other secoiridoids were calculated at 280 nm, using oleuropein as standard; elenolic acid (EA) was evaluated at 240 nm, using oleuropein as standard. The flavonoid aglycons, luteolin (Lut) and apigenin (Apig), were evaluated by measuring the absorbance at 350 nm using the corresponding luteolin 7-glucoside standard. For the samples after acid hydrolysis, the amounts of Tyr and OH-Tyr were evaluated at 280 nm with Tyr pure standard. The lignans were quantified from the alkaline hydrolysis extracts, using oleuropein regression curve at 280 nm. For all the compounds, correction of the molecular weight was applied.

3.2. Study of lignan compounds in *Olea europaea L.* fruit

3.2.1. Olive samples

Samples chosen to search the presence of pinoresinol and acetoxypinoresinol lignans were fruits known to contain considerable quantities of these substances. The two olive varieties studied were the Spanish cultivar *Arbequina* and the Italian one *Taggiasca*. Virgin olive oils obtained from these varieties presented the highest quantities of lignans among all the cultivars studied previously. The extracts of olive oil were obtained following the method of basic hydrolysis already described in chapter 3.1.2. of *Material and Methods*.

3.2.2. Extraction of lignan compounds from olive pulp

The extracts of olive pulp were obtained following the procedure described in figure 1. Olives, which were stored frozen, were dehulled and the pulp was introduced in liquid N₂. This frozen pulp was grinded, after which three extractions were achieved and all the extracts obtained were filtered.

- 1) Extraction with EtOH:H₂O⁺ 70:30 (v/v), maintaining the extract of pulp shaking more than three hours. Washings with hexane were performed, and the resulting ethanolic solution was evaporated to dryness under vacuum (28°C). This residue was dissolved in 2mL of the extracting solution and injected in HPLC/UV and HPLC/MS. The analysis of the hexane layer was also made.

- 2) Alkaline hydrolysis with KOH 2.5N in H₂O:EtOH:MeOH 1:2:3 (v/v/v). Extracting time over three hours (stirring) was followed by neutralization (HCl 37%) and dilution with MeOH:H₂O⁺ 1:2 (v/v) of the samples. After, they were concentrated and analyzed by HPLC.
- 3) Extraction of sample was performed with methanol at 60°C for 30min/each time, following Tsukamoto *et al.* (1984, 1985) methods for extraction of lignans from the bark of olive tree. Ethylic ether, dichlorine methano, buthanol and methanolic layers were evaporated for the HPLC measurement of each one. Also, the methanolic extract prior to defating was analyzed.
- 4) Olive pulp was stirred first with water (1h) and after with EtOH:H₂O 70:30 (v/v), followed by evaporation. This extract was ready for HPLC analysis.

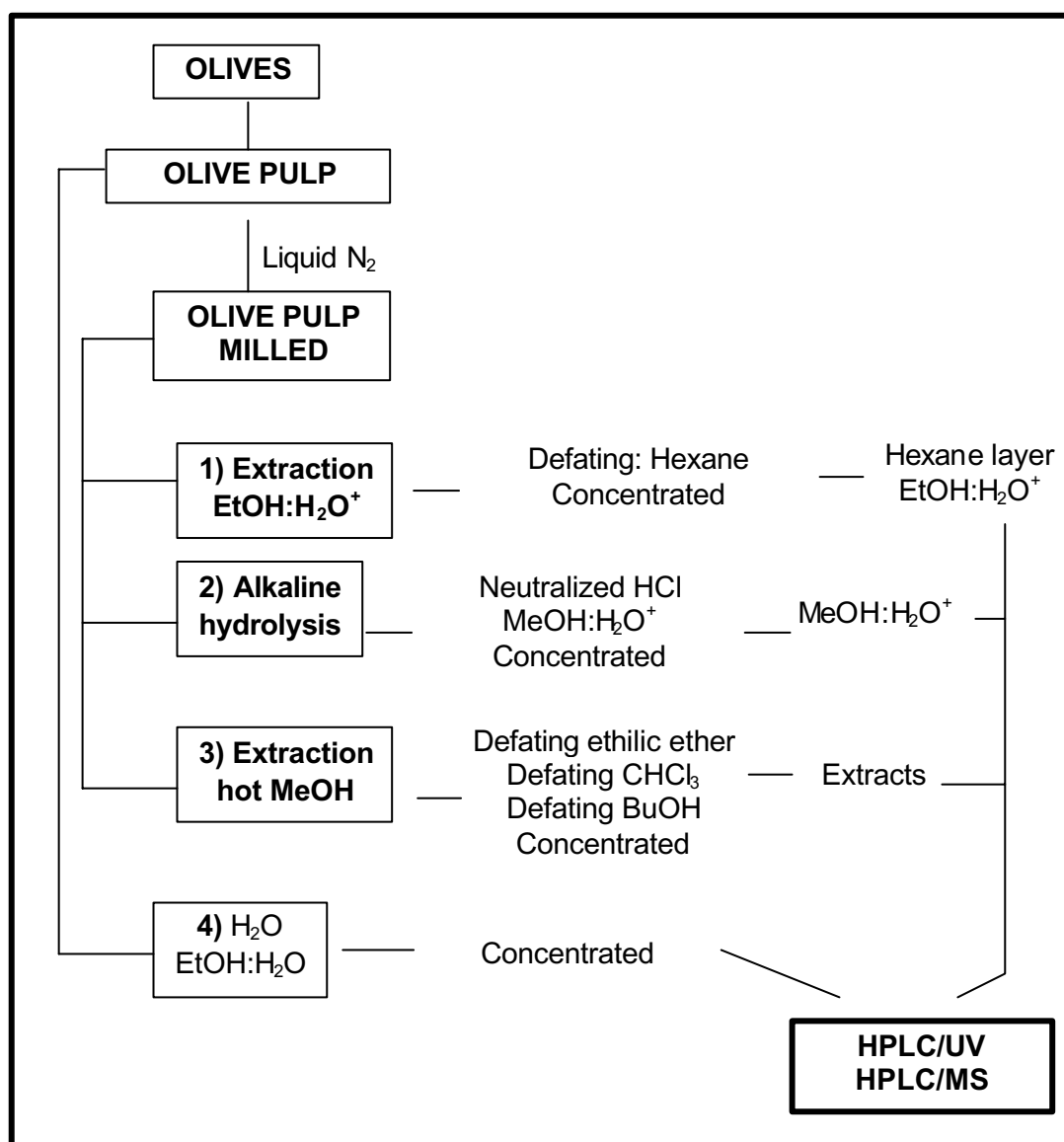


Figure 1: Procedure for the extraction of pinoresinol and acetoxypinoresinol from the pulp of Arbequina and Taggiasca olive cultivars.

3.2.3. Extraction of lignan compounds from olive stone

The analytical scheme for stone determinations was similar to that of the pulp, but was achieved in both entire and powdered stones (fig.2).

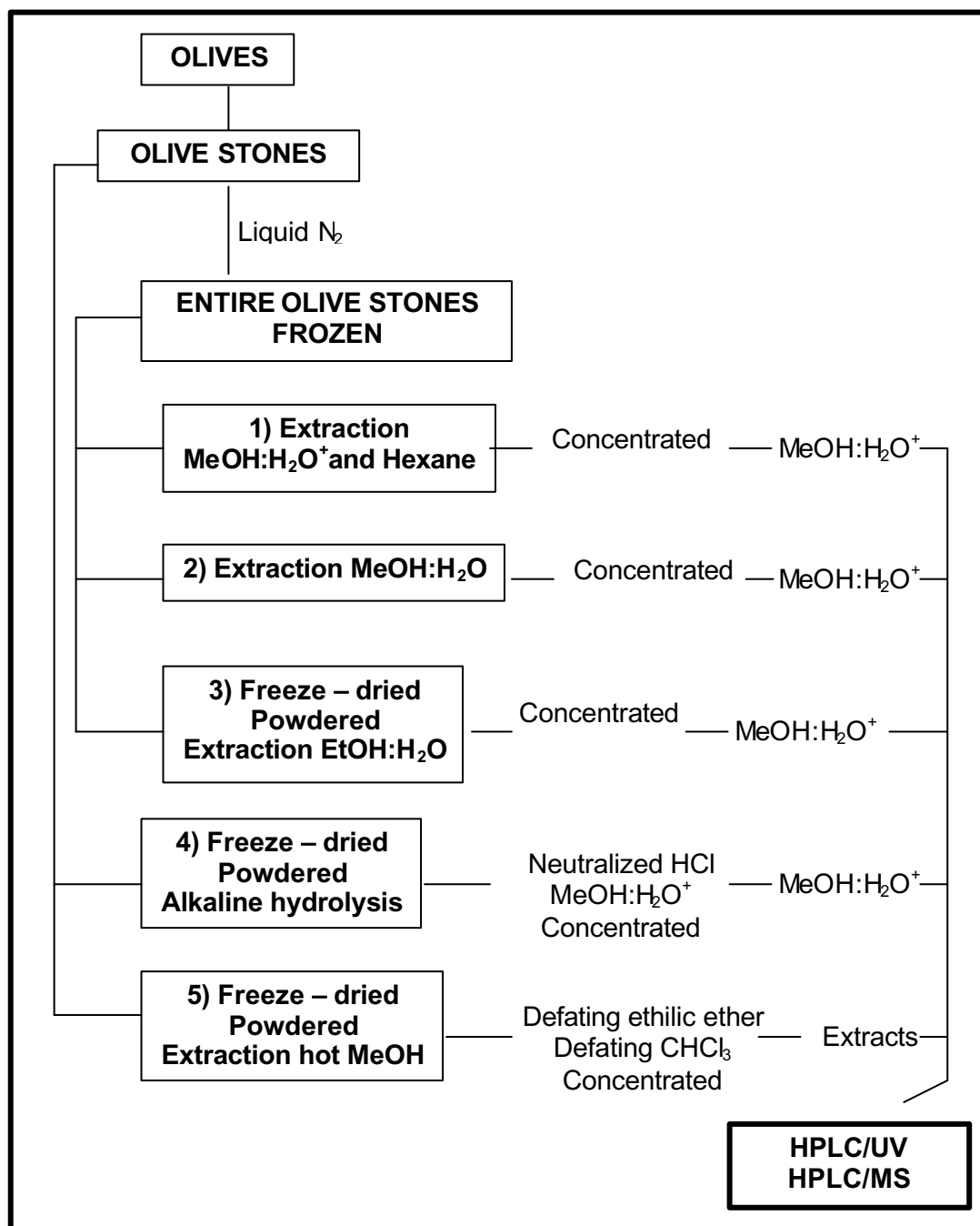


Figure 2: Procedure for the extraction of pinoresinol and acetoxypinoresinol from the stone of Arbequina and Taggiasca olive cultivars.

We developed three determinations in complete olive stones previously immersed in liquid Nitrogen:

- 1) Extraction with MeOH:H₂O⁺ 60:40 (v/v) and hexane (10min with ultrasound) and concentration of the methanolic solution by rotary evaporation (28°C).
- 2) The stones were extracted for three days with MeOH:H₂O 1:1 (v/v) and concentrated to dryness. The residue was dissolved in 2mL of the solution for the analysis.
- 3) Freeze – drying of the stones and pulverization were carried out. Then, was made the extraction of this powder with EtOH:H₂O 70:30 (v/v), under shaking conditions for four days.

Another sample of entire olive stones was freeze – dried and pulverized in small size particles, in order to perform other two extractions:

- 4) Alkaline hydrolysis of powder, as made with milled olive pulp before.
- 5) Extraction with hot methanol, with the same method followed for the pulp and explained previously.

3.2.4. HPLC - UV and HPLC - MS analysis of phenolic compounds

The chromatographic conditions for the identification, separation and semi-quantification of lignans, were those described under *Material and Methods 3.1.4.* for virgin olive oils study. The peaks of both lignans were identified in olive oil chromatograms by their t_R , standards UV spectra and mass spectra. Instead, for the research of their presence in pulp and stone we studied the UV-mass spectra in all the separated peaks of the HPLC chromatograms obtained.

RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Analysis and comparison of the minor polar compounds in Spanish and Italian monocultivar extra virgin olive oils

3.1.1. Phenolic compounds profile of Spanish and Italian extra virgin olive oils.

Extra virgin olive oil is the only vegetal oil for human consumption, which naturally contains appreciable amounts of minor polar compounds, largely responsible of oil stability. This fraction is complex and constituted by simple phenols, as Tyr and OH-Tyr, secoiridoidic derivatives, flavonoids and lignans.

During this research the identification and quantification of the composition in phenolic compounds have been made by the HPLC-UV and HPLC-MS methods described under *Materials and Methods*.

As shown by HPLC chromatograms and Table 1, 45 compounds were quantified, most of them, designated as derivative of the phenols representative for each chemical group.

We have studied the phenolic profile of four extra virgin olive oils within the same variety *Picual*, which is the most abundant in the south of Spain together with a *Picual* fresh oil (Pa-04). These oils (Pa, Pb, Pc, Pd) showed interesting differences among their composition, probably because of the different area of origin, the method of milling.

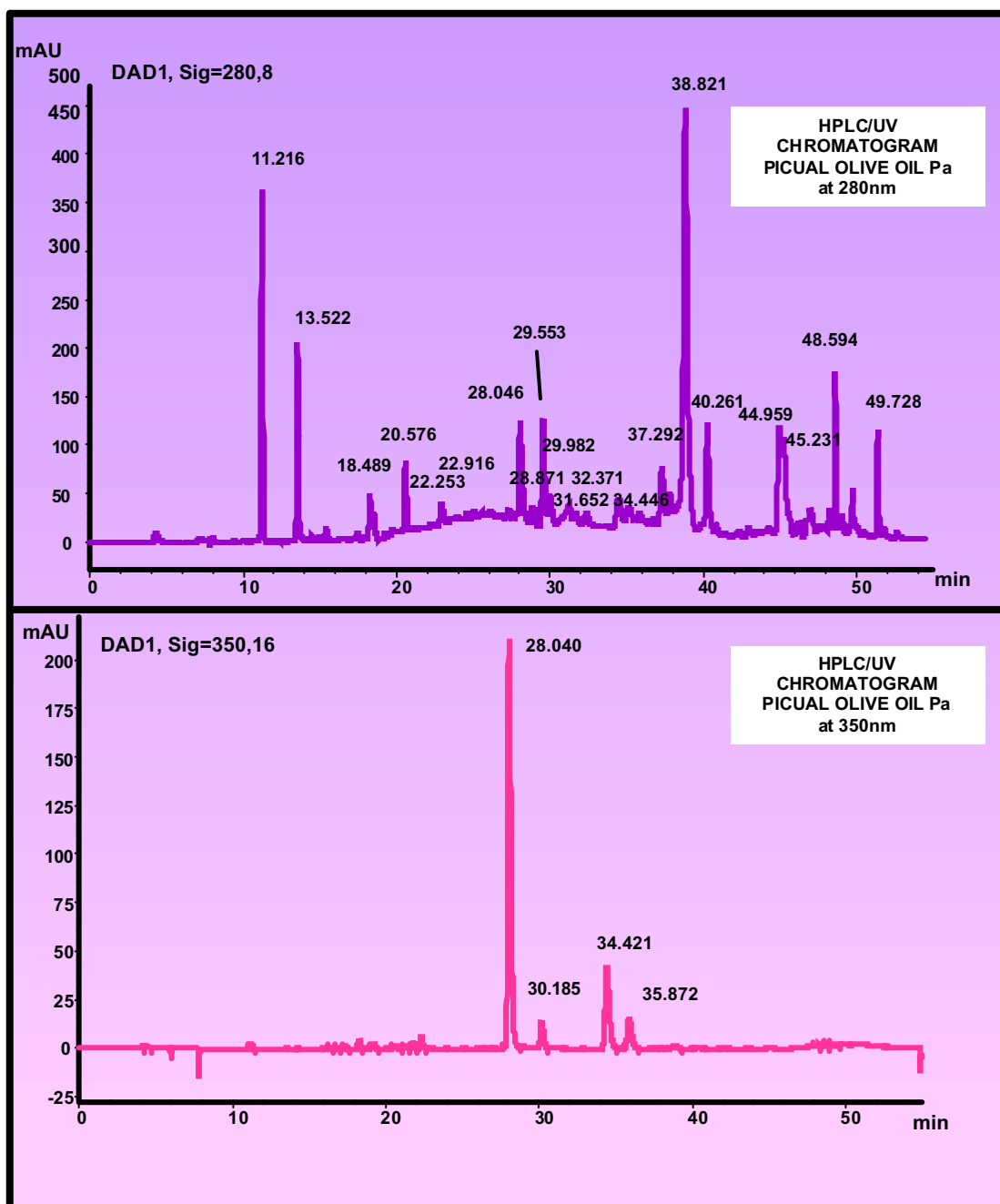


Figure 1: HPLC-DAD chromatogram obtained from an extract of the Picual olive oil Pa. Simple phenols and secoiridoids were quantified at 280 and flavonoids at 350 nm.

The contents of minor polar compounds (MPC) of other three Spanish varieties (Pda, Hj, Ab) *Picuda*, *Hojiblanca*, *Arbequina*, respectively, were quantified, in order to compare with the *Picual* ones and with the three Italian extra virgin olive oils chosen for our study and *Taggiasca*, (Tg) *Taggiasca* fresh oil (Tg-04) and *Seggianese* fresh oil (Tu-04).

The molecules were identified by comparison of their retention times and UV and MS spectra and by comparison with previous papers.

The Electro Spray Ionisation (ESI) mass spectra in negative ionisation mode show for those compounds the molecular ions and other diagnostic fragments. Some representative UV and MS spectra are shown in figures 2 and 3 (Mulinacci *et al.*, 2005a, 2005b).

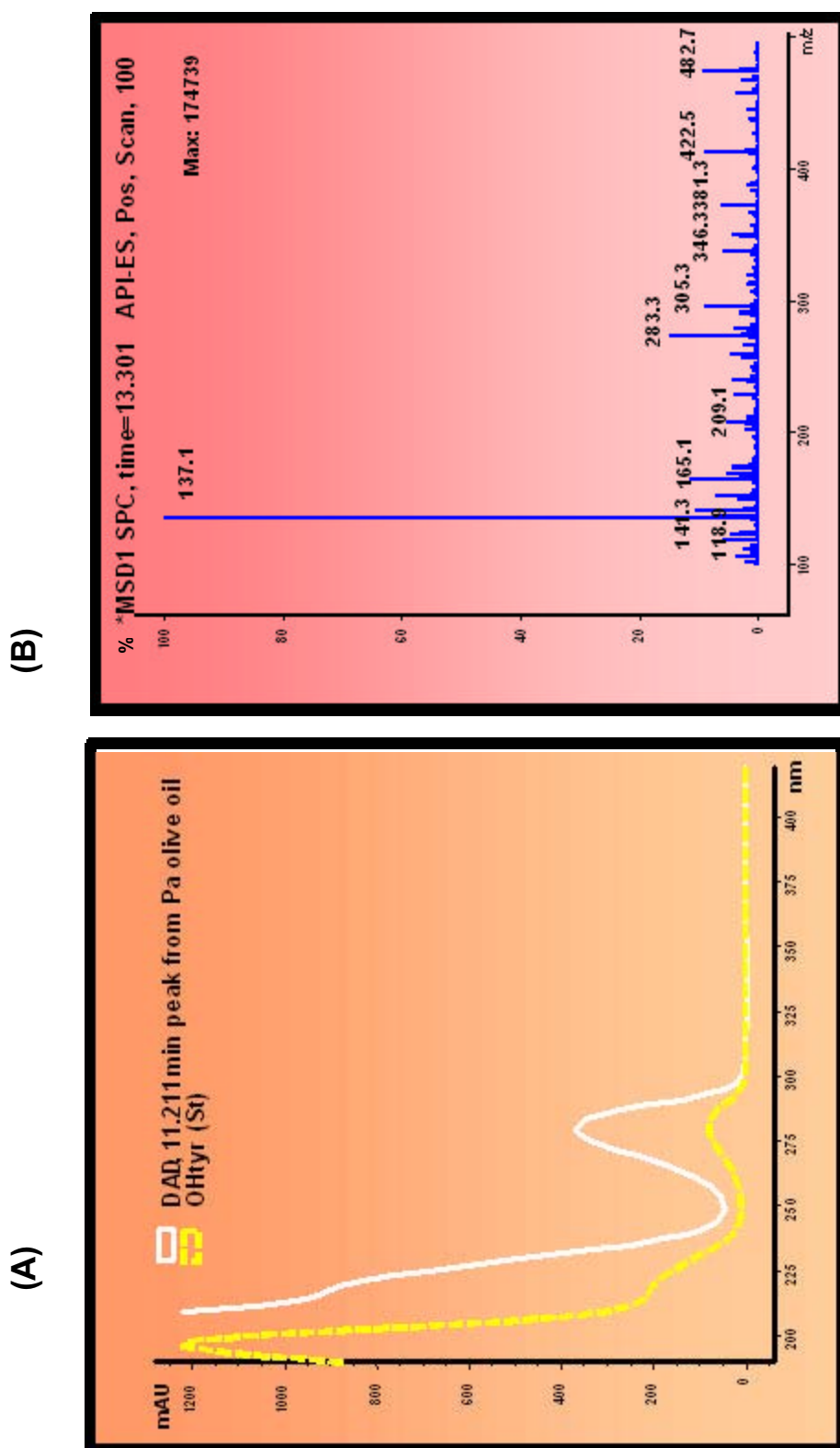


Figure 2: A) UV spectrum of peak eluting at 11.2 minutes from a EVOO extract compared to OHTyr spectrum
B) MS spectrum of peak eluting at 13.3 minutes, identified as Tyr.

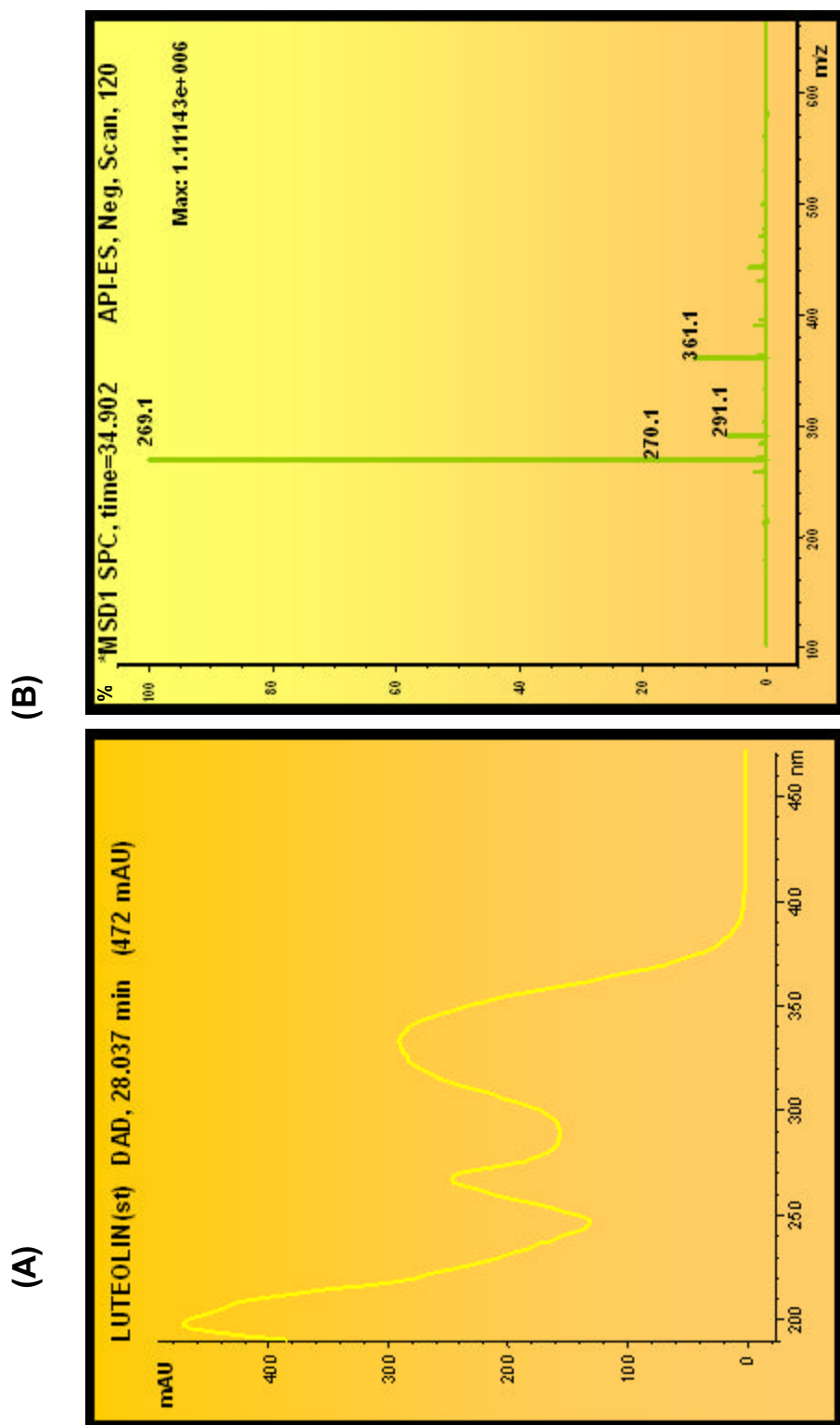


Figure 3: (A) UV spectrum of luteolin aglycon standard. (B) MS spectrum of peak eluting at 34.9 minutes, identified as apigenin.

Table 1 reports the content (mean \pm S.D. in mg/L oil) of each phenolic compound quantified in the Spanish and Italian oils. The compounds are listed in the order according to their retention time in HPLC and they have been grouped in different chemical classes.

The main results have been obtained evaluating the MPC at 280 nm. In these conditions the Elenolic acid was not evaluated, it was detected at 240 nm. The flavones were quantified at 350 nm. Two methods were developed for the quantitative determination and measurement of the phenolic constituents present in olive oil and two chromatographic columns were used especially for a better evaluation of the secoiridoids DAcOEa and EA.

The groups made for this study have been:

- Simple phenols: summation of concentrations from OH-Tyr, Tyr and derivative compounds.
- Secoiridoidic compounds, divided as Elenolic acid as the only one without the phenolic nucleus, Deacetoxyoleuropein aglycon and other secoiridoids with phenolic nucleus. A major proportion of these are undoubtedly represented by the derivatives of Oleuropein, and Ligstroside aglycons. Up today these molecules are they are difficult to evaluate individually mainly due to the non availability of pure commercial standards.
- Flavonoids: summation of trace amounts of Luteolin, Apigenin and derivative compounds.
- Lignans: summation of concentrations from Pinoresinol and Acetoxypinoresinol.
- Total phenols: summation of all phenolic compounds reported in the chromatograms, simple and complex, known and unknown.

Table 2: Polyphenolic Compounds concentrations (mg/L of Oil) in Different Spanish and Italian olive oil cultivars^a

	Pa	Pb	Pc	Pd	Pda	Hj	Ab	Tg	Pa-04	Tg-04	Tu-04
hydroxytyrosol	17.24 ± 1.96	23.38 ± 7.85	3.84 ± 0.4	21.64 ± 1.48	2.9 ± 0.07	4.64 ± 0.2	2.26 ± 0.35	8.13 ± 0.71	1.68 ± 0.05	0.57 ± 0.16	5.52 ± 0.1
tyrosol	10.03 ± 1.28	10.94 ± 3.45	21.57 ± 1.45	54.93 ± 3.48	2.8 ± 0.07	2.9 ± 0.04	1.85 ± 0.25	13.66 ± 0.94	3.33 ± 0.07	1.91 ± 0.21	4.61 ± 0.07
total secoiridoidic compounds*	356.96 ± 44.21	401.12 ± 30.83	123.01 ± 14.47	132.99 ± 2.05	79.04 ± 0.86	132.91 ± 3.48	60.85 ± 9.0	118.94 ± 5.33	498.75 ± 3.99	349.91 ± 26.69	619.29 ± 128.04
elenolic acid	66.56 ± 14.44	112.58 ± 24.12	25.38 ± 1.56	114.87 ± 22.85	17.45 ± 0.12	40.75 ± 0.82	10.53 ± 1.76	21.76 ± 8.01	17.5 ± 1.0	55.17 ± 36.62	36.5 ± 25.33
flavonoidic compounds	2.43 ± 0.3	0.76 ± 0.14	1.57 ± 0.58	1.26 ± 0.03	1.54 ± 0.03	1.43 ± 0.01	1.07 ± 0.14	2.29 ± 0.2	2.39 ± 0.1	1.51 ± 0.05	2.42 ± 0.3
pinoresinol	23.19 ± 1.24	10.91 ± 0.15	-	-	5.26 ± 0.3	11.77 ± 0.01	12.02 ± 0.87	7.5 ± 0.34	13.81 ± 1.77	8.23 ± 0.15	29.9 ± 1.03
acetoxypinoresinol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11.0 ± 0.0	26.0 ± 0.0	76.5 ± 4.95	48.0 ± 0.0	8.41 ± 0.63	173.7 ± 3.34	39.71 ± 0.98
total MCP	454.07	557.98	175.08	194.46	108.56	194.46	109.99	202.73	531.68	465.76	691.15

^a Means ± S.D. of three determinations

* with phenolic group (calculated at 280 nm)

^b n.d.= not detected

The Table 2 reports the content of phenolics compounds present in the polar fraction of the monocultivar Spanish and Italian virgin olive oils analyzed, expressed in mg/L of oil.

The main findings from this research evidenced interesting differences for MPC content among these 11 types of monocultivar extra virgin olive oils. The HPLC profiles of the MPC fractions were similar and sometimes overlapped, while the quantitative amounts presented notable variations. The histogram in Figure 4 shows a comparison among five different chemical classes within the MPC, expressed as % of each group. This figure sums up the averages in tables 1 and 2.

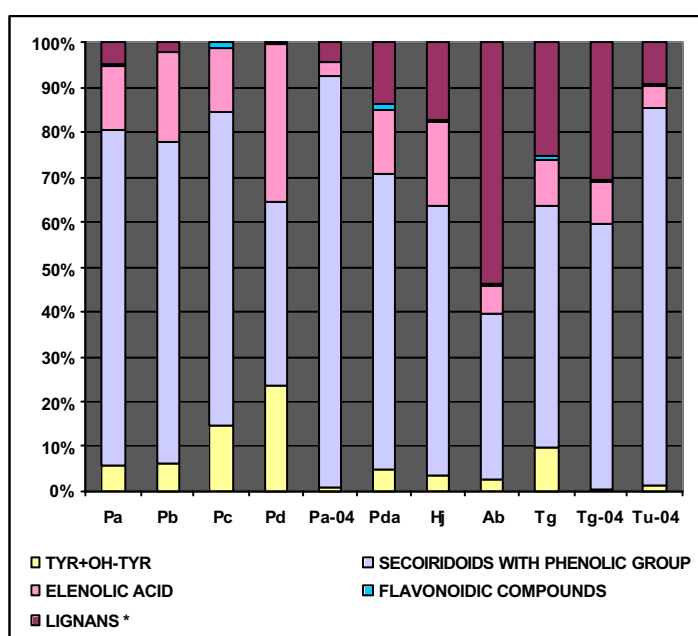


Figure 4: MPC Content as percentage of five different chemical classes. Compounds: OH-Tyr=hydroxytyrosol; Tyr= tyrosol; * pinoresinol and acetoxypinoresinol.

Picual

The results of statistical analysis of the phenolic composition of these oils are reported in Tables 1 and 2. The results are expressed as average (mg each compound/L oil) and S.D., corresponding to three determinations of each sample.

The Picual oil Pb has shown the highest *total phenol content* (557.98 mg/L), among the 2003 Picual samples.

The *total secoiridoidic compounds with phenolic nucleus* quantified at 280 nm, are more abundant in Pb, with 401.12 ± 30.83 mg/L, followed by Pa. It is important point to the fact that the DOA is in highest level in Pb, not far from Pa-04 and Pa, and that it has not been found in oils Pc and Pd.

The *ligustalosite B aglycon* was generally the main phenolic compound found in all the analyzed Picual oils as shown previously in figure 3 were the biggest area is related to the peak at 38.8 min (Picual, Picuda). The UV spectrum was similar to that of OA, with maximums at 235 and 280 nm (fig. 5A). It has been observed in all the oils, although in a very low amount such as Ab cultivar.

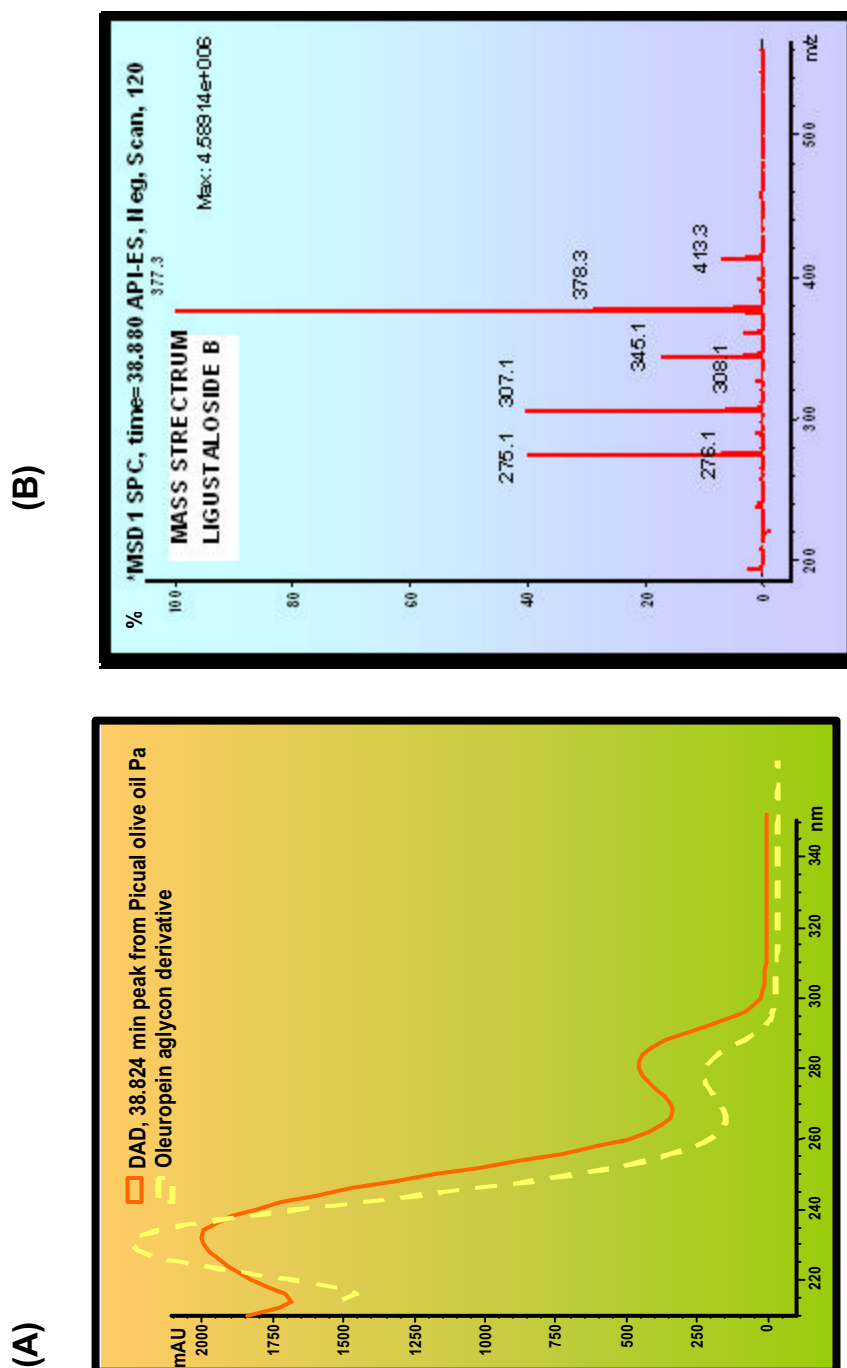


Figure 5: (A) UV spectrum from compound eluting at 38.8 minutes and a oleuropein aglycon derivative.
(B) Mass spectrum from Ligustaloside B.

Following in order of concentration was the *elenolic acid*, secoiridoidic without the phenolic group, found in high concentration in Pd (114.87 ± 22.85 mg/L), similar to Pb and double of the content found in Pa. The minimum value corresponded to Pc, under the 25% of the Pd elenolic value.

The *lignan* compound pinoresinol was found at low concentrations with respect to the total (2-5%) and was not detected in two of the tested Picual oils.

The main *simple phenols* found in this Spanish cultivar virgin olive oil are frequently Tyr and OH-Tyr. The free OH-Tyr was with a median concentration among 23.38 ± 7.85 mg/L for Pb and 3.84 ± 0.4 for Pc. Similarly, the Tyr as one of the principal phenolics, was found in all the analyzed Picual oils, but in this case, the highest quantity was in Pd with 54.93 ± 3.48 mg/L and the lowest level corresponded to Pa (10.03 ± 1.28 mg/L). The concentrations of both these compounds in Pa-04 were below 50 % of the smallest value in 2003 crop season Picual oils.

With regard to the *flavonoidic compounds*, the total amounts range between 2.39 to 0.74 mg/L, confirming very low content of these molecules in the oils, as previously described. The luteolin quantity was always higher than apigenin, considered in traces.

The differences among the Picual oils are mainly related to the crop season, production area and milling process. Contradictory results have been reported in some previous studies with respect to differences in olive oil composition due to the extraction systems employed (Jiménez *et al.*, 1995; Angerosa *et al.*, 1996; Ranalli *et al.*, 1996a, 1996b; Amirante *et al.*, 2001; Salvador *et al.*, 2003; Vekiari *et al.*, 2002a, 2002b).

This is because the amounts of the MPC compounds in the oil differ widely, because of many variables involved in the process of extraction: olive crushing machinery, temperatures applied, duration of contact, total volume of added water. All of these parameters may cause significant changes in the total phenol content.

The crop season is a critical variable, since its chemical composition may vary considerably from one crop season to the following (Salvador *et al.*, 2003). From our study the total content of MPC from the oils of 2004 crop season, showed the highest levels, as being fresh oils instead of one-year-old olive oils.

Other Spanish and Italian Cultivars

The method used allowed the separation and identification of a great number of phenolic compounds. It has been suggested that the phenolic profile could be used to classify virgin olive oils according to their fruit variety. Thereby, as reported in tables 1 and 2, the concentrations of many phenolic compounds differed significantly among the main Spanish olive oil varieties. The feasibility of cultivar classification by the HPLC phenolic compounds profile, in particular for Arbequina, Hojiblanca and Picual var., is clear for Gómez-Alonso *et al.* (2002). In fact, from what they say, the phenolic profile of Picual virgin olive oils is midway between those of Cornicabra and Hojiblanca (similar to Arbequina) and Picual and Cornicabra are the two Spanish varieties richest in phenolic compounds.

From our study, it can be affirmed that the Seggianese fresh oil presented the highest level of *total MPC* among all the varieties, followed by the Picual oils.

The amounts of *Secoiridoidic derivatives with phenolic group* are often the main phenolic compounds in olive oils (Brenes *et al.*, 2000; Pinelli *et al.*, 2003; García *et al.*, 2002). The respective absorptions at 280 nm in the UV spectra of the components corresponding to peaks between 22.25 and 49.85 minutes are similar with those provided by the pure reference OA.

The concentration of secoiridoids detected in the oils is also difficult to compare on any basis with previous publications because they are grouped in different ways by the diverse authors. Thus, for Owen *et al.* (2000) the levels of total secoiridoids described previously as oleuropein and ligstroside aglycons

derivatives, detected in Italian olive oils, were approximately half of total simple phenols.

The highest level of DOA was in Tu-04 oil, the other samples showed a content under the 10% of this Tuscan fresh oil. Similar amounts were found for the *elenolic acid*, around 10-20 mg/L in Ab, Pda, Tg and two - three times higher for Tu-04, Hj and Tg-04 oils.

The other major phenols identified in Italian olive oils by Owen *et al.* (2000) were *lignans*. In our research they were also evident in considerable quantities in the HPLC profiles of Ab, Tg-04 and Tg.

A series of *simple phenols* already described in the literature such as free hydroxytyrosol and tyrosol (Brenes *et al.*, 1999) were found in all the phenolic extracts both from Spanish and Italian cultivars.

It is well-known and accepted that the role played in oils by the simple phenols differs from that of complex phenols. The differences refer to their antioxidant properties and to their influence on the sensory features of oils (Pirisi *et al.*, 2000). The mean levels of hydroxytyrosol and tyrosol detected in the olive oils were approximately between 0.57 ± 0.16 for OH-Tyr in Tg-04 to 13.66 ± 0.94 mg/L of Tyr in Tg oil.

Tyr and OH-Tyr, are always present in all the cultivar but their concentration widely change in different EVOO and usually increase for the aged EVOO.

The *Flavones* Luteolin and Apigenin, formed by hydrolysis of the glycosides present in the olive pulp, have been described and characterized in Spanish virgin olive oil (Brenes *et al.*, 1999), such as Picual, Picuda, Cornicabra, Arbequina, Empeltre, Hojiblanca. In their study, the amount of luteolin was found to be >10 ppm in some oils, enough to be considered of interest from a health and nutrition viewpoint because of the useful effects attributed to flavonoids. Instead, we have found lower levels of flavonoids (from 1.04 in Ab to 3.89 mg/L in Tg-04), according

to Pinelli *et al.* (2003), which founded luteolin and apigenin at low concentrations with respect to the total (less than 2%) in all the Tuscan olive oils studied by them.

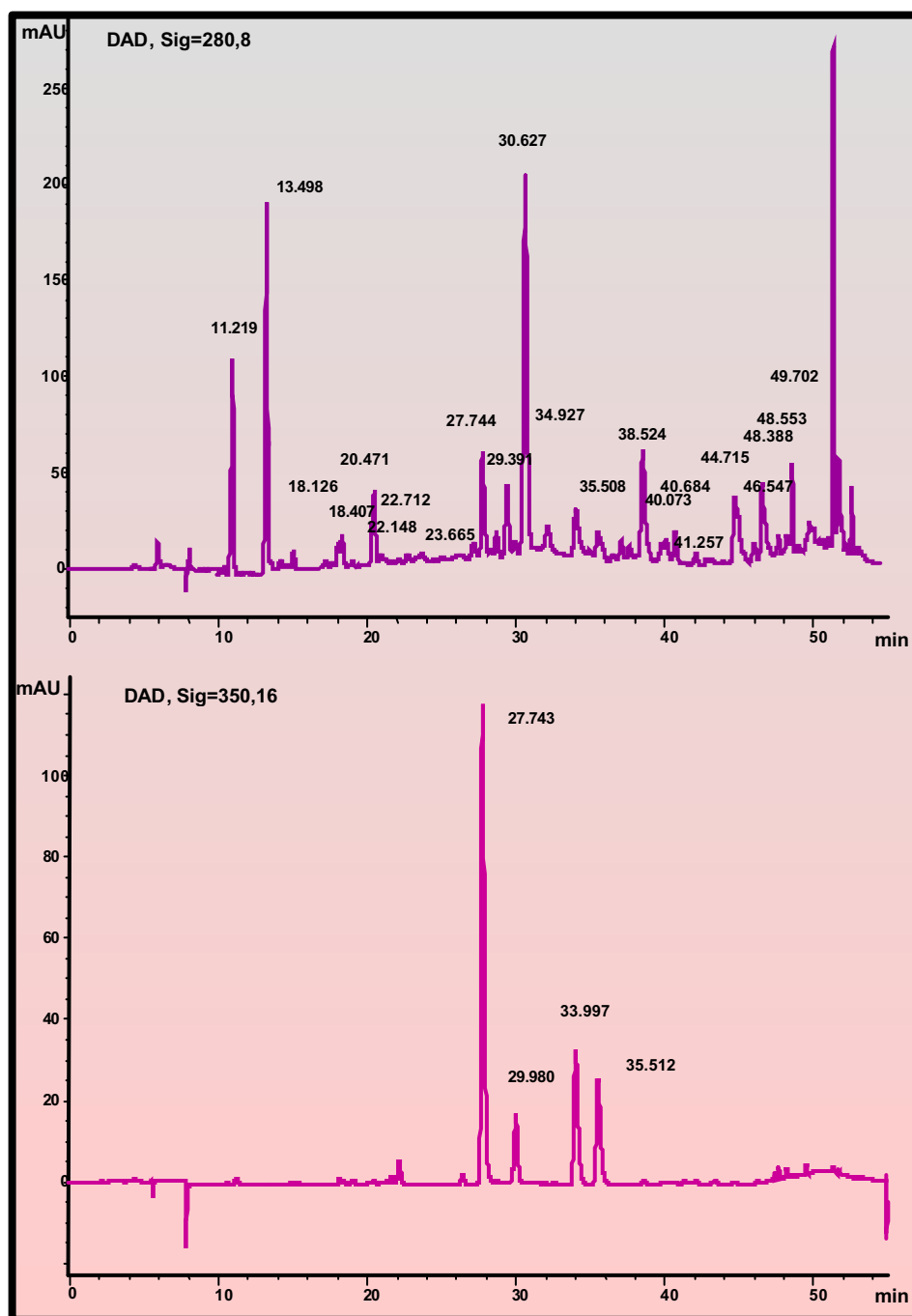


Figure 6 HPLC/UV chromatogram at 280 and 350 nm, obtained from a Taggiasca EVOO extract from 2003 crop season.

3.1.2. Detailed quali–quantitative study of the MPC in the monocultivar extra virgin olive oils tested

Total phenols were quantified by HPLC analysis and the amounts in the olive oil extracts were on average with those previously reported by other authors (Owen *et al.*, 2000; Aparicio *et al.*, 2002). Other methods (Montedoro *et al.* 1992a) that applied a non-specific colorimetric evaluation using the Folin-Ciocalteu reagent, revealed higher values-They differentiated their data on total phenol content with ranges of 50-200, 200-500 and 500-1000 mg/kg. However, in no case was the value higher than 324 mg/kg for virgin olive oils from Liguria, Umbria and Apulia Italian regions. In the following histogram are compared the total amounts of the MPC in all the analysed oils.

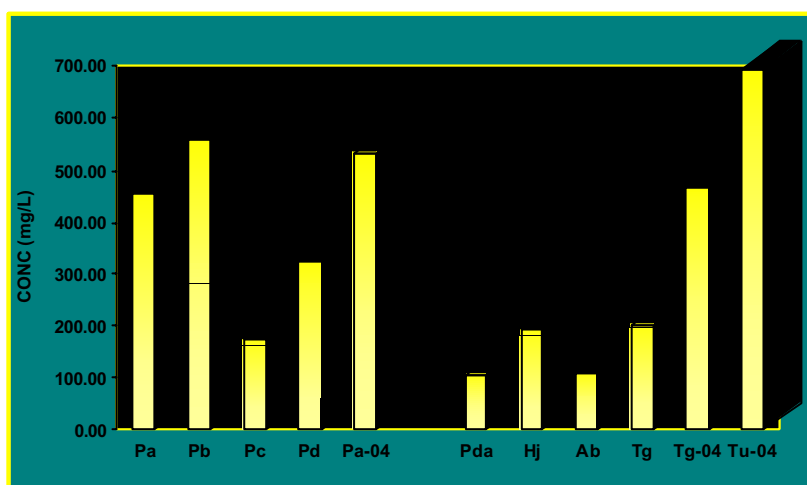


Figure 7: Concentration of Total Minor Polar Compounds in all the studied olive oils.

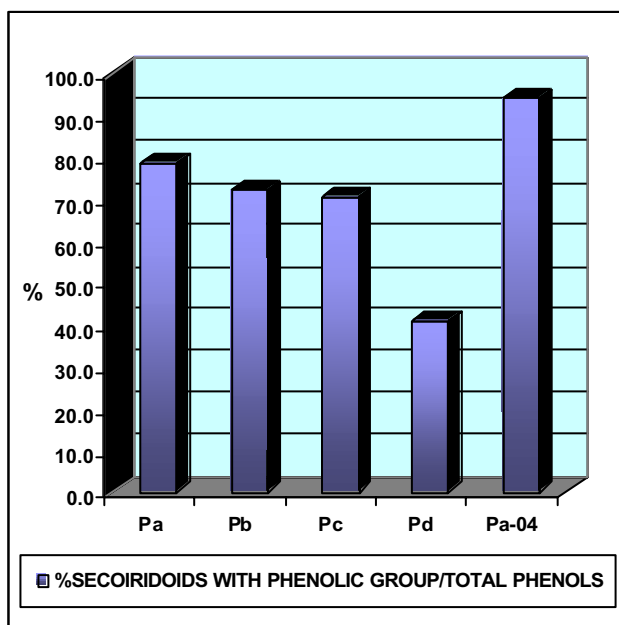


Figure 8a: Picual olive oil samples: percentage of Secoiridoids compounds with a phenolic group with respect to Total Phenols.

The Pa presented the highest % of secoiridoids among the Picual oils of the 2003 with a 75% of the total content, followed by Pb and Pc that were similar. The percentage in the Pa-04 fresh oil was about a 15% higher of that found in Pa.

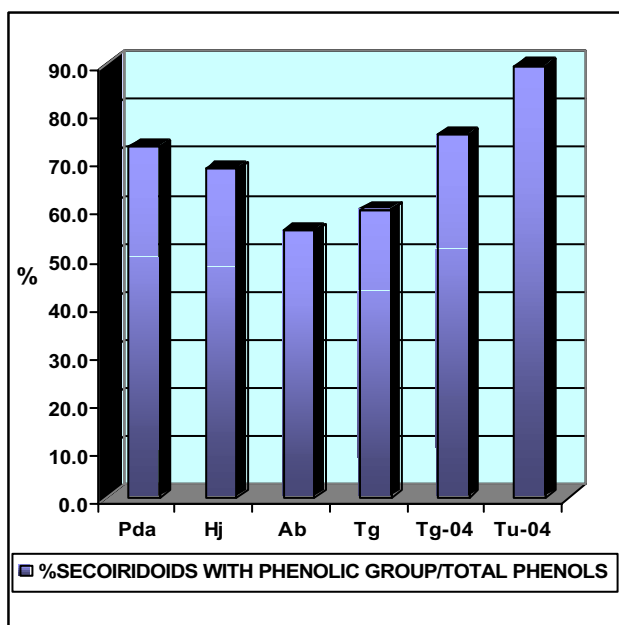


Figure 8b: Spanish and Italian monocultivar olive oils: percentage of Secoiridoids compounds with phenolic group with respect to Total Phenols.

The percentage of secoiridoidic compounds with a phenolic nucleus was similar for Tg-04, Pda and Hj oils, about 70-75%, and decreased for Tg and Ab samples. Tg was about a 20% lower than Tg-04, and, as expected, the fresh oil Tu-04 had the highest value.

The major linked phenols identified in Italian olive oils by Owen *et al* (2000) were secoiridoids and lignans. Quantitation of the MPC in Arbequina, Taggiasca and Peranzana cv. revealed the presence of large amounts of secoiridoidic molecules ranging between 80 and 90 % of the total content (Mulinacci *et al.*, 2005b).

When comparing these oils with the Picual varieties, it is shown that for Pda and Hj the value of the percentage of secoiridoids resulted to be as these of Pa and Pb, Pa had a % of secoiridoids similar to Tg-04 whereas Pa-04 has the highest ratio among all the analyzed oils, followed by Tu-04.

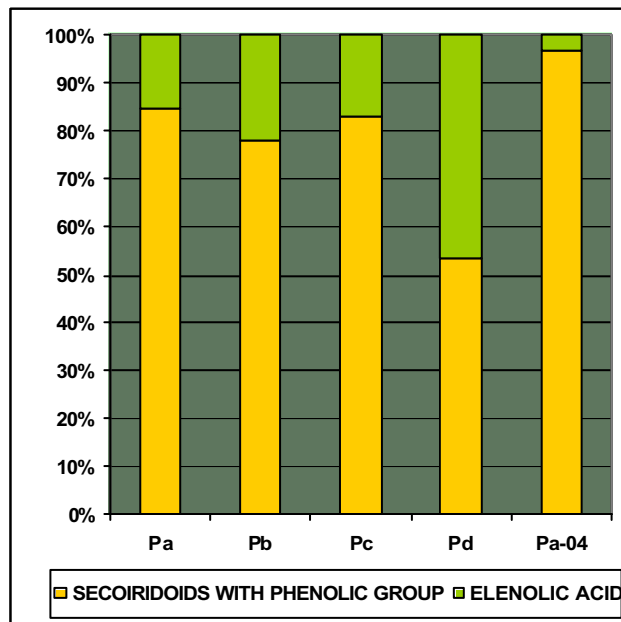


Figure 9a: Percentage of the different groups of secoiridoid compounds in the Picual olive oils. The figure shows the proportions of two classes of secoiridoid compounds, divided according to the presence or absence of the phenolic group in their structures.

Pa, Pc and Pb oils had similar proportions of these compounds, with around a 80% of those with the phenol. The lowest % of them was founded for the Pd samples, where half of the secoiridoids compounds was elenolic acid. On the contrary, in the fresh oil Pa-04 almost all the secoiridoids (more than 95% of total) had the phenolic group.

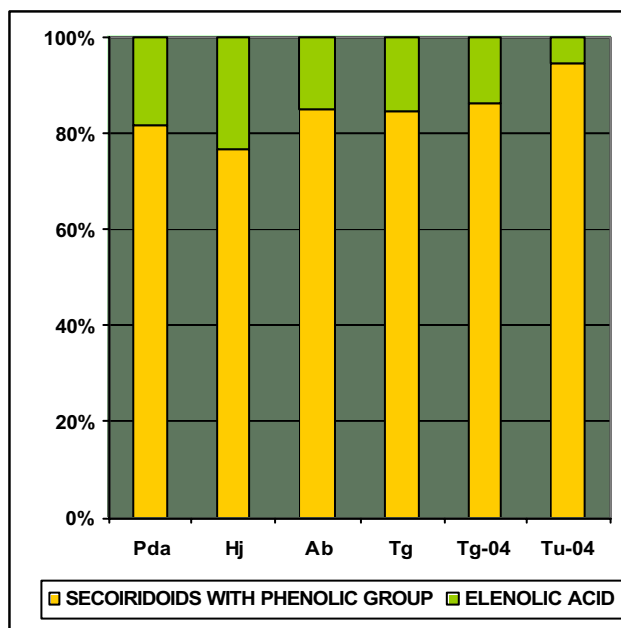


Figure 9b: Percentage of the different groups of secoiridoids compounds in other Spanish and Italian monocultivar olive oils. The figure shows the proportions of two classes of secoiridoid compounds, divided according to the presence or absence of the phenolic group in their structures.

The proportion of secoiridoids with phenolic group was equal for Tg-04, Ab, Tg and decreased slightly for Pda, Hj. The elenolic acid was only the 5.5% of these compounds in Tu-04 sample.

Generally, for the studied oils, the secoiridoids with phenolic group, including deacetoxyoleuropein aglycon, are close to 80% of the total secoiridoids, except for the Picual oil Pd, while the fresh oils Pa-04 and Tu-04, as expected, shown the highest values up to 95%. These results agree with previous findings

(Pinelli *et al.*, 2003; Mulinacci *et al.*, 2005b), observed for several fresh Italian olive oils that also shown low percentages of hydrolysis. Moreover a high ratio of secoiridoid derivatives/elenolic acid is presumably correlated to an higher stability of the olive oil.

The acetoxypinoresinol, among the Picual oils of the 2003-2004 crop, was detected only in the fresh oil Pa-04, but with lower concentration than Pinoresinol. Pa showed double amount of Pinoresinol that Pb, lignan that was not found neither in Pc nor in Pd. The quantity of Pinoresinol in Pa increased the 60% respect to Pa-04, but on the other hand, the concentration of lignans in these two oils was the same.

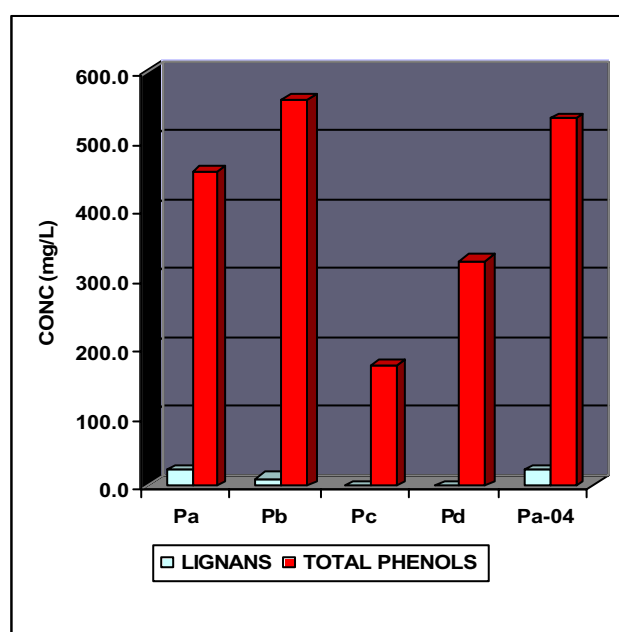


Figure 10a: Concentrations of Lignans and Total MPC in the Picual olive oils. This figure shows the concentrations of the Lignans (Pinoresinol and acetoxypinoresinol) with respect to the total concentration of minor polar compounds.

We have verified that in these oils, where peak of ligustalosite B was the biggest one, the peak corresponding to pinoresinol was small, as reported by Brenes *et al.* (1999), although they talked also of the acetoxo form in traces.

Besides, Pinoresinol is relatively abundant in two of our Picual oils, compared with the quantities founded in the similar variety Cornicabra studied by Gómez - Alonso *et al.* (1.5 - 3 mg/L). These amounts are also near to the average content founded by García *et al.* (2002) in several Picual EVOO. The lignans were the 4.3% and 5% of the MPC for Pa-04 and Pa respectively, and almost the 2% of the total phenols for the Pb oil.

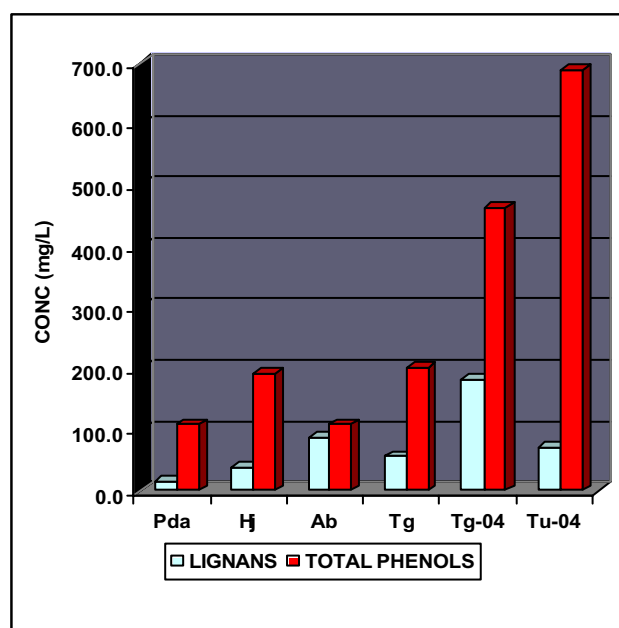


Figure 10b: Concentrations of Lignans and Total MPC in other Spanish and Italian monocultivar olive oils.

All the “not Picual” oils analyzed had both lignan compounds, and on the contrary to the Picual oil, the concentration of acetoxypinoresinol was always higher than Pinoresinol, approximately double for Tu-04, Pda, Hj and quite more for the other samples. The quantity of total lignans for Tg decreased three times respect to Tg-04, due to the decrease of the acetoxo form, as the Pinoresinol remained the same for both oils.

The two major lignans present in these olive oils were identified for the first time by Owen *et al.* (2000) and by Brenes *et al.* (2000b) as (+)-1-

acetoxypinoresinol and (+)-pinoresinol. Our study of lignans shows that the acetoxypinoresinol was the biggest peak in olive oil of Taggiasca and the Spanish Arbequina, in contrast with the Picual.

In conclusion, the percentage of total lignans with respect to the total phenols, was over 80% for Ab oil, 40% and 30% for Tg-04 and Tg, and among 20%-10% for Hj, Pda and Tu-04 ones. When comparing with the Picual oil, the amount of lignans for that cultivar was similar to Pda one, but the Picual ratio respect the total was always the lowest of the whole studied cultivars.

The total amount of MPC varies among the considered cultivars from the $691.15 \pm 22.4 \text{ mg L}^{-1}$ of Tu-04 to $108.56 \pm 0.97 \text{ mg L}^{-1}$ of Pda. The fresh oils always presented the highest content of total phenolics, for Tu-04 this value raised a 30% over Tg-04. Instead, Ab and Pda had the lowest level of MPC among all the analyzed oils.

Our findings go in agreement with the oil stability study of Gutiérrez *et al.* (2002). Hojiblanca oils resulted to loss their extra quality days before Picual oils, confirmed by studies of acidity, peroxide value, K_{232} and K_{270} , Rancimat stability, changes in total phenols and other antioxidants. In parallel with stability, the total amount decreased during storage for both oils. They conclude affirming that the time beyond which the oils lose their extra quality can be predicted as a function of their initial stability, founded higher for the Picual one.

With regard to the total phenol content, previous investigation (Romani *et al.*, 2001) reports EVOO medium range of 200-500 mg/Kg, These results are not in complete agreement with previous findings reported for Tuscan olive oils, mainly due to the different method applied for quantitation. The importance of this total amount is owed to the fact that a high content of MPC could protect against auto-oxidation (Pinelli *et al.*, 2003; Servili *et al.*, 2002; Mulinacci *et al.*, 2005b).

Acid hydrolysis

The acid hydrolysis treatment is proposed as a quantitative method for the evaluation of the true OHTyr and Tyr amounts, including both the free forms and those linked to the secoiridoidic nucleus. This hydrolysis can be applied to evaluate the antioxidant capacity in terms of MPC and also to collect useful information to forecast the oil ageing resistance according to other authors.

It is known that these secoiridoidic molecules are derivatives from oleuropein, the bitter glycoside of the fruit almost completely transformed during the milling processes and therefore present only in trace amounts in the extra virgin olive oil. The applied method completely hydrolyzes the secoiridoids without leading to any decomposition of the catecholic nucleus of OH-Tyr, (Mulinacci *et al.*, 2005a) which is certainly more oxidizable compared to Tyr.

As shown by the HPLC profiles after acid hydrolysis the disappearance of secoiridoidic compounds and the increase in OHTyr and Tyr is obtained. For Brenes *et al* (2000), after not quantitative acid hydrolysis of Picual olive oils remain OH-Tyr and Tyr peaks as most representative and a smaller peak running at 20 min.

Applying our method, this third peak was found by us only in Ab and Tg chromatograms, but never in Picual ones.

The results for the Picual oils of 2003 follow a sort of linearity for the three compared group of molecules. Maximum values were for Pb, slightly descend in Pa and get down to Pd and Pc. On the other hand, the fresh oil Pa-04 showed a content of free and linked OH-Tyr in between Pa and Pd oils, with a total MPC value close to that of Pb and the highest concentration of these secoiridoids among all the Picual oils here studied.

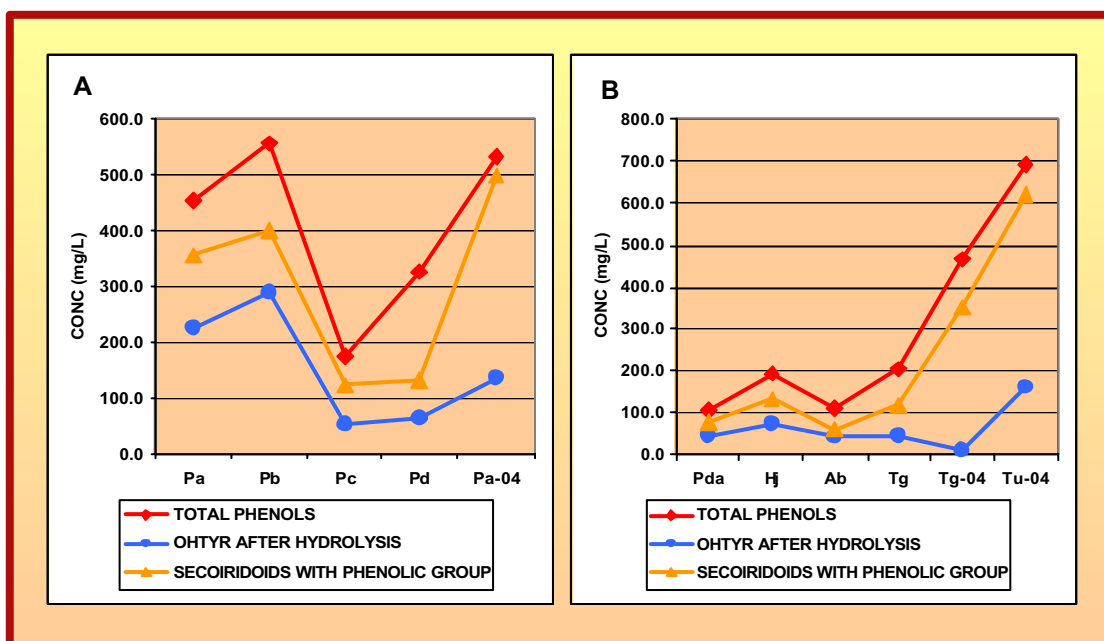


Figure 11: Correlation between the concentration (mg/L) of Secoiridoids*, free and linked OH-Tyr and Total Phenols of Picual olive oils (A) and other Spanish and Italian monocultivar olive oils (B). * with phenolic group (calculated at 280 nm). These diagrams illustrate the total content of OH-Tyr obtained after acid hydrolysis and compare these free and linked to secoiridoidic nucleus forms of the phenol, with the quantities of secoiridoidics compounds with catecholic group and with the total MPC.

The figure 11B explains the similarity that there is for the contents of total minor compounds and secoiridoidic compounds calculated at 280 nm in other Spanish and Italian olive oils. As happened with the Picual samples, both lines go in parallel reaching the top amounts for the fresh oils. Therefore, the largest amounts were always in Tu-04 and Tg-04, with minimums for Ab and Pda oils.

The Tu-04 oil had a content of free and linked OH-Tyr double of Hj oil, still higher than Pda, Tg and Ab. On the contrary to the MPC and secoiridoidics concentrations quantified, the Tg-04 had the smallest level of total OH-Tyr, the tenth part of the other fresh oil. Thus, the mg/L of total OH-Tyr resulted only the 5% of the total minor compounds concentration for this oil, diverse of the 23% found for the Tu-04 and Tg oils. Pda, Hj and Ab had a 40% of the total content.

After the acidic hydrolysis, the OH-Tyr in Pda, Hj and Ab was between the 60-70% of the secoiridoids with phenol group. As we have seen before, the content of total OH-Tyr in Tg-04 fresh oil was the smallest, 3.3% of these secoiridoids. This % was ten times higher for Tg and Tu-04.

The highest value for the total MPC content was for Tu-04 oil, Tg-04 was similar to Pa as Tg and Hj contents looked like Pc and Pd ones. Ab and Pda had a total phenolic quantity below all the Picual oils. Most of the varieties here studied had a total OH-Tyr concentration lower than that quantified for the Picual oils. Instead, Hj value was close to Pd one, and Tu-04 was slightly higher than Pa-04. In this way, Tg content was the fourth part of the Picual oil Pa.

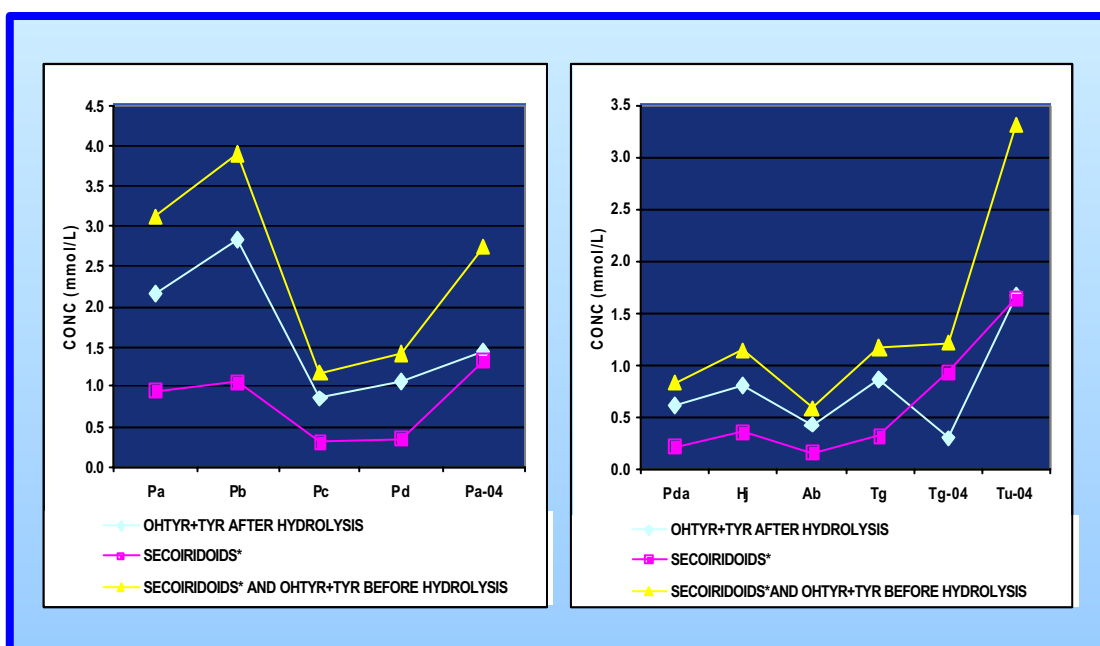


Figure 12 (A): Correlation between the mmol/L of secoiridoids*, mmol/L of (OH-Tyr+Tyr) and secoiridoids* and mmol/L of (OH-Tyr+Tyr) from the acid hydrolysis of the MPC fractions of the Picual olive oils analyzed. * with phenolic group (calculated at 280 nm). The figure shows the total mmol of OH-Tyr+Tyr formed after acid hydrolysis, the total mmol of the secoiridoidic compounds with phenolic nucleus evaluated by HPLC at 280 nm before the hydrolysis and the total mmol of these secoiridoids+OH-Tyr+Tyr before the hydrolysis. **Figure 12 (B): Correlation between the mmol/L of secoiridoids*, mmol/L of (OH-Tyr+Tyr) and secoiridoids* and mmol/L of (OH-Tyr+Tyr) from the acid hydrolysis of the MPC fractions in other Spanish and Italian monocultivar olive oils analyzed.** *with phenolic group (calculated at 280 nm).

As expected, after acid hydrolysis the amounts of Tyr and OH-Tyr were increased with respect to their content in the non hydrolyzed sample. The lines of this graph indicate the same tendency to that explained by the figure 11A for the 2003 crop oils. No difference between the results of these two graphs was found for the sample with largest level of secoiridoids with phenolic group, fresh oil Pa-04, where the amounts of OHTyr+Tyr after the acid hydrolysis were in the midst of Pa and Pd values. For the other two parameters shown here, the oils with highest values were Pb and Pa, with concentrations (mmol/L) over two times those found for Pd and Pc oils.

This secoiridoids group was transformed to OH-Tyr+Tyr by the acid treatment with a high efficiency. The amounts of these two simple phenols quantified after the hydrolysis represented around the 85-100% of the secoiridoids with the phenolic group, which means that were almost completely hydrolyzed. The graphic line which represents the sum of compounds before the hydrolysis is over the other two as expected. Moreover, that corresponding to the results of the phenols after the acid treatment remains shortly under the first one, because most of the secoiridoids are hydrolyzed to OH-Tyr and Tyr in all the analyzed oils.

The preceding figures reflect how it was verified by acidic hydrolysis that these molecules contain the OH-Tyr and Tyr groups. Figure 15B illustrates the correlation between the total mmol of OH-Tyr+Tyr, obtained after the acid hydrolysis, the total mmol of the secoiridoidic molecules evaluated by HPLC at 280 nm before the hydrolysis and the ? of total mmol of this group with the OH-Tyr and Tyr before the hydrolysis.

As shown before by the fig. 11B, the highest amounts of secoiridoids (*) were for Tu-04 and Tg-04 samples, and the line which represents this parameter in figure 12B is correlated with that corresponding to the ? before hydrolysis.

The quantity of these two simple phenols after acid hydrolysis of each oil is in the range of 0.29 to 1.68 mM. Highest values of this parameter were evidenced for Tu-04, Tg (half part) and Hj samples.

The smallest content of total OH-Tyr+Tyr was found in Tg-04 sample, as we have previously observed for total mg/L of OH-Tyr in figure 11B. The amounts of total ?OH-Tyr+Tyr are double of the mmolL of secoiridoids with phenolic group for most of the olive oils, with the exception of Tu-04 oil (equal quantities) and Tg-04 oil, where the ? was the third part of the secoiridoidic concentration.

Among the secoiridoidic compounds, often representing up to 90 % of MPC, it is important to discriminate between the molecules having the Tyr and those with the OH-Tyr group. In fact, free OH-Tyr is biologically more interesting mainly for its antioxidant capacity, as widely reported (Mulinacci, 2005a). Figure 13 shows the total content of OH-Tyr in all the analyzed olive oils.

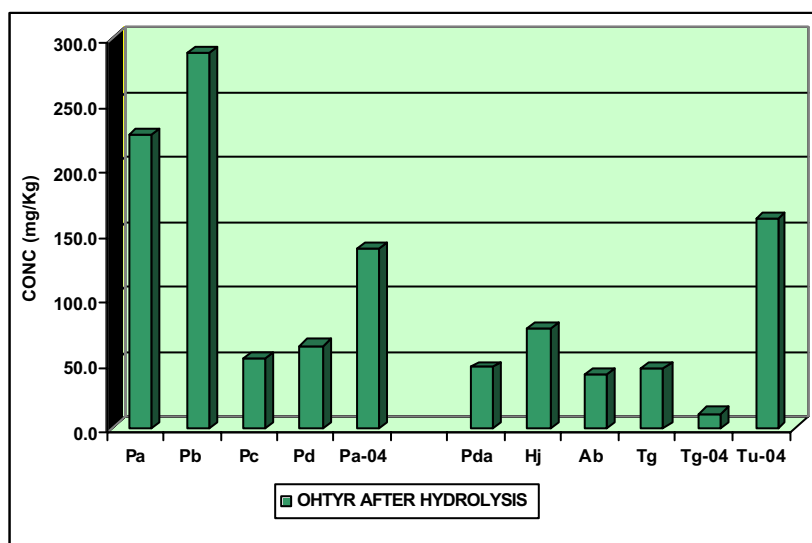


Figure 13: Concentration (mg/Kg) of free and linked OH-Tyr in the eleven Spanish and Italian monocultivar olive oils analyzed.

The head values of free and linked OH-Tyr corresponded to Pb and Pa oils, with a 20% difference between them. Fresh oils Tu-04 and Pa-04 (60% of Pa) represented the medium values of the analyzed samples, as long as the group of oils with lower level had around the third part of them and the fifth part of the two highest Picual oils.

Within the lower group, Pda and Tg had the same quantity, similar to Ab, where the total OH-Tyr was the 50% of that in Hj. Among the Picual ones, Pc showed the smallest content, still four times Tg-04 value, that supposed the sample with the lowest quantity of this free and linked phenol. This fresh Tg oil had about the 5% of the OH-Tyr after acid hydrolysis quantified for those Pb and Pa oils.

The results obtained from the eleven oils, together with previous experimental evidence (Servili *et al.*, 2002), highlight that the extra virgin olive oils Pb, Pa, Tu-04 and Pa-04 show a higher antioxidant capacity than the corresponding oils from Ab, Pda, Hj and Tg cultivars. This simplified analytical approach provides a suitable method for rapid screening of the MPC fraction (Mulinacci *et al.*, 2005a).

3.2. Study of lignan compounds in *Olea europaea* L. fruit

3.2.1. Lignans in virgin olive oil

The samples of virgin olive oils obtained from the varieties *Arbequina* and *Taggiasca* (crop season 2003) were chosen for this research because the quantities of the two major lignans were the highest among all the cultivars studied previously. Our study of lignans in virgin olive oils showed that the sample with the biggest peak of (+)-1-acetoxypinoresinol was Tg-04, followed by Ab (50%) and Tg. Some Picual samples and the Hojiblanca one studied had similar amounts of (+)-pinoresinol to *Arbequina*, above average of *Taggiasca* cv.

Anyway, the top level of total content of lignans was for Tg-04, Ab (50% of Tg-04) and Tg oil samples. Because of that, the experimental conditions were developed for *Arbequina* oil, which is one of the richest cultivars with regards the lignan content and for *Taggiasca* oil, with a high content of acetoxypinoresinol.

Alkaline hydrolysis was carried out according to Mulinacci *et al.* (2005a) with the aim of improving the recognition of the lignans, pinoresinol and acetoxypinoresinol, in the MPC fraction. In fact, after the acid hydrolysis these molecules almost completely decomposed and disappear from the HPLC profile.

Two main reasons led to the development of this strategy: a) the commercial standards of these lignans are not available; b) their UV-Vis spectra are very similar to those of the secoiridoidic compounds widely present in the MPC fraction and therefore, these spectra were not at all diagnostic to discriminate between these two chemical classes, and only the mass spectra are able to recognize these different chemical structures (Wolfender *et al.*, 2003).

Published analytical techniques for the measurement of lignans in foods include reversed-phase HPLC with UV and tandem mass spectrometric detection

(Wilkinson *et al.*, 2002), as the limited sensitivity and specificity of DAD make this detector not suitable for products with low lignan values. Moreover, several papers report HPLC methods not able to completely separate the lignans, pinoresinol and acetoxypinoresinol, from other secoiridoidic molecules (Mateos *et al.*, 2001; Owen *et al.*, 2000b; Gómez-Alonso *et al.*, 2002). Basic hydrolysis performed on the ethanolic extracts from the oils led to decomposition of most of the MPC, but not lignans.

As an example, the chromatographic profile at 280 nm of the MPC fraction from Arbequina is reported in Figure 14a and the simplified chromatographic profile after hydrolysis is reported in Figure 14b.

The HPLC chromatogram after alkaline hydrolysis of the ethanol extract yielded only tyrosol from secoiridoids because hydroxytyrosol is destroyed in strong alkaline solution. A new peak with t_R around 20 min appeared in the profile, according to Owen *et al.* (2000b), and corresponded to hydroxypinoresinol, which comes from acetoxypinoresinol partial degradation.

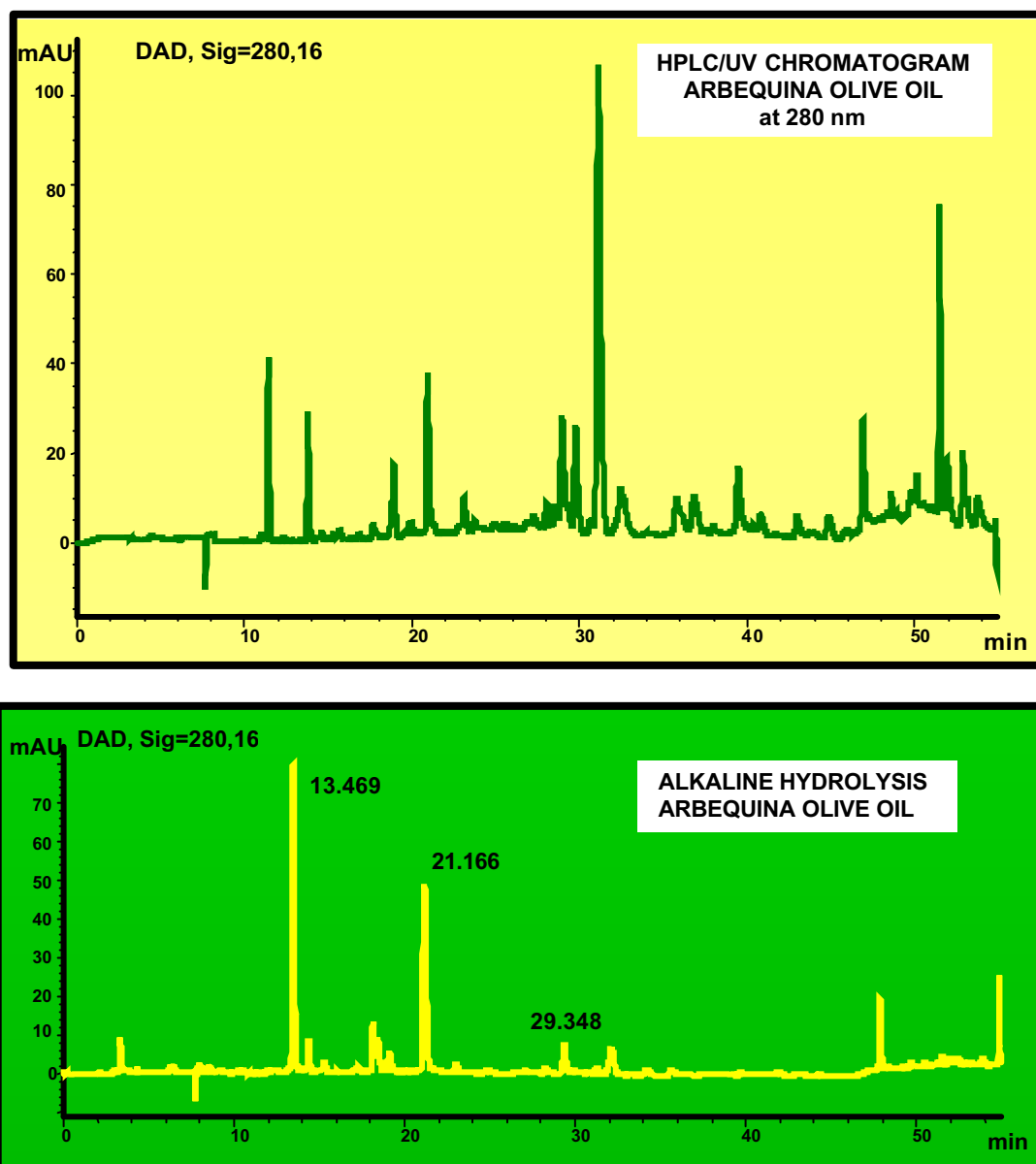


Figure 17: HPLC/UV chromatograms, at 280 nm, of MPC fraction from Arbequina virgin olive oil: before (a) and after (b) alkaline hydrolysis. (b) Compounds: Tyrosol ($t_R=13.46$ min), hydroxy-pinoinosin ($t_R=21.16$ min) and pinoinosin ($t_R=29.34$ min).

Lignan total amount in the Arbequina virgin olive oil studied was 88.52 mg/L, quantity 1.6 times bigger than that found for Taggiasca olive oil (55.5 mg/L).

This difference between both samples was also the same for pinoresinol and acetoxypinoresinol individual values. Pinoresinol content was for one and another the sixth part of acetoxypinoresinol amount.

The results of this study show that the lignans acetoxypinoresinol and pinoresinol are major components of the phenolic fraction of olive oils from these cultivars, where the quantity of lignans can be up to 100 mg/kg, but with the contents of simple phenols and secoiridoids, considerable inter oil variation exists.

Brenes *et al.* (2002) investigated these lignans in different Spanish olive oils (Arbequina, Hojiblanca, Picual, Empeltre and Cornicabra). They found both in all the varieties; pinoresinol in a range of 20-45 mg/Kg oil and acetoxypinoresinol ranging from 2 mg/kg for Picual oils to 95 mg/kg for Arbequina oils.

These quantities agree with our results. They ensure that more than 100 mg lignans/kg oil can be found in oils of Arbequina and Empeltre, which is important because of their biological and pharmacological properties. Moreover, they found that lignan concentration remained throughout storage of one year; still, we tested that lignan contents in Taggiasca fresh oil decreased with the time, as Tg total amount was the third part of Tg-04.

3.2.2. Lignans in olive pulp

All previous analyses of phenolic compounds in olives have been made on the whole olive flesh. Normally, olives are pitted and milled, and phenolic compounds are extracted by liquid-liquid methods. In this research, the lignans pinoresinol and acetoxypinoresinol have been individually characterized in olive fruit, differentiating their presence in pulp and stones. The structures of the lignans are shown in figure 15.

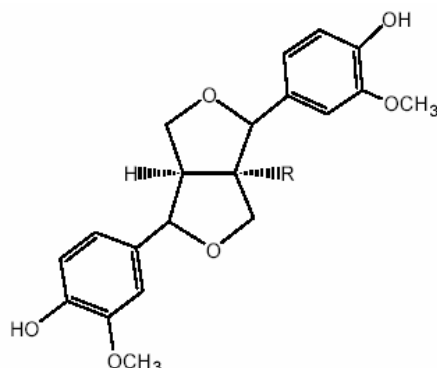


Figure 15: Structures of the lignans (+)-1-acetoxypinoresinol (R = OCH₃), pinoresinol (R = H), and (+)-1-hydroxypinoresinol (R = OH).

(+)-1-Acetoxypinoresinol. The UV spectrum indicates the presence of a phenolic compound, λ_{max} : 230 nm, 279 nm. The ESI mass spectrum affords a signal for $[M-H]^-$ at m/z 415, consistent with the molecular formula C₂₂H₂₄O₈ (exact mass, 416.147).

As we have seen in the study of olive oil, alkaline hydrolysis led to a product, *hydroxypinoresinol* with similar UV characteristics λ_{max} : 232 nm, 280 nm, and a molecular mass of 374, consistent with the replacement of one acetate group by a hydroxyl. The ion signal given in negative mode was at m/z 373.

(+)-Pinoresinol. The UV spectrum λ_{max} : 231 nm, 281 nm indicated the presence of a compound that was similar to both hydroxypinoresinol and acetoxypinoresinol. The ESI mass spectrum gives a molecular ion signal $[M-H]^-$ at m/z 357, consistent with the formula C₂₀H₂₂O₆ and molecular mass of 358.

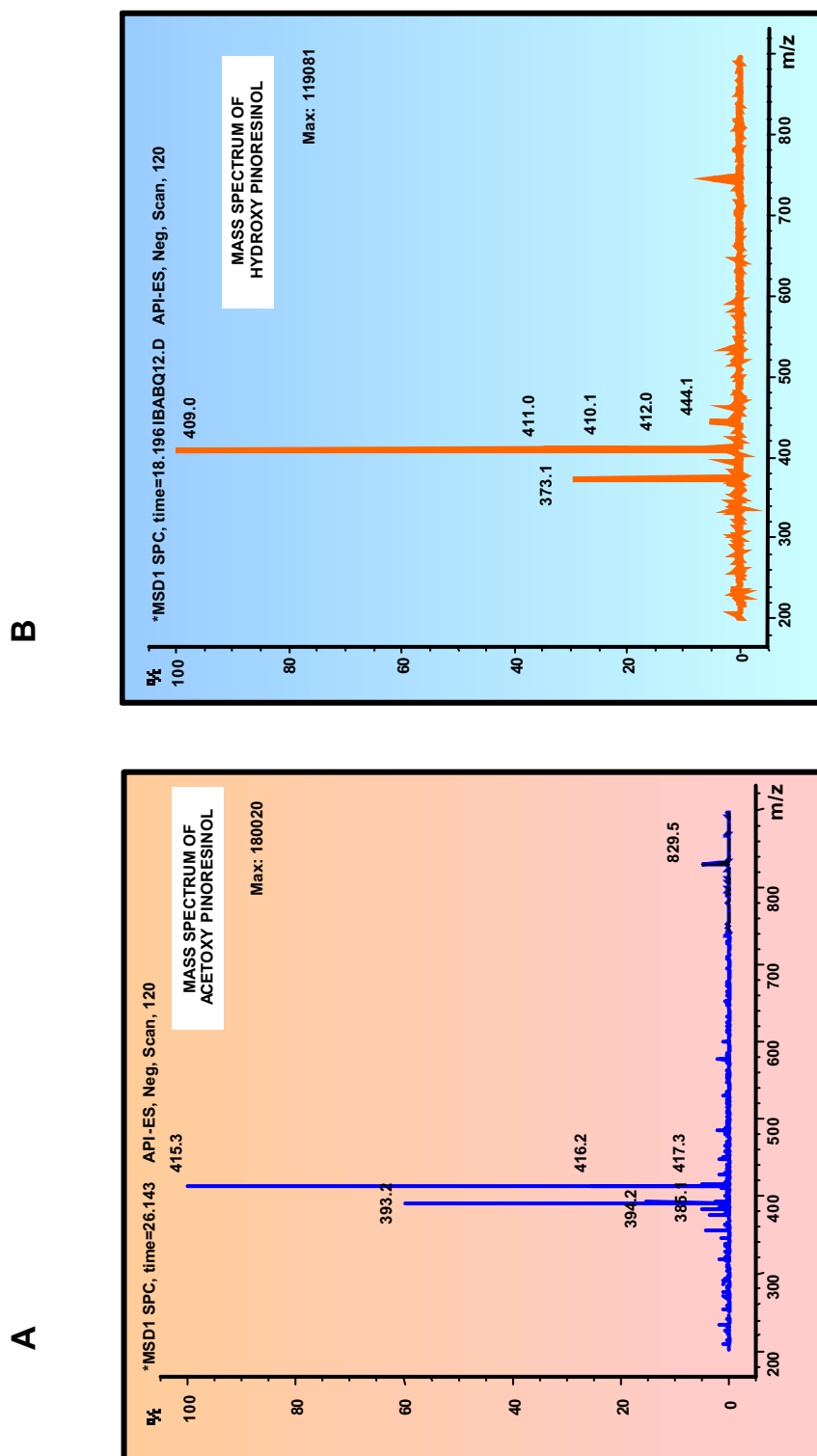


Figure 16: HPLC- MS spectra of the acetoxypinosesinol (A) and hydroxypinosesinol (B).

The UV spectra of these compounds exhibited two absorption maxima at around 230 and 280 nm, the latter being due to the hydroxyphenyl groups. Because of that, the shapes of UV spectra of (+)-pinoresinol and (+)-1-acetoxypinoresinol are similar to those of hydroxytyrosol and tyrosol. Exclusively UV detection was not appropriate to analyze low amounts of lignans and peaks with UV spectra similar to secoiridoids, were confirmed with the response in HPLC-MS. Thereby, mass chromatograms of Ab and Tg extracts after scanning at different m/z were obtained.

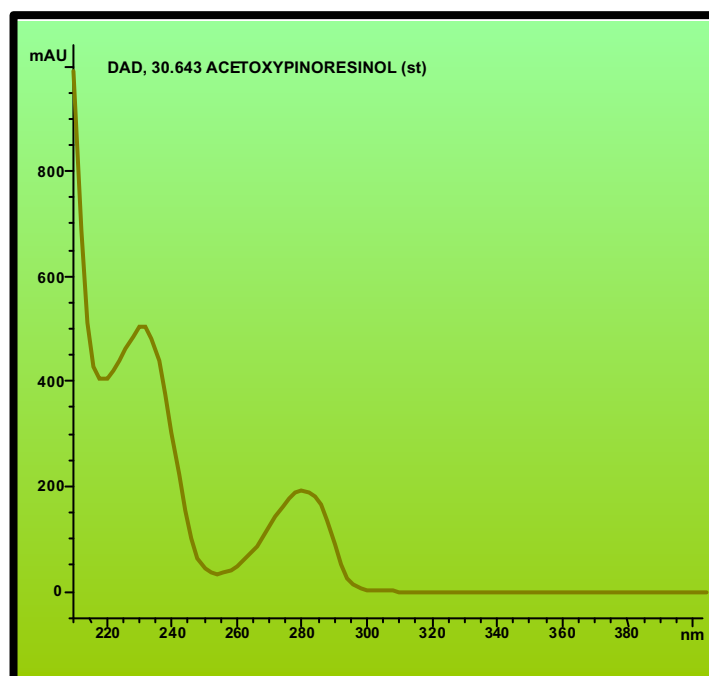


Figure 17: UV spectrum from acetoxypinoresinol

We have developed the search of lignans in the different parts of the olive fruit with selected extract ions option (molecular weight) corresponding to pinoresinol ($m/z = 358$), acetoxypinoresinol ($m/z = 416$), hydroxypinoresinol ($m/z = 374$), oliville ($m/z = 376$), and some of their glucosides ($m/z = 535, 698, 519, 682, 624, 462, 454, 438, 356, 376$).

Mass conditions have been in both negative and positive mode, testing various fragmentor characteristics from 80 to 200 to improve lignans detection.

There was just one previous paper in literature where lignans had been studied and identified in olive pulp and stones, performed on the Italian olive fruits Nostrana di Brisighella and the cv. Ghiacciolo (extract of bark), by Bonoli *et al.* (2004).

They also carried out UV and MS detection to recognize lignans in HPLC and affirm that pinoresinol was particularly abundant in the extract of bark of olive fruits, whereas only a slight amount of acetoxypinoresinol was detected. The acetoxypinoresinol was recognized in the Nostrana di Brisighella virgin olive oils but these two lignans were not detected in extracts of seed and pulp.

We searched lignan presence in our samples following ESI-MSD (m/z ions) conditions showed by these authors for lignans in olives:

a) Pinoresinol positive: 397 [M + K]⁺, 381 [M + Na]⁺, 359 [M + H]⁺.

b) Acetoxypinoresinol positive: 455 [M + K]⁺, 439 [M + Na]⁺, 417 [M+H]⁺, 357 [M-CH₃COOH + H]⁺.

ESI-MS data (m/z) reported by Owen *et al.* (2000) for the Italian Ligustro virgin olive oil have also been tested in our study:

	[M-H] ⁻	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺
(+)-1-Acetoxypinoresinol	415	417	439
(+)-Pinoresinol	357	359	381
Hydroxypinoresinol	373	375	397

Romero *et al.* (2004) found these two lignans in the oil phase from the flesh of Manzanilla table olives, industrially processed by alkaline treatment, washing and brining. HPLC chromatograms were obtained by UV and fluorescence detection, giving amounts in a range similar to that found in virgin olive oil. Quantities founded by them in this phase for acetoxypinoresinol and pinoresinol were between 118 μM and 76 μM for the Greek cultivar Thassos respectively, and 20 μM and 7 μM for Manzanilla cv.

The method of Milder *et al.* (2004) for solid foods (bread, broccoli, tea, flaxseed) also consisted of combined extraction and alkaline hydrolysis. It is mainly used to break oligomer bonds and liberate lignan glycosides. When we achieved the alkaline hydrolysis, as described in *Materials and Methods* chapter, none of these compounds was identified.

Only with one of the methods developed, the extraction with hot methanol of Taggiasca pulp, we could find acetoxypinoresinol in small quantity in ethylic and Cl_2CH_2 phases. On the contrary, it was not identified in the Italian cultivar Taggiasca olive pulp. Morelló *et al.* (2005) confirm in a recently study the presence of lignans in Arbequina olive oil, but they are not able to find them in olive pulp, when performing an hexane and methanol extraction.

In the same way, Owen *et al.* (2003) did not find lignans in Italian brined olive drupes varieties, when performing extraction with methanol for over three hours.

It was suspected that lignans could be present in olive pits and be transferred to oil in the milling processes. In fact, for Romero *et al.*, 2004 values of both lignans among samples of Manzanilla table olives processed by different methods were smaller when the fruits had been pitted, so we proceeded to investigate these compounds in the stones of the olives.

3.2.3. Lignans in olive stone

Pinoresinol is a common component of the lignan fraction of several plants and seeds, whereas acetoxypinoresinol and hydroxypinoresinol and their respective glucosides have been detected by Tsukamoto *et al.* (1984, 1985) in the bark of the olive tree (*Olea europaea* L.). The question of how these lignans become a major component of the phenolic fraction of olive oil has yet to be answered.

As we have seen, some studies have shown that they are not present in the pericarp of the olive drupes, nor in the leaves and twigs that may be present in the mulch prepared for olive pressing. However, preliminary studies have shown that pinoresinol is a major component of the phenolic fraction of the olive pits.

Lignans were identified in the powdered olive stones of Taggiasca and Arbequina cultivars. Their presence was only made evident when hot methanol extraction was achieved and both ether and Cl_2CH_2 layers were analyzed by HPLC/DAD/MS as shown by figure 18.

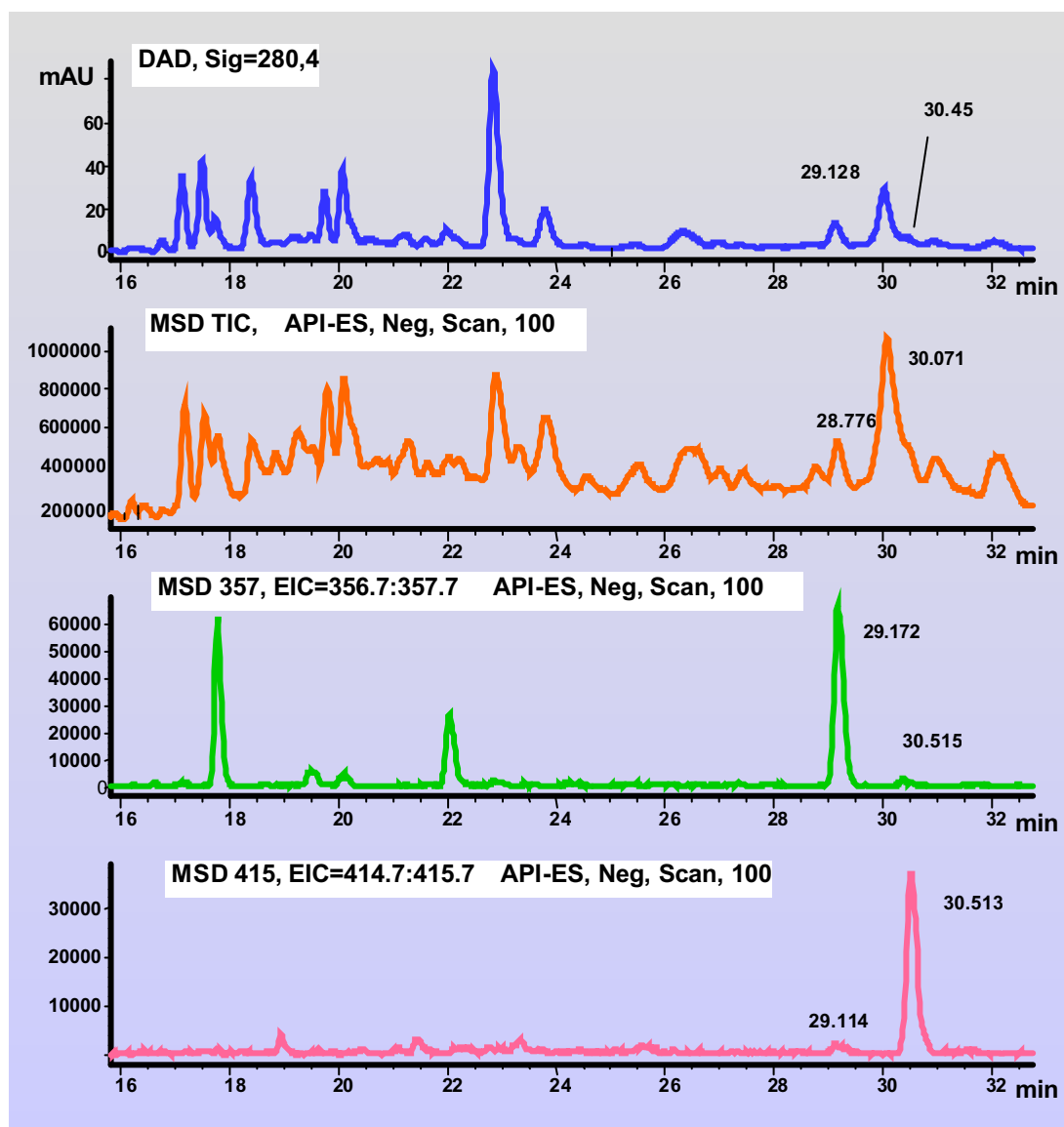


Figure 18: HPLC-UV chromatogram (upper trace); MS chromatogram; Ion chromatograms at m/z 358 and 416 (lower traces) of the ether ethylic extract obtained with hot methanol method performed on Taggiasca powdered olive stone. UV detection was carried out at 280 nm. Selected extract ions in negative mode and fragmentor 100 was employed for the mass analysis. Compounds: pinoresinol ($t_R = 29.13$ min) and acetoxypinoresinol ($t_R = 30.45$ min).

Compounds search was made in the same way that the previous study on the pulp, checking UV and mass spectra of each peak and performing extract ions method in all the extracts obtained from entire and powdered pits. The structures of peaks eluting at 29.13 and 30.45 min in HPLC chromatograms were elucidated

as pinoresinol and acetoxypinoresinol, respectively, in accordance with literature (Bonoli *et al.*, 2003, 2004; Kadowaki *et al.*, 2003; Owen *et al.*, 2000). The trace quantities of peak at 30.45 minutes also made difficult its mass identification, but we concluded that this compound was the acetoxy form of pinoresinol, appearing about one minute before.

Semi - quantitative results of lignans in olive stone are collected in Table 3. Pinoresinol concentration was the same for Arbequina and Taggiasca. Acetoxypinoresinol content in the Spanish variety was almost double of Taggiasca, but this result can not be considered important because they are trace concentrations (< 0.5 mg/g of dry product). Total content was similar for both cultivars.

LIGNANS IN OLIVE STONE		
SPANISH CULTIVAR ARBEQUINA		
COMPOUNDS	Ether ethilic phase	mg/g dry product
Pinoresinol		1.96
Acetoxypinoresinol		0.23
Lignans		2.15
Pinoresinol	Cl₂CH₂ phase	2.49
Acetoxypinoresinol		0.00
Lignans		2.49
Pinoresinol	Total content	4.45
Acetoxypinoresinol		0.23
Lignans		4.69
ITALIAN CULTIVAR TAGGIASCA		
COMPOUNDS	Ether ethilic phase	mg/g dry product
Pinoresinol		2.89
Acetoxypinoresinol		0.12
Lignans		2.98
Pinoresinol	Cl₂CH₂ phase	2.07
Acetoxypinoresinol		0.00
Lignans		2.07
Pinoresinol	Total content	4.96
Acetoxypinoresinol		0.12
Lignans		5.07

Table 3: Lignan contents in Arbequina and Taggiasca olive stone. Concentrations are expressed as mg compound / g of dry powder extracted with the two organic solvents after the hot methanol treatment.

On the other hand, total lignan amounts recovered in the two organic layers were equally; all the traces of acetoxypinoresinol were extracted in the first washing, made with ether ethylic. Possibly because of that, this compound was not present in the HPLC chromatograms corresponding to Cl_2CH_2 extract.

Pinoresinol was found in pits of both cultivars in similar concentrations, with traces of the acetoxy form, small quantities which were also identified in Taggiasca pulp. In the virgin olive oils, Arbequina presented bigger contents, whereas pinoresinol amounts were always smaller for the two varieties.

The results from this study could be useful to optimize the milling proceedings to produce olive oil and to propose the use of lignans as possible markers for recognizing the olive cultivars.

Due to the interest given to these compounds because of their biologic activity (Kang *et al.*, 2000; Owen *et al.*, 2000b; Cornwell *et al.*, 2004), this results could also be applicable to evaluate their recovery from the products remaining after olive oil elaboration, such as solid olive residue or stones.

4. ESTUDIO DEL EFECTO BIOLÓGICO DE UN ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA CON ELEVADO CONTENIDO EN POLIFENOLES

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Animales de experimentación

Los animales empleados para realizar todos los experimentos fueron ratones OF-1, machos, de 25-40 gramos de peso y aproximadamente dos ó tres meses de edad, criados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Miguel Hernández. Los progenitores originales fueron suministrados por los laboratorios Charles Rivers (Les Oncins, Francia). Los animales se mantuvieron en unas condiciones de luz-oscuridad con ciclos de 12 horas, a una temperatura de 21° C y una humedad relativa del 55%. La dieta empleada fue la estándar para ratón AO4 de Panlab S.A. (Barcelona, España) y hasta el momento de su sacrificio tuvieron libre acceso al alimento y al agua.

Los animales se dividieron en tres grupos:

- a. Ratones controles alimentados con dieta estándar (Grupo CTL).
- b. Ratones alimentados con dieta estándar y el aceite de oliva objeto de estudio (Grupo AO).
- c. Ratones alimentados con dieta estándar y aceite de girasol (Grupo AG).

A los ratones de los grupos AO y AG se les administró el aceite vía oral, mediante el uso de una sonda gástrica diseñada para ratones unida a una jeringa, que permitió controlar las dosis ensayadas de ambos tipos de aceite.



Figura 1: Administración oral de las dosis diarias de aceite.

4.2. Dosis de aceite administradas

Antes de comenzar el estudio se determinó la cantidad de aceite que se iba a administrar a los ratones en todos los experimentos posteriores. Para ello, se tuvo en cuenta la concentración de hidroxitirosol en el aceite de oliva virgen extra empleado (10 $\mu\text{g/g}$) y se consideró un consumo de aceite diario normal en el hombre (aproximadamente entre 50 y 170 mL/día).

A los ratones de los grupos AO y AG se les suministraron 50 μL y 100 μL de aceite de oliva y girasol, respectivamente, en una dosis diaria única que se administraba entre las 9:00-11:00h de la mañana, lo que correspondería con un consumo de unos 85 y 175 mL, respectivamente, de aceite en el hombre (peso medio considerado $\sim 70\text{Kg}$). Esta pauta se siguió entre tres y cinco días y en todos los casos se sacrificaron los animales al día siguiente de terminar con el suplemento de aceite.

4.3. Reactivos de laboratorio

Todos los reactivos de laboratorio de uso cotidiano, las sales empleadas para preparar las soluciones y la glucosa anhidra proceden de Panreac (Barcelona, España).

Aparataje general:

- Balanza de precisión AG64. Mettler-Toledo (Greifensee, Suiza).
- pH-metro MP220. Mettler –Toledo.
- Agitador magnético electrónico Agimatic. P-Selecta (Barcelona, España).
- Vortex Reax Control. Heidolph (Schwabach, Alemania).
- Micropipetas Wilson S.A. (Villiers-le-Bel, Francia).

4.4. Determinación de los niveles de hidroxitirosol en plasma

✍ REACTIVOS Y MATERIALES

- Acetonitrilo de pureza analítica para HPLC. Panreac.
- Ácido acético glacial de pureza analítica para HPLC. Panreac.
- Ácido fosfórico al 85%. Panreac. (Barcelona, España).
- Adaptador jeringa-cartucho. Waters. (Barcelona, España).
- Agua MilliQ para HPLC. Millipore (Madrid, España).
- Agujas de 0,6mm \times 25mm y 0,5mm \times 16mm. Microlance BD (Madrid, España).
- Cartuchos Oasis HLB de 6mg, 3cm³. Waters (Milford, MA).
- Centrífuga GS-6R. Beckman (Fullerton, CA).
- Jeringa de filtración 5 mL. Hamilton (Reno, NV).
- Jeringas de varios volúmenes. Plastipak BD (Madrid, España).
- Material quirúrgico. Aesculap AG (Tuttlingen, Alemania).
- Metanol de pureza analítica para HPLC. Panreac.
- Patrón estándar de catecol. Sigma (Madrid, España).
- Pentobarbital sódico (20g/100mL.) Inyectable de uso veterinario para vía intravenosa ó intracardíaca. Euta-Lender, Normon (Madrid, España).
- Tubos de 6mL con EDTA-K3. Vacuette (Kremsmünster, Austria).

PROCEDIMIENTO

4.4.1. Extracción de sangre y obtención de las muestras de plasma

Los ratones fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (0,6 g / Kg peso corporal). Mediante una incisión media, se abatió la pared abdominal gracias a dos secciones horizontales a nivel de los bordes costales inferiores. Se seccionó el diafragma y se traccionó la pared costal, fijándola con una pinza para permitir la extracción de sangre del ventrículo izquierdo, que se realizó mediante punción cardíaca mientras el corazón mantenía el bombeo y antes de entrar en fibrilación.

La sangre se transfirió a un tubo con EDTA como anticoagulante y se mantuvo a 4°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 1600 rpm durante 12 minutos a 5°C y se obtuvieron los plasmas (sobrenadantes) de los tres grupos de animales, que se congelaron a -20° C hasta su posterior análisis.

4.4.2. Extracción en fase sólida (SPE) de los polifenoles del plasma

Para la extracción de polifenoles del plasma de los ratones, se ha seguido el método descrito por Ruiz-Gutierrez y cols. (2000) con pequeñas modificaciones. El estándar interno empleado para la cuantificación del hidroxitirosol fue el catecol. Antes de cada extracción, se preparó una solución stock de 1 mg/mL y a partir de ésta se obtuvo una solución estándar de concentración 10 µg/mL.

Se prepararon dos soluciones stock del patrón estándar de hidroxitirosol, de 5 mg/mL y 50 µg/mL y se añadieron a plasmas de ratones control para obtener concentraciones de 250, 500, y 1000 ng/mL de hidroxitirosol. Se congelaron a -20° C con los plasmas obtenidos de los tres grupos de animales.

Todos los plasmas se descongelaron a 4°C y de cada uno se tomó un volumen de 1mL. Además, para precipitar las proteínas que podrían unirse al hidroxitirosol e interferir en la medida, se les adicionó el estándar interno y ácido fosfórico al 85% y se mezcló todo durante 1 minuto en el vórtex.

Antes de la extracción, fue necesario el acondicionamiento del cartucho Oasis, haciéndole pasar de manera sucesiva metanol y agua milliQ. Para la extracción se llenó el cartucho con el plasma acidificado y agua milliQ, seguido de metanol:agua (5:95) que eluyó como fracción desechada. El cartucho se llenó a continuación con metanol y, manteniendo el flujo de extracción, se obtuvo la fracción en la que iba disuelto el hidroxitirosol.

Por último, se concentró la muestra con gas nitrógeno hasta quedar una fracción aproximada de 200 µL de extracto, que se almacenó en oscuridad y refrigeración hasta su inyección en el cromatógrafo.

4.4.3. Determinación cuantitativa de hidroxitirosol por HPLC

El análisis del hidroxitirosol en el plasma de los ratones se ha realizado empleando el cromatógrafo líquido Perkin-Elmer Series 200 y la columna Lichrospher 100 RP18, descritos anteriormente en el apartado 2.1.2. de *Material y Métodos*. Las condiciones cromatográficas han sido las siguientes:

Para la elución de las muestras se emplearon dos solventes desgasificados compuestos por Agua:Acético (97:3) y Metanol:Acetonitrilo (50:50), con un flujo de solvente de 1 mL/min, manteniendo la columna durante todo el desarrollo cromatográfico una temperatura constante de 30° C.

En la fase previa a la inyección en el cromatógrafo, todas las muestras fueron sometidas al proceso de extracción antes descrito y finalmente filtradas con membranas de 0,45 μm de tamaño de poro. El volumen de muestra que se inyectó en el cromatógrafo a temperatura ambiente fue de 20 μL .

El gradiente de elución utilizado para obtener una separación correcta del hidroxitirosol y catecol fue el siguiente:

Tiempo (min)	% Agua:Acético (97:3)	% Metanol:Acetonitrilo (50:50)
0	95	5
25	70	30
27,5	60	40
30	30	70
40	0	100
45	95	5

En estas condiciones, el hidroxitirosol tuvo un tiempo de retención de 7,11 \pm 0,5 minutos y el estándar interno de 9,52 \pm 0,5 minutos.

A continuación se muestra el cromatograma obtenido tras la inyección de una muestra de plasma de ratón alimentado con aceite de oliva.

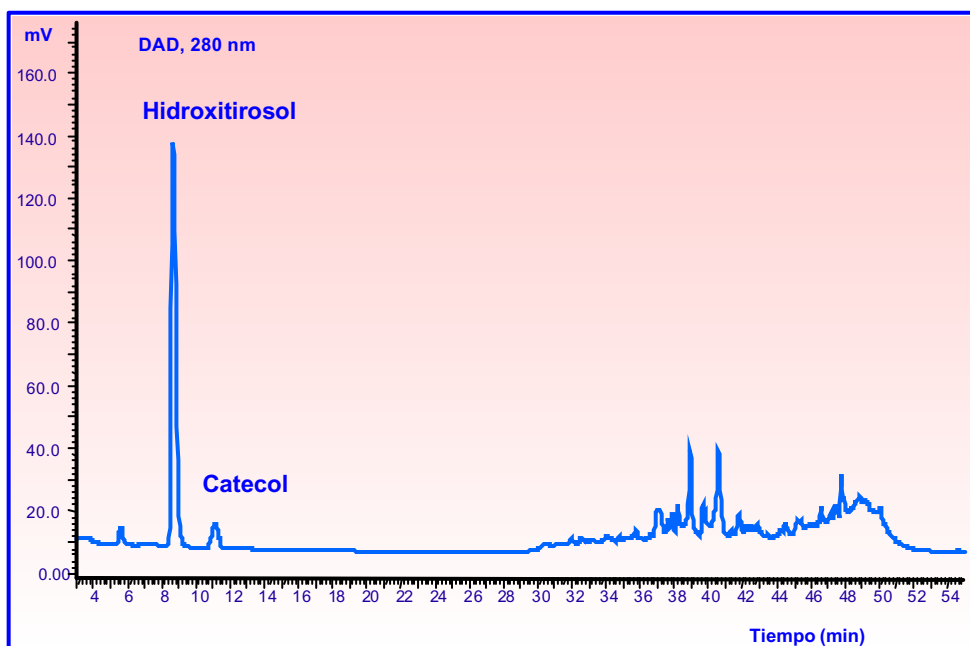


Figura 2: Cromatograma de una muestra de plasma de ratón alimentado con 50 μL de aceite de oliva durante cuatro días. Se representa la señal registrada por el detector UV-Vis (mV) frente al tiempo de retención en la columna (minutos). El tiempo de retención del hidroxitirosol de esta muestra es de 8.4 ± 0.21 minutos. El segundo pico registrado ($t_R = 10.6 \pm 0.15$ minutos) corresponde al catecol.

Para confirmar la identidad de los compuestos estudiados, se obtuvieron sus espectros de absorción y se compararon con los correspondientes espectros obtenidos de los patrones puros.

4.5. Determinación de la capacidad antioxidante del plasma

4.5.1. Medida de la relación glutathion reducido/glutathion oxidado (GSH / GSSG) en plasma

Reactivos y Materiales

- Kit GSH/GSSG-412 Bioxytech. OxisResearch Internacional S.A. Consta de:
 - Disolución de agente captador de grupos tiol, 1-metil-2-vinilpiridin trifluorometanosulfonato (M2VP) en HCl.
 - Disolución de cromógeno 5,5'-Ditiobis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB) en NaPO_4 con EDTA, en etanol.
 - Enzima Glutathion reductasa.
 - Estándares GSSG para las dos formas del glutathion.
 - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH).
 - Tampón de ensayo NaPO_4 con EDTA.
 - Tampón GSSG NaPO_4 con EDTA.
- Ácido meta-Fosfórico al 5%. Sigma.
- Espectrofotómetro UV/Vis 4300pro. Ultrospec (Cambridge, UK).
- Centrifuga 5417C. Eppendorf (Hamburg, Alemania).
- Cubetas espectrofotometría de 1mL.
- Contador Cobra Auto-Gamma. Packard. (Madrid, España).
- Material necesario para la extracción de sangre (descrito en el apartado 4.4.1. de *Material y Métodos*).

Procedimiento

Preparación de las curvas estándar

- Se prepararon y reconstituyeron todas las disoluciones necesarias y estándares a 4°C.
- Cada uno de los estándares (200 µL) se añadió a una cubeta de espectrofotometría.
- Se añadieron 200 µL de cromógeno y 200 µL de enzima en cada cubeta.
- La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Después, se añadieron 200 µL de NADPH para que tuviera lugar la reacción de reducción del GSSG a GSH.
- El incremento de absorbancia a 412 nm, se midió en el espectrofotómetro desde el momento en que se puso el NADPH en la cubeta (t = 0 min) hasta que transcurrieron 3 minutos. Las medidas de absorbancia se hicieron por duplicado.

Preparación del blanco GSSG

- El blanco se preparó con 50 µL de ácido m-fosfórico al 5% y 700 µL de tampón GSSG a 4° C.
- Se realizó el mismo protocolo para la medida de absorbancia de la curva de calibración.

Extracción de sangre y preparación de las muestras

Para la obtención de las muestras de sangre de los ratones se siguió el procedimiento descrito en el apartado 4.4.1. de *Material y Métodos*. En cada muestra de sangre se midieron de forma separada las dos formas del glutation. Para ello, las muestras de sangre se alicuotaron, de manera que en cada muestra destinada a medir glutation oxidado se añadió el reactivo M2VP, que se unió al glutation reducido para que no interfiriera en la medida del oxidado. Todas las muestras de sangre se congelaron a -80°C hasta el momento de su análisis.

Preparación de las muestras GSSG

Las muestras de sangre (con M2VP) previamente descongeladas por incubación a temperatura ambiente durante 2-10 minutos, se mezclaron durante 15-20 segundos con 290 μ L de ácido m-fosfórico al 5% y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos para obtener los plasmas de los ratones. Se tomaron 50 μ L de este sobrenadante y se pusieron en 700 μ L del tampón GSSG. Se siguió el mismo protocolo empleado en la medida de absorbancia de los estándares.

Preparación de las muestras GSH

Estas muestras de sangre igualmente descongeladas, se mezclaron en este caso con 350 μ L de ácido m-fosfórico al 5% y se centrifugaron como las anteriores. Los 50 μ L de plasma se pusieron en 3 mL del tampón de ensayo y se midió la absorbancia como en las muestras anteriores.

✍ Cálculos

A partir de la medida del incremento de absorbancia a 412 nm, se calcularon las tasas de cinética de reacción de los estándares y de las muestras (GSH y GSSG).

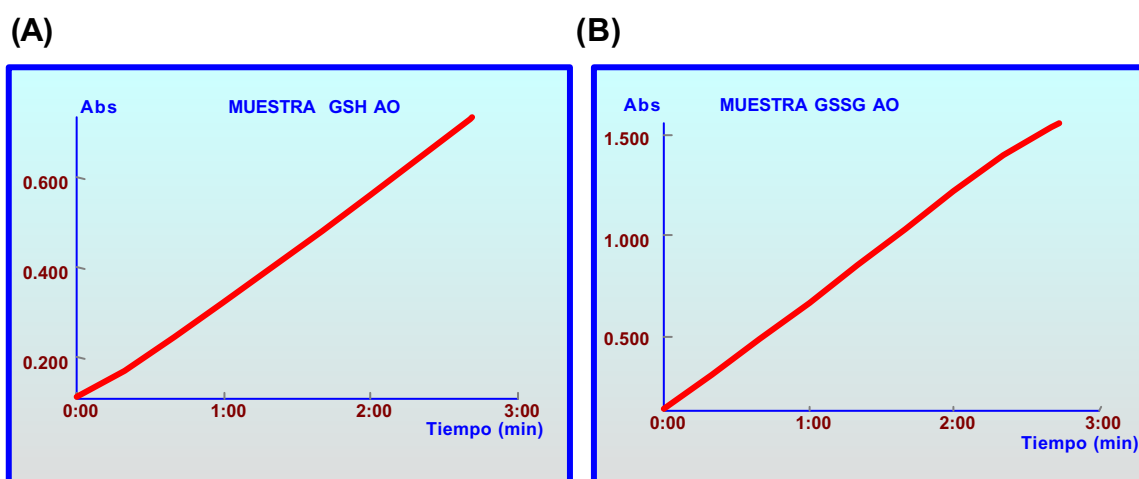
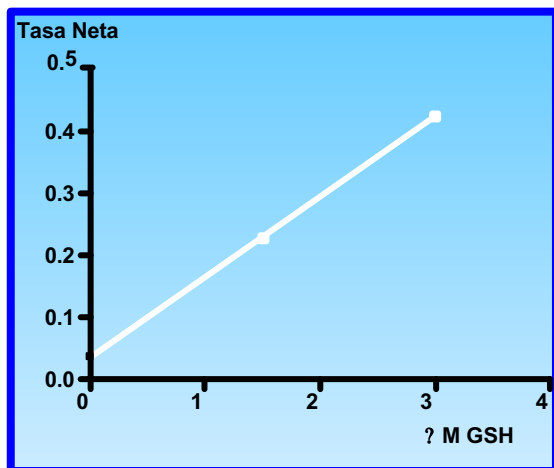


Figura 3: (A) Tasa de reacción de una muestra de plasma de ratón alimentado con 50 μ L de aceite oliva durante cuatro días. La Tasa es proporcional a la concentración de GSH. (B) Tasa de reacción de una muestra de plasma de ratón alimentado con 50 μ L de aceite oliva durante cuatro días y tratado con el reactivo M2VP. La Tasa es proporcional a la concentración de GSSG.

Las figuras representan el cambio en la absorbancia a 412 nm con el tiempo (minutos) de una muestra de plasma de ratón del grupo AO en la que se mide GSH y GSSG respectivamente. A partir de las pendientes de estas rectas se calcularon las tasas de reacción.

Las dos curvas de calibración se construyeron con las tasas netas de reacción y la concentración de cada estándar (ver figura 4). Las tasas netas calculadas para las muestras GSH y GSSG, se extrapolaron en las dos curvas patrón y se obtuvieron las concentraciones de GSH y GSSG en μ M. El ratio GSH / GSSG se calculó mediante la siguiente fórmula: $\text{Ratio} = (\text{GSH} - 2\text{GSSG}) / \text{GSSG}$.

(A)



(B)

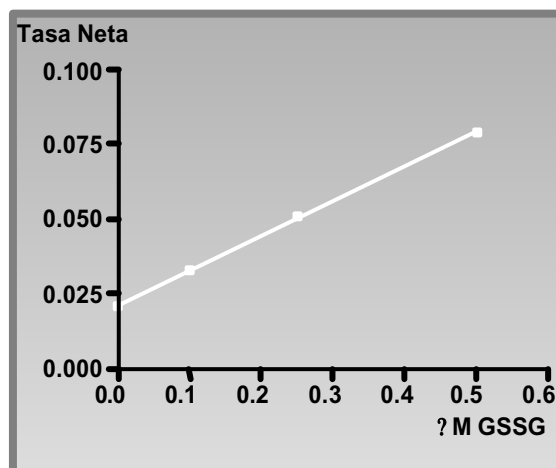


Figura 4: (A) Recta patrón para GSH. En el eje de ordenadas se representa la Tasa Neta de reacción de la enzima Glutation Reductasa, y en el eje de abscisas, la concentración de cada estándar en μmoles de GSH / L ($r^2 = 0,9999$). **(B) Recta patrón para GSSG.** En el eje de ordenadas se representa la Tasa Neta de reacción de la enzima Glutation Reductasa, y en el eje de abscisas, la concentración de cada estándar en μmoles de GSSG / L ($r^2 = 0,9994$).

4.5.2. Medida del poder antioxidante total en plasma

✍ Reactivos y Materiales

- Kit PAO Bioxytech AOP-490. Deltaclon (Oxford, Michigan) que consta de:
 - Estándar liofilizado de ácido úrico.
 - Solución de Cu^{2+} .
 - Solución de parada.
 - Tampón de dilución con el cromógeno 2,9-dimetil fenantrolina (bathocuproína).
- Espectrofotómetro μQuant . Bio-Tek. (Winooski, Vermont).
- Placas de cultivo de 96 pocillos. Sarstedt.
- Material necesario para la extracción de sangre.

Procedimiento

Preparación de la curva estándar

El estándar de ácido úrico se reconstituyó con agua milliQ y se dejó estabilizar durante 3-4 horas a temperatura ambiente. Se realizaron diluciones seriadas para obtener las distintas concentraciones de la recta patrón. Los estándares así preparados que no se iban a medir inmediatamente, se alicuotaron y congelaron a -20°C .

Extracción de sangre y preparación de las muestras de plasma

La extracción de sangre se realizó como en el apartado anterior y tras la centrifugación a 1600 rpm durante 12 minutos a 5°C , los plasmas se congelaron a -20°C . En el momento del análisis, los plasmas descongelados a 4°C se diluyeron en el tampón con el cromógeno.

Protocolo

- Se añadieron 200 μL de tampón de dilución (blanco), 200 μL de cada estándar preparado y 200 μL de cada muestra en los pocillos de la placa.
- Se midió su absorbancia a 490 nm por duplicado.
- En cada uno de los pocillos se pipetearon 50 μL de la solución con cobre y se dejó incubar durante 3 minutos para que tuviera lugar la reacción de reducción del catión Cu^{2+} a Cu^{+} .
- Se añadieron 50 μL de la solución de parada, para detener la reacción de reducción.
- La absorbancia se midió de nuevo a 490 nm por duplicado.

Cálculos

La diferencia entre las dos lecturas de absorbancia a 490 nm de cada muestra, una vez descontado el blanco, se comparó con la recta patrón y el resultado se multiplicó por un factor para expresar las medidas como $\mu\text{moles/L}$ de poder reductor del cobre.

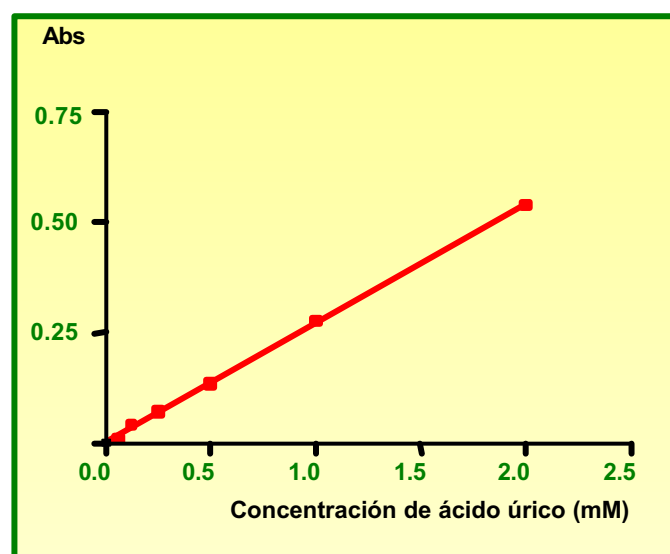


Figura 5: Curva estándar de ácido úrico ($r^2 = 0,9994$). En el eje de ordenadas se representa la diferencia de absorbancia entre las dos medidas realizadas a 490 nm para cada concentración del patrón de ácido úrico. En el eje de abcisas se representan los mmoles / L de ácido úrico de cada estándar preparado.

4.6. Secreción de insulina de los islotes de Langerhans

4.6.1. Aislamiento de islotes de Langerhans de ratón por el método de la colagenasa

Reactivos y Materiales

- Medio de aislamiento de islotes (Solución Krebs-Ringer-Bicarbonato):

NaCl, 115 mM

NaHCO₃, 10 mM

KCl, 5 mM

NaH₂PO₄, 2 mM

MgCl₂, 1.1 mM

Hepes ácido, 25 mM

CaCl₂, 2.56 mM

Glucosa, 5.6 mM

Albúmina Sérica Bovina fracción V. Roche Diagnostic Corporation (Barcelona, España). Se preparó al 1%.

La solución se ajustó a pH 7,4 con NaOH 1M. Se mantuvo el pH mediante gaseado continuo con carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂) y se empleó a 4° C.

- Baño termostático P-Selecta.
- Centrífuga P-Selecta.
- Cloruro sódico al 9%.
- Colagenasa tipo A fracción V. Sigma. Actividad = 529,418 U/mg de proteína liofilizada.
- Fuente de luz de fibra óptica KL1500. Schott (Doncaster, Reino Unido).
- Lupa estereoscópica SZ60 45TR. Olympus (Hamburg, Alemania).
- Material quirúrgico. Aesculap AG.

Procedimiento

Los ratones de los tres grupos se sacrificaron mediante fractura cervical. A continuación se practicó una laparotomía media completa, abatiendo la pared abdominal gracias a dos secciones horizontales inmediatamente por debajo de los rebordes costales inferiores, se traccionó el hígado y se fijó a la pared costal mediante una gasa, de tal forma que quedó expuesta la vesícula biliar y la porción proximal del conducto biliar común. Se humedeció la cavidad con solución salina cada vez que era necesario.

Se ligó la desembocadura del conducto pancreático principal a nivel de la ampolla de Water, para evitar la salida de la solución con colagenasa al duodeno. Se traccionó el duodeno con el fin de localizar la porción distal del conducto biliar común, a unos dos o tres milímetros por debajo de la vesícula biliar, por donde se introdujo una aguja de insulina, previamente doblada en ángulo recto y con su punta suavizada. Después se pasó una ligadura para fijar la aguja a su posición.

Se inyectaron en el páncreas, mediante una jeringa, 8 mL de medio de aislamiento a 4°C con 8 mg de colagenasa. Esta técnica permitió un buen acceso de la enzima a todo el páncreas para su posterior digestión, como se observa en la figura 6.

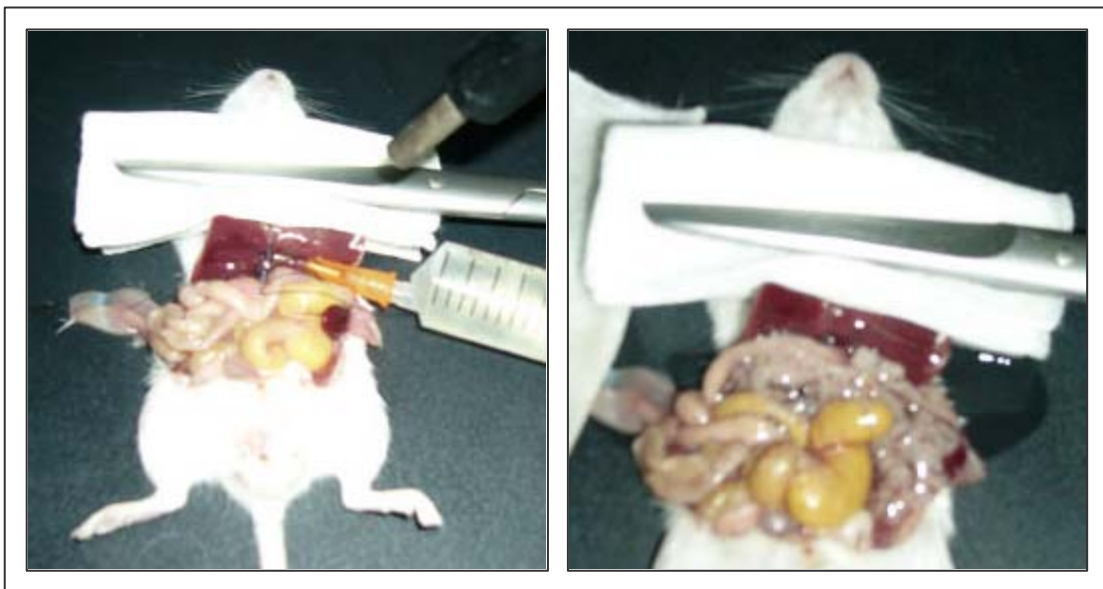


Figura 6: Extracción del páncreas de ratón por el método de la colagenasa. La figura muestra la inyección de la solución de colagenasa a nivel del conducto biliar. El hinchamiento del páncreas permite retirarlo de la cavidad abdominal.

El páncreas se extrajo de la cavidad abdominal por disección, se transfirió a un tubo de 15 mL y se sumergió en el baño a 37° C durante 10 minutos. La digestión se detuvo añadiendo 10 mL de medio de aislamiento a 4° C. Seguidamente se centrifugó a 1000 rpm durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y con otros 10 mL de medio de aislamiento, se resuspendió el precipitado. Esta operación de lavado se realizó tres veces, agitando el digerido cada vez con una pipeta para disgregarlo.

El último lavado se trasladó a una placa Petri de fondo negro, en la cual se recuperaron los islotes, uno a uno, mediante succión con pipeta automática bajo lupa, con la finalidad de lavar bien los islotes de los restos de tejido exocrino.

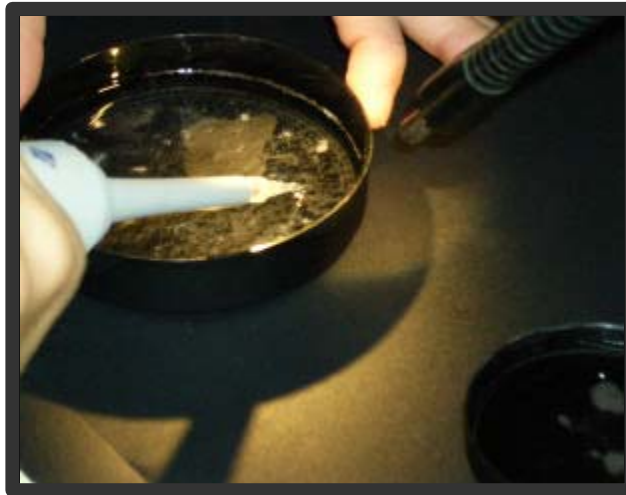


Figura 7: Aislamiento y lavado de islotes pancreáticos de ratón.

Finalmente, una vez seleccionados todos los islotes, se pusieron en medio de aislamiento, a 37°C y se gasearon con 95% de O₂ y 5% de CO₂ durante 30 minutos.

4.6.2. Experimentos de secreción

A. Cultivo de islotes con peróxido de Hidrógeno

✍ Reactivos y Materiales

- Medio de cultivo de islotes:

RPMI 1640. Sigma.

Suero Bovino Fetal (FBS) al 10%.

L-Glutamina 2 mM.

Glucosa 5,6 mM.

Antibióticos: Penicilina (100 UI/mL) y Estreptomina (0,1 mg/mL). Sigma.

La solución se ajustó a pH 7,4 con NaOH 1M.

- Solución stock de Peróxido de Hidrógeno 50mM (Preparada a partir de H₂O₂ 30%). Sigma.
- Placas de Petri de 100x20mm. Sarstedt (Barcelona, España).
- Placas de Petri de 60x15mm. Corning (New York, NY).
- Incubador Galaxy RS 232. Biotech (Madrid, España).

Procedimiento

Una vez limpios y aislados los islotes de ratón, se dejaron recuperar en medio de aislamiento durante 30 minutos a 37°C, gaseándolos con 95% de O₂ y 5% de CO₂ (incubador). A continuación, se pusieron en placas Petri con 1,5 mL de medio de cultivo y se hicieron dos grupos, la mitad de ellos se mantuvieron sólo con medio de cultivo y la otra mitad, se incubaron con una concentración de 10 µM de peróxido de Hidrógeno. En estas condiciones, los dos grupos de islotes se dejaron en el incubador durante 30 minutos.

B. Incubaciones estáticas

Reactivos y Materiales

- Medio de secreción de islotes:

NaCl, 120 mM

NaHCO₃, 25 mM

KCl, 5 mM

MgCl₂, 1 mM

CaCl₂, 2.56 mM

La solución se ajustó a pH 7,4 con NaOH 1M. Se mantuvo el pH mediante gaseado continuo con carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂).

- Placas de cultivo de 24 pocillos. Sarstedt.
- Tubos de vidrio de 12x75mm. Trimex (Barcelona, España).

Procedimiento

Después de la incubación, los islotes se lavaron tres veces con medio de aislamiento a 4° C, para eliminar totalmente el agente oxidante, y se colocaron en las placas multipocillo, en grupos de tres ó cuatro islotes por pocillo. En cada pocillo se añadieron 300 µL de medio de secreción con glucosa a 4° C, de manera que, en diez pocillos, la concentración de glucosa fue de 3 mM (basal), y en otros diez, la concentración fue de 22 mM glucosa (máxima estimuladora). Seguidamente, se incubaron con carbógeno a 37° C durante una hora. Pasado este tiempo, se recogieron los sobrenadantes y se congelaron en tubos de vidrio a -20° C, hasta el posterior análisis de la insulina secretada por los dos grupos de islotes (no tratados y tratados con peróxido de hidrógeno).

4.6.3. Radioinmunoanálisis de insulina

La técnica del radioinmunoanálisis (RIA) fue introducida originalmente por Yalow y Berson en 1960 para medir la insulina plasmática; actualmente se emplea para determinar cantidades mínimas de ésta y otras hormonas, así como de enzimas y drogas.

El RIA consiste en la medición de la concentración de una sustancia en una muestra mediante la comparación de su reactividad inmunoquímica con la de una serie de soluciones estándar que contienen concentraciones conocidas de la sustancia problema.

Reactivos y Materiales

Contador Cobra Auto-Gamma. Packard. (Madrid, España).

Kit de Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA), con las siguientes características:

- El Anticuerpo anti-insulina que recubre los tubos de ensayo de 12x75 mm, está obtenido de cobaya y es frente a insulina de cerdo.
- La insulina marcada con ^{125}I está obtenida de cerdo y es monoiodada.
- Los patrones son de insulina humana y la concentración de cada uno de ellos varía dependiendo del lote.
- El uso de estándares comerciales y el hecho de que el anticuerpo viene adherido a los tubos, aumenta la efectividad del método al eliminar posibles factores de variabilidad. Con este método se impide la pérdida del complejo anticuerpo-insulina durante la decantación, las concentraciones de los estándares son las exactas y la concentración de anticuerpo en cada tubo es exactamente la misma.

Procedimiento

1. En los tubos revestidos con anticuerpo anti-insulina se añadieron 200 μL de cada estándar por duplicado. Las concentraciones de insulina de los estándares empleados para preparar la curva de calibración fueron las siguientes: 0 ng/mL, 0.26 ng/mL, 0.64 ng/mL, 2.24 ng/mL, 4.2 ng/mL, 8.52 ng/mL y 17.52 ng/mL de insulina.
2. Se añadieron 200 μL de estándar con 17,52 ng insulina / mL a otro tubo revestido con anticuerpo anti-insulina, destinado a medir el marcaje inespecífico.

3. En el tubo de cuentas totales sólo se pipeteó 1 mL de insulina marcada con ^{125}I , que representa la unión de toda la insulina marcada al anticuerpo. Su medida dio el máximo de cuentas por minuto y permitió conocer la efectividad de la insulina marcada.
4. Las muestras descongeladas a 4° C se pipetearon (200 μL) también en tubos revestidos con anticuerpo anti-insulina. La insulina de las muestras formó, en este paso, un complejo con el anticuerpo anti-insulina.
5. La insulina marcada con ^{125}I (1 mL) se puso en todos los tubos con muestra y con estándares, excepto en el tubo de marcaje inespecífico. Así, la insulina marcada compitió por el anticuerpo con la insulina de la muestra ó del estándar.
6. Todos los tubos se agitaron para homogeneizar las soluciones de insulina y se mantuvieron a 4° C durante 24 horas.
7. Transcurrido este tiempo, se decantaron todos los tubos, excepto el de cuentas totales, y se dejaron secar durante 3 horas. La solución con la insulina radioactiva que no formó complejo con el anticuerpo fue desechada por decantación, mientras que los complejos anticuerpo-insulina quedaron adheridos al tubo.
8. La radioactividad de cada tubo se midió en un contador gamma, durante 1 minuto en cada tubo.

✍ Cálculos

Para cada uno de los experimentos se realizó una curva estándar y su ajuste exponencial correspondiente. La lectura en cuentas por minuto obtenida de cada muestra, que corresponde a la secreción de 3 ó 4 islotes, se extrapoló a la curva estándar resultante. Para calcular la concentración de insulina de las muestras, se tuvo en cuenta el número de islotes por pocillo y se consideraron 0,8 μg de proteína por islote, que es el valor medio del contenido de proteínas obtenido en nuestros islotes por el método de Bradford. Los resultados se expresaron como ng insulina/ μg proteína y como ng insulina/mL. A continuación se muestra un ejemplo de curva estándar obtenida con el kit de radioinmunoensayo (Figura 8).

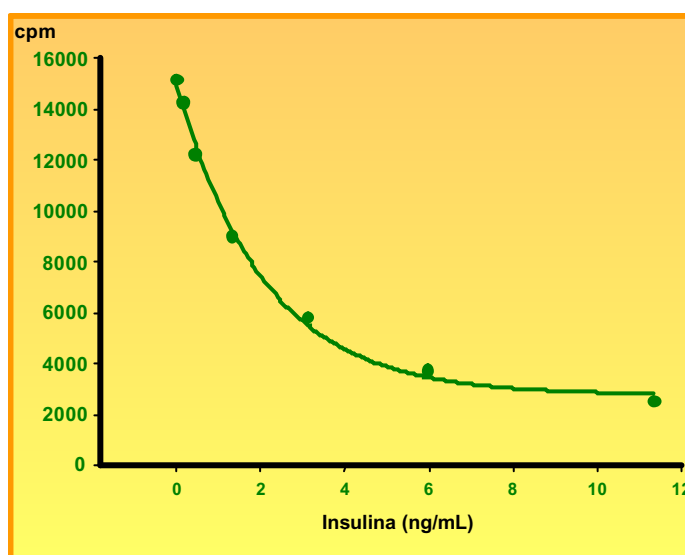


Figura 8: Curva estándar de la técnica del radioinmunoanálisis. Se representa en el eje de ordenadas el número de cuentas por minuto (cpm) obtenidas por el contador gamma y en el eje de abscisas la concentración de insulina (ng/mL) de cada uno de los valores de la curva patrón. La curva se obtiene por ajuste exponencial, con una r^2 de 0,9963. Cuanto mayor es la radiactividad medida, menor es el contenido de insulina de la muestra.

4.7. Medida de la peroxidación lipídica de las membranas celulares en islotes de Langerhans y en hígado

Reactivos y materiales

- Reactivos y material necesarios para el aislamiento de islotes de Langerhans (Apartado 4.6.1. de *Material y Métodos*)
- Tampón de lisis: Tris-HCl 1 M; EDTA 0,2 M; EGTA 0,1 M.
- Enzimas inhibidores de proteasas: PMSF 100 mM ; Leupeptina 1 mM; Pepstatina 1 mg/mL y Aprotinina 100 mg/mL. Sigma.
- Solución Bradford:

Solución A: Azul Brillante Coomassie al 0,01% en etanol 95%.

Ácido orto-fosfórico al 85%.

Agua destilada.

La solución recién preparada se mantuvo en agitación durante 12 horas y después se filtró. Debe almacenarse en oscuridad.

- 1,1,3,3,- Tetrametoxipropano. Aldrich. El patrón estándar se preparó en una disolución madre de 10 mM.
- Acetonitrilo para análisis ACS. Scharlau.
- Ácido clorhídrico fumante al 37%. Merck.

- Albúmina Sérica Bovina fracción V. Roche.
- Centrífuga 5417C. Eppendorf (Hamburg, Alemania).
- Cubetas espectrofotometría de 1mL.
- Espectrofotómetro SmartSpec 3000. Bio-Rad (Madrid, España).
- Espectrofotómetro UV/Vis 4300pro. Ultrospec.
- Malonil dialdehído tetrabutilamonio. Fluka.
- Metanol para análisis ACS. Merck (Barcelona, España).
- N-Metilo-2-fenilindol. Aldrich. Se preparó una disolución con una concentración de 10,3 mM en acetonitrilo (Reactivo 1). Este reactivo 1 se diluyó con metanol en la proporción 3:1.

Procedimiento

Preparación del homogeneizado

La medida de la oxidación de las membranas celulares se realizó en islotes de Langerhans y en hígado mediante cuantificación del malonil dialdehído (MDA) generado tras la incubación con un agente oxidante. Los islotes de ratón se aislaron, se recuperaron en el incubador en medio de aislamiento durante 30 minutos y a continuación se incubaron 30 minutos con 10 μ M de peróxido de Hidrógeno (apartado 4.6.2. de *Material y Métodos*). Se procedió de igual forma con 50 mg de hígado disgregado. Todas las muestras se hicieron por duplicado.

Inmediatamente después, los islotes y el hígado se lavaron, se sonicaron a 4° C con tampón de lisis e inhibidores de proteasas y se centrifugaron durante 15 minutos a 15000 rpm y 4° C para obtener los sobrenadantes.

Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas se preparó una curva patrón con 0, 5, 10, 15 y 20 µg/ml de albúmina en 1 mL de solución Bradford y pasados 5 min, se midió su absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro.

De cada uno de los sobrenadantes de las muestras se tomó una alícuota y se midió la absorbancia en 1 mL de solución Bradford, de igual forma que la curva de calibración. La concentración de proteínas por islote y la concentración de proteínas de cada extracto de hígado se calculó por extrapolación con la curva patrón en µg/µL.

Medida de la peroxidación lipídica

Se tomaron dos alícuotas de 200 µL de cada sobrenadante y se les añadieron 650 µL del reactivo 1 diluído con metanol. Posteriormente, se les añadieron 150 µL de ácido clorhídrico al 37% y la mezcla se incubó a 45° C durante 60 minutos. El medio ácido precipita las proteínas que pueden unirse al malonil dialdehído e interferir en la medida. La reacción fue detenida colocando las muestras en hielo y se midió la absorbancia por duplicado en el espectrofotómetro a 586 nm.

Preparación de la curva patrón

Esta técnica se basa en la reacción del N-metilo-2-fenilindol con el MDA a una determinada temperatura. Para determinar la concentración de MDA en las muestras de hígado e islotes, se preparó una curva de calibración, empleando como estándar el 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP) entre las concentraciones 0 a 20 μM . El medio ácido (tampón Tris-HCl) favorece la hidrólisis del patrón hacia MDA.

Las curvas se prepararon por separado siguiendo el procedimiento descrito para las muestras. Los valores medios de absorbancia obtenidos de cada muestra se extrapolaron a la gráfica y teniendo en cuenta la concentración de proteína en cada muestra, se expresaron los resultados como μM de MDA / mg de proteína.

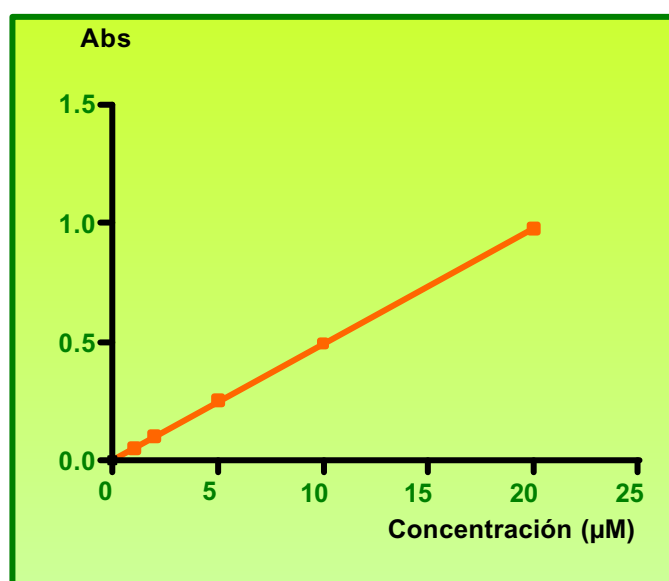


Figura 9: Curva de calibración para MDA. Se representa la absorbancia medida a 586 nm para cada concentración del patrón 1,1,3,3-TMP en $\mu\text{moles} / \text{L}$ ($r^2 = 0,9999$). Un volumen de 200 μL de cada disolución del estándar se incubó con HCl a 45°C durante 60 minutos.

4.8. Medida de la expresión de enzimas antioxidantes

4.8.1. Extracción de RNA de islotes de Langerhans

Para la extracción del RNA de los islotes de Langerhans, se siguió el protocolo de aislamiento de ácidos nucleicos de Tripure de Roche Diagnostics (Barcelona, España).

Reactivos y material

- Agua destilada libre de enzimas RNasas y estéril (Agua DEPC).
- Centrifuga 5417C. Eppendorf (Hamburg, Alemania).
- Cloroformo, Merck.
- Espectrofotómetro SmartSpec 3000. Bio-Rad.
- Etanol al 75%, Panreac.
- Isopropanol, Scharlau.
- Reactivo de aislamiento de ácidos nucleicos Tripure Roche Diagnostics.
- Tampón fosfato salino (PBS). Gibco (Paisley, UK).
- Reactivos y material necesarios para el aislamiento de islotes de Langerhans

Procedimiento

1. Para la extracción de RNA se aislaron 200-300 islotes del páncreas de ratón por el método de la colagenasa y se lavaron tres veces con medio de aislamiento a 4° C para eliminar los restos de tejido exocrino. A continuación, los islotes se lavaron con tampón fosfato salino estéril, se

- centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, y tras decantar el sobrenadante, los islotes se congelaron en nitrógeno líquido (a -180°C).
2. Pasados 20-30 minutos, los islotes se descongelaron y se les añadió 1 mL del reactivo de aislamiento de ácidos nucleicos (Tripure), repipeteando para homogeneizarlos bien y lisarlos. Se incubaron con este reactivo durante 5 minutos a temperatura ambiente.
 3. A continuación, se añadieron 200 μL de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos para extraer el RNA de la muestra. Se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
 4. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C para separar 3 fases: La fase inferior (Tripure) contiene las proteínas, la fase intermedia, el DNA y la fase superior (cloroformo) con el RNA. Se recogió la fase superior y se pasó a un tubo estéril.
 5. Para precipitar el RNA, esta fase se mezcló con 500 μL de isopropanol (a -20°C) y se incubó durante 8 minutos. Seguidamente se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante.
 6. El residuo de RNA se lavó con etanol al 75% (a -20°C). Seguidamente, se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante, dejando que el residuo se secase a temperatura ambiente durante 8 minutos.
 7. Una vez seco, se resuspendió en 15 μL de agua DEPC, y tras incubar la solución 12 minutos a 55°C , se procedió a medir la concentración de RNA.
 8. Para cuantificar el RNA del extracto obtenido de los islotes, se midió su absorbancia a $\lambda=260\text{ nm}$, empleando como blanco el reactivo TNT a 4°C . Se realizaron las diluciones necesarias para que las muestras se encontraran en un rango de absorbancia entre 0,2 y 0,8 (linealidad). Los resultados se expresaron en μg de RNA / μL .

4.8.2. Reacción de retrotranscripción: Obtención de cDNA

Tanto para la obtención de DNA complementario a partir del RNA extraído anteriormente, como para la reacción de la polimerasa en cadena, se siguió el protocolo de expresión génica de “TaqMan Assays-on-Demand” de Applied Biosystems (Foster City, CA).

Reactivos y material

Los reactivos para la transcripción inversa de Taqman son los siguientes:

- Disolución del RNA (2µg de muestra) en agua destilada libre de RNasas y estéril (Agua DEPC).
- Enzima Retrotranscriptasa (RT) 50 U/µL.
- Inhibidor de RNasa (20 U/µL).
- Oligonucleótidos (Hexámeros) (50 µM).
- Solución de Cloruro de Magnesio (25 mM).
- Solución de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 2.5 mM/cada uno.
- Tampón para la enzima RT (500 mM KCl, 10 mM Tris-HCL).
- Termociclador Mastercycler. Eppendorf (Hamburg, Alemania).

Procedimiento

El volumen de la reacción de retrotranscripción puede variar entre 10 µL y 100 µL. La máxima eficacia de la reacción convierte en cDNA 2 µg de RNA total en un volumen final de reacción de 100 µL. Para llevar a cabo esta primera reacción, se preparó una disolución de RNA en agua DEPC y se le añadió una mezcla madre con todos los reactivos.

Componentes	Vol (μL)/reacción	Concentración final
Agua libre de Rnasa+RNA (2 μg)	38,5	0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Tampón para la enzima RT (10X)	10	1X
Solución de Cloruro de Magnesio (25 mM)	22	5,5 mM
Solución de dNTPs 2.5 mM/cada	20	500 μM por dNTP
Hexámeros (50 μM)	5	2,5 μM
Inhibidor de RNasa (20 U/ μL)	2	0,4 U/ μL
Enzima Retrotranscriptasa (RT) 50 U/ μL	2,5	1,25 U/ μL
Volumen final	100	

El programa de temperaturas del termociclador fue el siguiente:

Etapas	Incubación	RT	Inactivación
Temperatura	25°C	48°C	95°C
Tiempo	10 min	30 min	5 min
Volumen	100 μL		

Las muestras de cDNA así obtenidas se congelaron a -20 °C hasta realizar la reacción de PCR.

4.8.3. Reacción de amplificación

Reactivos y material

Para una reacción óptima de amplificación utilizando este kit, se necesita de 1 a 100 ng de RNA convertido a cDNA, en un volumen total de reacción de 50 μ L.

En una placa de reacción de 96 pocillos para lectura óptica (Applied Biosystems) se pipetearon las muestras de cDNA con una mezcla madre, que contenía: la enzima Taq polimerasa I termoestable, los dNTPs, cloruro magnésico como cofactor, la sonda fluorogénica TaqMan MGB etiquetada con fluorescencia 6FAMTM (6-carboxi-fluoresceína) y los cebadores que van a hibridar con el DNA.

Componentes	Vol (μ L)/reacción
Mezcla de cebador y sonda (20X)	1
cDNA (50 ng de RNA convertido a cDNA)	9 (5 cDNA + 4 Agua)
Mezcla madre de Taqman (2X)	10
Volumen final	20

La mezcla de cebadores y sonda está compuesta por:

- Sonda fluorogénica de Taqman (Fluorogenic Probe).
- Dos cebadores para las tres enzimas antioxidantes objeto de estudio:

Catalasa: Mn 00437992_m1.

Glutation peroxidasa 1: Mm 00656767_g1.

Superóxido dismutasa 2: Mm 00449726_m1.

Estos cebadores se obtuvieron de la base de datos de Applied Biosystems(http://myscience.appliedbiosystems.com/cdsEntry/Form/gene_expression_keyword.jsp).

Procedimiento

La PCR cuantitativa permite amplificar de forma exponencial un fragmento de una molécula de DNA, de manera que se mide el aumento de fluorescencia generado por una sonda específica fluorescente que se une al DNA que va hibridando. Esto permite cuantificar el incremento de producto en cada ciclo, porque se va obteniendo una lectura a tiempo real. El termociclador empleado para la reacción fue Abi Prism 7700 Sequence Detector de Applied Biosystems y el programa de temperaturas seguido el siguiente:

Etapas	Activación AmpErase UNG	Activación AmpliTaq Gold	PCR	
	1 ciclo	1 ciclo	40 ciclos	
		Desnaturalización	Hibridación/extensión	
Tiempo	2 min	10 min	15 seg	1 min
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C

La expresión génica de las enzimas estudiadas se cuantificó comparando con dos endógenos, Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y fosfoglicerato kinasa (PGK-1) (cuantificación relativa).

Se obtuvieron las gráficas sigmoidales correspondientes en las que se señala un nivel umbral a partir del cual comienza la fase de crecimiento (Figuras 10 y 11).

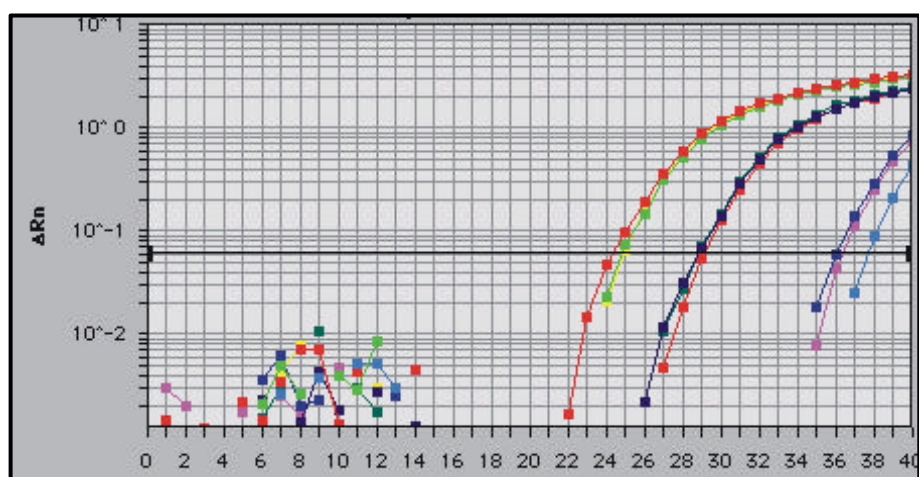


Figura 10: PCR a tiempo real del endógeno (PGK-1) para los tres grupos de ratones.

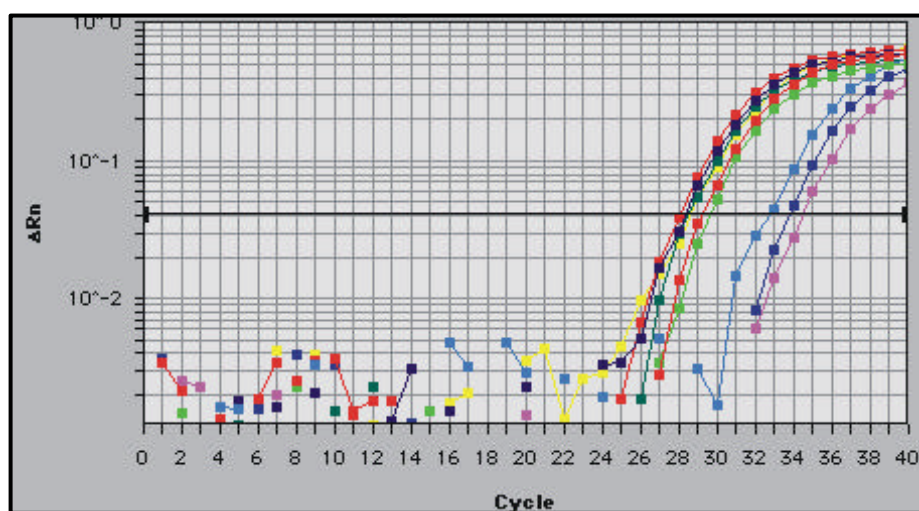


Figura 11: PCR a tiempo real de muestras de RNA_m obtenido de islotes pancreáticos de los tres grupos de ratones para la enzima catalasa.

4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Microsoft Window XP de Microsoft Corporation.
- Microsoft Office XP Professional con Front Page.
- GraphPad Inplot 4.0 de GraphPad Software Corporation.
- Sigmaplot 4.0 de SPSS.

Los resultados se expresaron como media y error estándar de la media ($X \pm SEM$). En cada caso, el número de experimentos realizados, se representa como "n". Para el análisis estadístico se empleó el test de la "t de Student" de doble cola. Se han considerado significativamente diferentes los datos obtenidos con una p igual ó menor a 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Niveles de hidroxitirosol en plasma

El aceite de oliva virgen extra objeto de estudio presenta un elevado contenido en compuestos fenólicos, y en concreto, en hidroxitirosol, considerado uno de los polifenoles más antioxidantes.

Con el objetivo de comprobar si una ingesta moderada de este aceite rico en polifenoles podría elevar los niveles de hidroxitirosol (HT) en plasma, se realizó un estudio en ratones, divididos en tres grupos según su alimentación (ver apartado 4.1. de *Material y Métodos*). Los ratones de los grupos AO y AG se alimentaron con dosis de 50 y 100 μL de aceite, equivalentes a un consumo diario de aceite en el hombre de aproximadamente 85 y 175 mL. El suplemento de aceite se mantuvo entre tres y cinco días, y las muestras de plasma se obtuvieron un día después de terminar con el suplemento de aceite. La medida de la concentración de HT en el plasma de los tres grupos de ratones se realizó por cromatografía líquida (HPLC).

La separación y cuantificación del HT en los plasmas analizados permitió comprobar que con dosis de 50 μL de aceite se alcanzaba el nivel máximo de este compuesto en el plasma, tanto para el grupo alimentado con el aceite de oliva estudiado (AO) como para el alimentado con aceite de girasol (AG). A partir del tercer día de alimentación extra con ambos tipos de aceite, se alcanzó el nivel máximo en plasma de HT.

La concentración de HT en el grupo AO alimentado con 100 μL durante tres días fue de $395,44 \pm 45,62$ ng/mL (n=4), similar a la encontrada con dosis de 50 μL durante cuatro días ($330,09 \pm 79,48$; n=3). En el grupo AG los niveles alcanzados con 50 μL de aceite durante cuatro días, fueron de $209,42 \pm 1,79$

ng/mL (n=3), muy próximos a los encontrados cuando esta dosis se mantuvo un día más ($216,47 \pm 8,54$; n=4).

A la vista de estos resultados, se decidió continuar el estudio con dosis diarias de 50 μ L de aceite durante cuatro días, para ambos grupos.

En el grupo de ratones control (n=6) la concentración de HT encontrada en el plasma fue de $32,5 \pm 10,3$ ng/mL. Los aceites aportados en la dieta de forma adicional elevaron de un modo significativo los niveles de HT en plasma ($p < 0,001$ vs CTL). En el grupo AO la concentración de HT fue diez veces superior a la del control.

Como puede verse en la figura 1, en el grupo alimentado con el aceite de oliva virgen extra estudiado (n=12) aumentó de forma significativa el HT plasmático, con respecto al grupo alimentado con aceite de girasol (n=10; $p < 0,001$). Los niveles máximos de HT plasmático se alcanzaron en el grupo AO ($354,8 \pm 28,8$ ng/mL), mientras que en el grupo AG este valor fue de $187,1 \pm 14,8$ ng/mL.

Estos resultados muestran que un consumo diario de aceite elevaría el nivel del antioxidante HT en el plasma, de manera que con este aceite de oliva virgen extra, su concentración en plasma llega a ser 1,9 veces superior a la alcanzada cuando el aceite es de girasol.

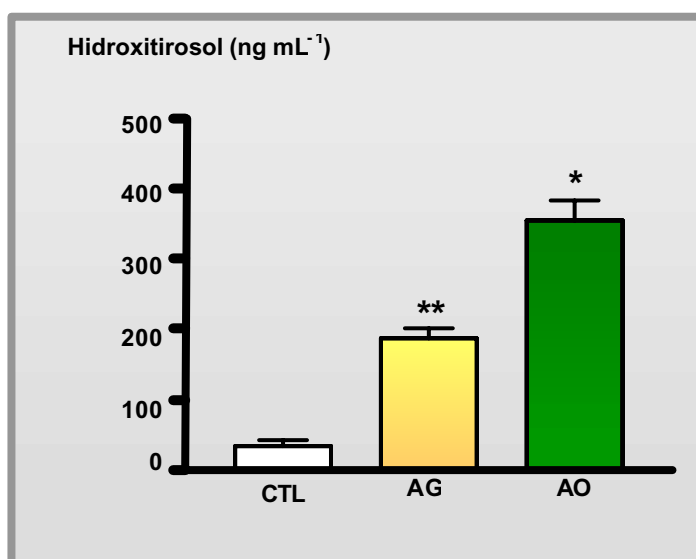


Figura 1: Niveles de hidroxitirosol en plasma. Se representa la concentración plasmática de hidroxitirosol (ng/mL) de los tres grupos de ratones: a) Grupo de ratones controles (CTL; n= 6); b) Grupo de ratones alimentados con 50 μ L de aceite de girasol durante cuatro días (AG; n= 10); c) Grupo de ratones alimentados con 50 μ L de aceite de oliva durante cuatro días (AO; n= 12). * p < 0,001 vs AG. ** p < 0,001 vs CTL.

El poder antioxidante del aceite de oliva probablemente se deba a la combinación de unos niveles altos de ácido oleico y escualeno, junto con una variedad de antioxidantes presentes en él, particularmente compuestos fenólicos simples (hidroxitirosol y tirosol), secoiridoides (derivados de la oleuropeína), lignanos y vitamina E.

La absorción de un compuesto tras la ingestión de un alimento se considera requisito indispensable para poder establecer una relación causa-efecto entre los polifenoles presentes en los alimentos y sus efectos biológicos asociados con la prevención de enfermedades (Fitó, 2003). Los mecanismos de absorción, biodisponibilidad y distribución en los tejidos humanos del OHTyr están siendo estudiados en la actualidad por múltiples autores.

La falta de información en este sentido se debe no sólo a la dificultad para desarrollar métodos sensitivos para identificar y cuantificar el OHTyr en sangre ó plasma, sino también a la formación de metabolitos.

Estudios de biodisponibilidad llevados a cabo en animales y humanos muestran que la absorción de los compuestos polifenólicos del aceite de oliva es del orden del 55-60% (Vissers *et al.*, 2004). Ruiz-Gutiérrez *et al.* (2000) identificaron el hidroxitirosol en el plasma de ratas a las que habían suplementado con tirosol y Visioli *et al.*, (2001) encontraron que la capacidad antioxidante del plasma aumentaba 4 horas después de la administración de una dosis única de alpechín a ratas de laboratorio, con un estado antioxidativo/oxidativo favorable a los 4 días de la ingesta.

Los estudios con ratas que reciben soluciones orales de OE (Del Boccio *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2003) demuestran que este compuesto se absorbe y se convierte enzimáticamente en OHTyr, con propiedades antioxidantes. Los datos publicados muestran que el OHTyr mantiene sus actividades antioxidantes tras la ingestión (Visioli *et al.*, 2001, 2003; Wiseman *et al.*, 2002). De acuerdo con trabajos previos (Tuck *et al.*, 2001), parece que el OHTyr es metabolizado, distribuído y eliminado sin sufrir cambios, como monosulfato y en la forma conjugada de 3-*o*-Glucurónido.

En humanos, varios estudios han demostrado la biodisponibilidad de los polifenoles del aceite de oliva después de una dieta suplementada (Visioli *et al.*, 2000; Miró-Casas *et al.*, 2001a, 2001b; Vissers *et al.*, 2002; Fitó, 2003). Estos autores encontraron que las concentraciones urinarias de tirosol e hidroxitirosol aumentaban, alcanzando un pico máximo a las 4 horas de la administración de 50 mL de aceite de oliva virgen, y recobraban sus valores basales 12 horas después de su ingestión.

Estos dos polifenoles aumentaban su concentración en orina claramente debido a la ingesta de aceite de oliva virgen, pero no fue posible eliminar completamente la concentración basal del grupo control en la orina.

Estos resultados sugieren que el glucósido de la OE no es la única fuente de OHTyr tras la ingesta de aceite de oliva virgen y que no está claro el papel de los microorganismos intestinales en la hidrólisis de los conjugados. Miró-Casas *et al.* (2002) y Fitó (2003) establecieron así que ambos compuestos son biodisponibles en humanos y que sus formas conjugadas en orina se pueden considerar marcadores de una dieta rica en polifenoles. Asimismo, aún no se conoce hasta que punto se producen pérdidas en heces, destrucción en intestino, depósitos en órganos (efecto biológico) ó células sanguíneas.

Más recientemente, Visioli *et al.* (2003) administraron soluciones de polifenoles vía oral, empleando distintos vehículos. Este trabajo pone de manifiesto que la absorción de OHTyr es mucho mayor cuando el vehículo es lo más similar posible a la matriz natural, de manera que la biodisponibilidad de este fenol añadido a un aceite refinado u otro posible “alimento funcional”, es mucho menor que cuando se administra directamente aceite de oliva virgen extra.

El aceite suministrado por estos autores, contenía aproximadamente 19 mg/Kg de OHTyr libre y cada rata recibió 500 µL diarios, que suponen 9,5 µg de OHTyr por dosis. Teniendo en cuenta las diferencias de peso con los ratones de nuestro estudio, esta dosis de OHTyr (1,35 µg) sería aproximadamente el doble de la que se administró diariamente en nuestros ensayos, que fue de 0,5 µg de OHTyr. La mayoría de los estudios de biodisponibilidad suelen realizarse con cantidades de polifenoles superiores a las usuales en la dieta.

La bibliografía recoge numerosos estudios sobre la BD y concentración en sangre de las catequinas tras la administración a humanos de extractos de té (Serafini *et al.*, 1996 ; Sung *et al.*, 2000; Higdon *et al.*, 2003). Del mismo modo, en los últimos años se han publicado trabajos más novedosos (Richelle *et al.*, 1999; Rein *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Halliwell *et al.*, 2003; Janice *et al.*, 2003; Serafini *et al.*, 2003a) sobre el consumo de chocolate y los niveles en plasma de ciertos flavonoides que mejoran la capacidad antioxidante.

Sin embargo, no existen datos sobre las concentraciones de compuestos fenólicos que se pueden alcanzar en el plasma tras la ingesta de aceite de oliva. Los estudios que existen hacen referencia a estimaciones y cálculos en los que se sugiere que una ingesta diaria de 50 g de un aceite de oliva virgen con 40 mg/kg de OHTyr aportarían 2 mg diarios de este fenol. Esto supondría una elevación plasmática de compuestos con actividad antioxidante de aproximadamente 0,06 μM (Vissers *et al.*, 2002). El aceite empleado en nuestro estudio, en humanos (85 mL de dosis) aportaría aproximadamente 0,85 mg de OHTyr diarios.

En nuestro trabajo medimos los incrementos de los niveles plasmáticos de hidroxitirosol en respuesta a una ingesta media de 50 μL de aceite de oliva. Mostramos que una ingesta media de 0,5 μg de hidroxitirosol produce una elevación de los niveles plasmáticos del orden de 10 veces superior a una situación de ausencia de ingesta de aceite, moviéndonos en este sentido en unos valores plasmáticos del orden de 0,2 - 0,3 $\mu\text{g/mL}$.

Además, comprobamos que ingestas superiores a 100 μL no producen aumentos significativos de los niveles plasmáticos de hidroxitirosol. Aunque se ha señalado que el tirosol y el hidroxitirosol se absorben en mamíferos de una manera dosis dependiente (Visioli *et al.*, 2001; Covas *et al.* 2003), nosotros comprobamos que a partir de ciertos niveles, probablemente el efecto dosis dependiente desaparezca. Finalmente, con una ingesta de 3 días es suficiente para alcanzar los valores mencionados.

Los estudios de biodisponibilidad en humanos son contradictorios. Probablemente la concentración total de fenoles en plasma se debe en parte a la presencia de metabolitos formados en los tejidos del organismo ó por la flora colónica (Scalbert *et al.*, 2000). Los factores bioquímicos que afectan a la BD de los polifenoles y que dan lugar a resultados a veces contradictorios, podrían ser:

- La absorción intestinal, que depende de muchos factores, como el pH ó la estructura del polifenol y se puede ver modificada si el compuesto está glicosilado.

- Las reacciones metabólicas que sufren de las formas libres ó agliconas en intestino, hígado ó riñón. Estas reacciones de metilación, sulfatación, ó combinación con otros compuestos, como glucurónido están mediadas por enzimas del metabolismo.
- La formación de metabolitos por la flora intestinal. Las concentraciones plasmáticas de los polifenoles “intactos” son con frecuencia bajas y a veces no van de acuerdo con el aumento de la capacidad antioxidante que producen. Hay que destacar que los metabolitos también intervienen en el incremento de la capacidad antioxidante total y que los metabolitos microbianos formados en el colon son también importantes.

En nuestro estudio, se suplementó un grupo de animales con aceite de girasol para poder comparar los resultados obtenidos en ambos grupos. Es importante destacar que el aceite de girasol, que apenas contiene hidroxitirosol y que es pobre en otros compuestos polifenólicos, produce un incremento en los niveles plasmáticos de hidroxitirosol del orden de 6 veces.

En estudios previos, Owen *et al.* (2000c) comprobaron que los aceites de semillas, con bajos niveles de polifenoles y escualeno y cantidades más elevadas de vitamina E, mostraban una actividad antioxidante mínima, mientras que la potencia de los extractos de aceite de oliva virgen era significativamente superior.

Debido al diseño de nuestro estudio, podríamos pensar que los efectos antioxidantes del grupo alimentado con el aceite de oliva se deben a los polifenoles, ya que en el aceite de oliva virgen utilizado el contenido de polifenoles, en concreto OHTyr era elevado, mientras que el perfil cromatográfico del aceite de girasol mostraba unos niveles mínimos, al tratarse de un aceite refinado. Los efectos encontrados en los estudios con ratones se podrían por tanto atribuir a los polifenoles presentes en el aceite de oliva, diferencia principal entre los aceites empleados.

Las posibles vías por las que el consumo de aceite de girasol puede llevar a un aumento de los niveles plasmáticos de hidroxitirosol serían la modificación y degradación de algunos compuestos (secoiridoides, catecolaminas) procedentes del aceite y de la dieta en general, hasta hidroxitirosol. Este metabolito final de los procesos de digestión, metabolismo ó de las transformaciones realizadas por la flora intestinal, puede ser absorbido en el intestino.

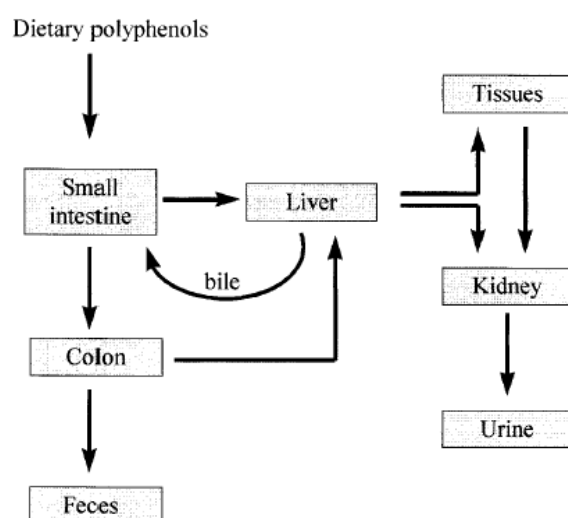


Figura 2: Posibles rutas de los polifenoles ingeridos en la dieta en humanos. Figura tomada de Scalbert *et al.* (2000).

De un modo similar, Visioli *et al.* (2003) encontraron niveles basales de excreción de OHTyr en ratas muy elevados, por lo que parecía que la absorción y excreción del OHTyr del aceite de oliva virgen suministrado era menor en estos roedores que en los humanos. Según estos autores, la explicación podría ser el metabolismo endógeno de las catecolaminas, ya que el OHTyr es un metabolito final de la degradación de estos compuestos y puede formarse en el intestino de la rata por acción de la flora bacteriana.

Otros trabajos corroboran esta teoría (Natsume *et al.*, 2003), según la cual, determinados compuestos anfilílicos podrían transformarse hasta OHTyr en el intestino de estos animales de experimentación.

Esto podría explicar en parte, los niveles de OHTyr alcanzados en el plasma de los ratones CTL y AG de nuestro estudio, que no recibieron vía oral aceite de oliva virgen extra rico en OHTyr.

Por otra parte, si tenemos en cuenta los estudios de absorción de Vissers *et al.* (2004), de 500 ng de OHTyr que se suministraron a los ratones de nuestro estudio, se habrían absorbido como media 300 ng de este compuesto, valores superiores a las cantidades encontradas posteriormente en el plasma.

Sin embargo, otros autores han cuantificado niveles de polifenoles en plasma superiores a lo esperado, incluso (3-10 veces) mayores que las dosis suministradas (Duthie *et al.*, 1998; Scalbert *et al.*, 2000). Esto sugiere que los metabolitos formados en nuestros tejidos y por la microflora bacteriana contribuyen significativamente a la capacidad antioxidante.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos señalar que la ingesta diaria de aceite de oliva virgen con elevado contenido en hidroxitirosol y probablemente otros compuestos, incrementan los niveles de hidroxitirosol en el plasma. La biodisponibilidad de este compuesto depende de la cantidad ingerida, alcanzando un nivel máximo por encima del cual los niveles plasmáticos no se modifican.

4.2. Capacidad antioxidante del plasma

4.2.1. Relación glutatión reducido/glutatión oxidado

El glutatión es un tripéptido (γ – glutamilcisteinilglicina) que, en su forma reducida (GSH), forma parte de las defensas antioxidantes no enzimáticas del organismo, ya que aporta equivalentes reductores a la glutatión peroxidasa, enzima que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno. Las células expuestas a un mayor estrés oxidativo presentan acumulación de glutatión oxidado (GSSG), que es transformado en GSH de nuevo por la enzima glutatión reductasa con la intervención del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH).

El objetivo de este estudio fue cuantificar las dos formas del glutatión en el plasma de los ratones alimentados con aceite, para así determinar la relación GSH / GSSG.

El ratio GSH / GSSG calculado a partir de la medida independiente de ambas formas del glutatión, fue ensayado en diez animales de cada grupo. La formación de GSH a partir de GSSG se midió en las muestras de plasma por espectrofotometría.

La figura 3 representa la razón entre glutatión oxidado y reducido medido en los grupos AO (n° determinaciones= 35) y AG (n° determinaciones= 32). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los ratones que fueron alimentados con el aceite de oliva ($5,38 \pm 0,47$) y los que recibieron el de girasol ($4,12 \pm 0,28$).

Cuanto mayor es el ratio, mejor es el estado antioxidante, puesto que hay mayor proporción de glutatión reducido para proteger a las células de la oxidación. La figura muestra cómo en el grupo AO esta razón presentó un valor 1,3 veces superior al del grupo AG ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos de la medida del glutatión en el plasma, nos indican que los ratones alimentados con el aceite de oliva tenían mayores niveles de defensas antioxidantes no enzimáticas que los alimentados con aceite de girasol.

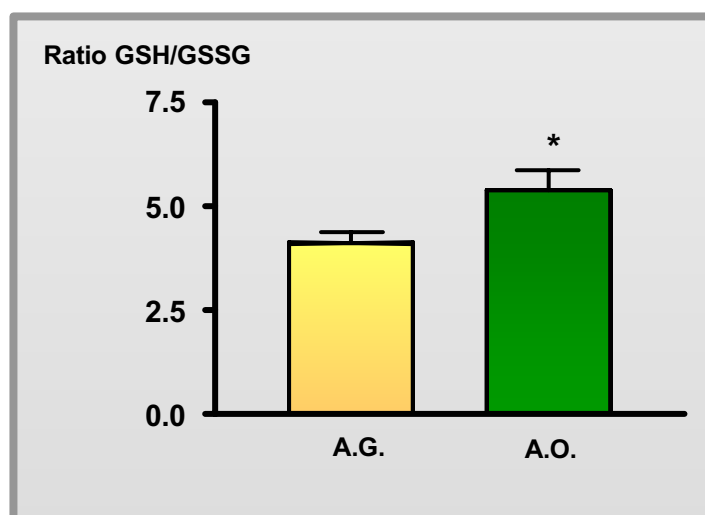


Figura 3: Ratio GSH / GSSG del plasma de ratones alimentados con distintos tipos de aceite. La figura representa la razón entre el glutatión oxidado y reducido en el plasma de los siguientes grupos de ratones: a) Grupo de ratones alimentados con 50 μ L de aceite de girasol durante cuatro días (AG; n= 10) y b) Grupo de ratones alimentados con 50 μ L de aceite de oliva durante cuatro días (AO; n= 10). * p < 0,05 vs AG.

El glutatión es uno de los principales agentes del sistema de defensa antioxidante celular. Está presente intracelularmente en concentraciones del orden milimolar, mientras que en plasma humano los niveles son de micromoles (Abuja *et al.*, 2001). Las células con bajos niveles de GSH son mucho más sensibles a los daños externos (Navarro *et al.*, 1997). Por tanto, la medida de la forma oxidada del glutatión (GSSG) en tejidos y fluidos biológicos se emplea como un índice de estrés oxidativo, ya que se forma en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas. Su determinación en plasma es más adecuada porque refleja el estado del glutatión a nivel general, da una información rápida del daño oxidativo del organismo.

En la determinación del ratio GSH/GSSG, el mayor problema es la medida del GSSG, porque la oxidación espontánea del GSH durante la preparación de la muestra, puede dar lugar a la cuantificación de mayores niveles de la forma oxidada. En nuestro estudio, la preparación de las muestras se llevó a cabo minuciosamente (Ranieri *et al.*, 2002), para evitar que las concentraciones de glutation se vieran modificadas por el pH, la desproteización ó la temperatura.

Los valores de GSH/GSSG encontrados en bibliografía varían bastante, dependiendo de la técnica de cuantificación empleada. Aunque también hay autores que emplean la cromatografía HPLC (Navarro *et al.*, 1997; Giustarini *et al.*, 2003), los métodos más usuales son espectrofotométricos (Ranieri *et al.*, 2002; Rodrigo *et al.*, 2002; Suh *et al.*, 2004). Nuestros resultados son acordes con los niveles encontrados por otros autores en roedores sanos ó alimentados con vino tinto (Ganafa *et al.*, 2002; Rodrigo *et al.*, 2002; Suh *et al.*, 2004) y similares a los de los humanos (Navarro *et al.*, 1997; Giustarini *et al.*, 2003).

4.2.2. Poder antioxidante total

El estrés oxidativo se produce cuando se rompe el balance fisiológico entre los estímulos prooxidantes y las defensas de las células frente a estos agentes. Esta determinación es un marcador del estado de oxidación, mide los niveles generales de antioxidantes presentes en el plasma, es decir, mide el grado de protección genético ó adquirido frente al estrés oxidativo.

Con la finalidad de conocer el estado antioxidante de los ratones alimentados con el aceite de oliva estudiado y compararlo con el del grupo girasol, se midió la capacidad antioxidante total en el plasma de los animales. Se realizó por determinación de la reducción de Cu^{2+} a Cu^{+} , mediante espectrofotometría.

La medida de la capacidad antioxidante en el plasma se realizó en seis ratones de cada grupo, y como puede verse en la figura 4, el nivel de

antioxidantes fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el grupo AO ($39,91 \pm 4,57$ μM de poder reductor), frente al grupo AG ($22,62 \pm 3,65$ μM de poder reductor).

Los ratones alimentados con el aceite de oliva (n° determinaciones = 23) presentaron una capacidad antioxidante 1,76 veces superior a la de los alimentados con aceite de girasol (n° determinaciones = 24).

Tanto los niveles de glutatión reducido como los de antioxidantes generales fueron más elevados en el grupo AO, por lo que podría pensarse que este aceite de oliva virgen extra mejora la protección frente al estrés oxidativo.

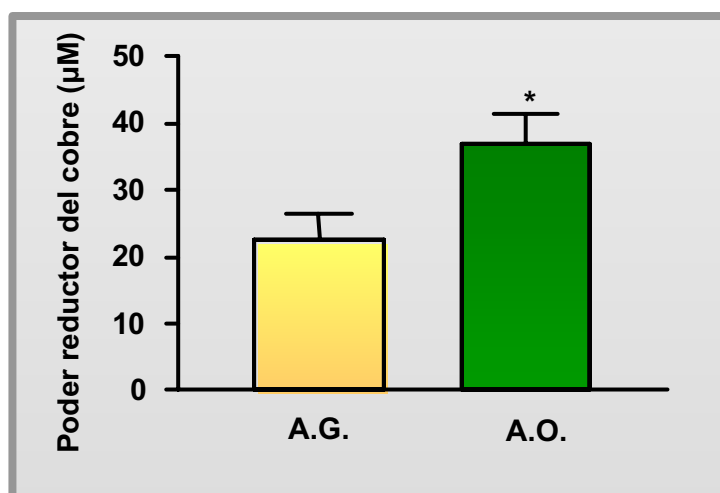


Figura 4: Capacidad antioxidante total del plasma de ratones alimentados con distintos tipos de aceite. Se representa la capacidad antioxidante total en los siguientes grupos de ratones: a) Grupo de ratones alimentados con 50 μL de aceite de girasol durante cuatro días (AG; $n = 6$) y b) Grupo de ratones alimentados con 50 μL de aceite de oliva durante cuatro días (AO; $n = 6$). * $p < 0,05$ vs AG.

Los estudios de biodisponibilidad del chocolate (Rein *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000) indican que es muy importante, no sólo que aumente el nivel de polifenoles, sino que se incremente el potencial antioxidante (PAO) en plasma. La relevancia del incremento de OHTyr en plasma tras el consumo de aceite de oliva virgen radica en la modificación de determinadas variables de estrés oxidativo.

Los resultados de nuestro estudio demuestran que existe un efecto biológico *in vivo* por el consumo de aceite de oliva.

Los estudios de capacidad antioxidante, tanto en humanos como en roedores, tienen como finalidad evaluar el estado anti/prooxidativo en determinadas enfermedades ó tras la administración de compuestos antioxidantes. Varios autores (Ibrahim *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 2001; Friedman *et al.*, 2003; Landrault *et al.*, 2003; Shea *et al.*, 2003) han encontrado un descenso en el PAO de ratones diabéticos ó sometidos a un estrés oxidativo.

En humanos, numerosos autores, como Santini *et al.* (1997), Duthie *et al.* (1998), Ceriello *et al.* (1997, 1999, 2001), Marra *et al.* (2002), han estudiado el poder antioxidante en plasma de pacientes con diabetes, tomando como grupos control individuos sanos ó que habían consumido una cantidad moderada de vino tinto. Los datos sugieren que el estado de salud de los individuos con mayor potencial antioxidante es mejor y que la determinación del PAO en el plasma es un parámetro más relevante que la determinación de antioxidantes de manera individual.

Es difícil comparar nuestros resultados con los de otros trabajos publicados, no existe un criterio unánime sobre la cuantificación del PAO en plasma debido a que existen distintos métodos, como el TRAP (total radical trapping parameter, FRAP (ferric reducing ability of plasma) y TBARS, basados en la reducción del férrico, el TEAC, que emplea un análogo de la vitamina E (Trolox), y otros basados en la reducción del ión cúprico. En general, los niveles encontrados son del orden de $\mu\text{moles/L}$.

Un aspecto controvertido es saber cual es la concentración mínima de compuestos polifenólicos, presentes en el plasma, que tienen una actividad antioxidante demostrada. Además es importante correlacionar esos valores con la cantidad de alimento ingerida.

Recientemente, ha aparecido un trabajo que correlaciona, en humanos, estos parámetros y demuestra que existe una relación directa entre la ingesta de chocolate negro y el incremento de la capacidad antioxidante total del plasma medida mediante el ensayo de FRAP (Serafini *et al.*, 2003a, 2003b).

Nosotros hemos medido el incremento de la capacidad antioxidante en los animales alimentados con los distintos tipos de aceites por un método doble. Así pues, hemos analizado el estado de óxido-reducción del glutatión plasmático y se ha valorado la capacidad antioxidante total plasmática. Al igual que ocurre con la ingesta de chocolate negro, el consumo de aceite de oliva enriquecido en compuestos polifenólicos también aumenta de un modo discreto, aunque significativamente, la capacidad antioxidante plasmática.

La capacidad antioxidante plasmática es un equilibrio complejo entre nuestras defensas antioxidantes adquiridas y genéticas y los estímulos prooxidantes. Los factores que afectan a este delicado equilibrio son múltiples y tal y como ya ha sido demostrado por Serafini *et al.* (2003) es difícil que el consumo de un determinado alimento rico en antioxidantes pueda producir un incremento muy evidente en la capacidad antioxidante.

Por lo tanto, lo que confirmamos con nuestro estudio es que la ingesta de cantidades adecuadas para una dieta equilibrada, de productos ricos en antioxidantes, como el aceite de oliva objeto de nuestro estudio, produce un aumento moderado pero significativo en la actividad antioxidante plasmática. Este efecto se debe sumar a otras medidas que lleven a una reducción de nuestro estrés oxidativo y en definitiva, a una menor prevalencia de muchas enfermedades de nuestro entorno, que tienen un origen importante en el estrés oxidativo.

4.3. Secreción de insulina de los islotes de Langerhans

Los radicales libres están implicados en el proceso de destrucción de la célula beta pancreática, relacionado con el desarrollo de diabetes autoinmune. Debido a que disponen de menos defensas antioxidantes que otros tejidos, los islotes de Langerhans son más vulnerables frente al estrés oxidativo.

El objetivo de estos experimentos fue comprobar si la alimentación extra con un aceite rico en polifenoles podía proteger los islotes pancreáticos del daño producido por un agente oxidante.

Los islotes aislados de los tres grupos de animales, se incubaron durante una hora con 95 % de O₂ y 5 % de CO₂ a 37° C. La mitad de ellos, en medio de secreción con una concentración de glucosa de 3 mM (basal) y la otra mitad, con 22 mM glucosa (máxima estimuladora). La cantidad de insulina secretada se determinó por la técnica del RIA.

La figura 5 representa la insulina liberada por los islotes de los tres grupos. La secreción de insulina (pg / µg proteína) a 3 mM glucosa, de los islotes de ratones alimentados con los aceites, fue similar a la de los islotes controles. Cuando los islotes se incubaron con 22 mM glucosa, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los valores del grupo AO (753 ± 156; n= 9), el grupo AG (860 ± 108; n= 8) y el CTL (970 ± 118; n= 7).

En los tres grupos de animales, la secreción de insulina de los islotes incubados con una concentración de glucosa estimuladora, fue aproximadamente cuatro veces superior a la secreción basal. Esta diferencia entre la secreción a alta y baja glucosa ($p < 0,001$), nos indica que el comportamiento de los islotes de los grupos AG y AO puede considerarse normal.

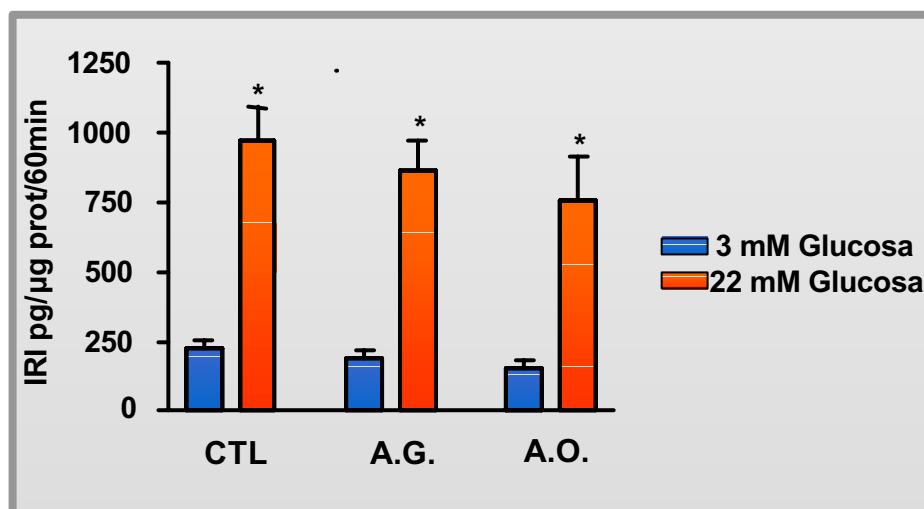


Figura 5: Secreción de insulina de islotes no tratados con peróxido de hidrógeno en respuesta a glucosa. La figura representa la secreción de insulina de los islotes no tratados, para ambas concentraciones de glucosa en el medio. a) Grupo de ratones controles (CTL; n= 7); b) Grupo de ratones alimentados con 50 μ L de aceite de girasol durante cuatro días (AG; n= 8) y c) Grupo de ratones alimentados con 50 μ L de aceite de oliva durante cuatro días (AO; n= 9). * $p < 0,001$ vs 3 mM glucosa.

Estos resultados sugieren que la alimentación extra de los ratones con aceite en la dosis ensayada, durante cuatro días, no modifica la secreción de insulina en respuesta a glucosa de los islotes pancreáticos.

Para estudiar la secreción de insulina de los islotes sometidos a un daño oxidativo, se trataron islotes con varias concentraciones de peróxido de hidrógeno durante distintos periodos de tiempo. Se buscó la concentración que produjera oxidación en el islote, pero sin llegar a la muerte celular y pérdida de funcionalidad de este tejido modelo.

Los islotes de los tres grupos fueron incubados con 10 μ M de este agente oxidante durante 30 minutos y posteriormente, se incubaron con alta y baja glucosa como en el caso de los islotes no tratados.

En la figura 6 se representan los experimentos de secreción de insulina de los islotes tratados. Con glucosa basal, no hubo diferencias significativas entre la secreción de insulina de los tres grupos (AO: $151 \pm 24,7$; $n= 8$. AG: 175 ± 25 ; $n= 7$. CTL: $174,1 \pm 11,8$, $n= 5$).

La secreción de insulina de los islotes del grupo AO, incubados con glucosa estimuladora, fue de 580 ± 35 ($n= 9$), valor significativamente superior ($p < 0,05$) al encontrado en el grupo AG (443 ± 38 ; $n= 6$) y al del grupo control ($276,6 \pm 45$; $n= 6$). En el caso del grupo AG, también hubo una secreción de insulina, en respuesta a glucosa, significativamente mayor ($p < 0,05$) que en el grupo CTL.

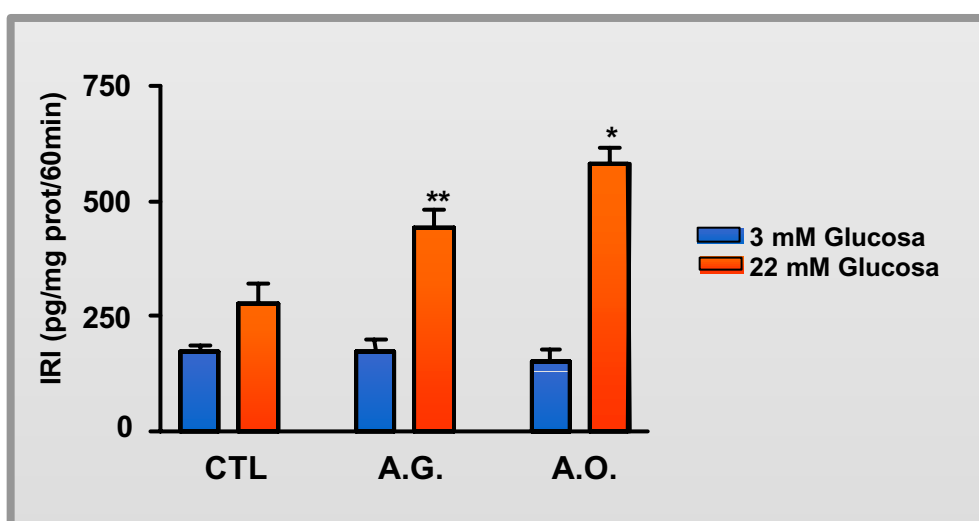


Figura 6: Secreción de insulina de islotes tratados con peróxido de hidrógeno en respuesta a glucosa. La figura representa la secreción de insulina de los islotes tratados, para ambas concentraciones de glucosa en el medio. a) Grupo de ratones controles (CTL; $n= 6$); b) Grupo de ratones alimentados con 50 μ L de aceite de girasol durante cuatro días (AG; $n= 6$) y c) Grupo de ratones alimentados con 50 μ L de aceite de oliva durante cuatro días (AO; $n= 9$). * $p < 0,05$ vs AG. ** $p < 0,05$ vs CTL.

La cantidad de insulina liberada en respuesta a alta glucosa, cuando los ratones fueron alimentados con este aceite de oliva virgen extra, fue doble de la que secretaron los islotes de ratones controles. Cuando se alimentaron con aceite

de girasol, la secreción resultó ser 1,8 veces menor que con el aceite de oliva estudiado. La relación entre la cantidad de insulina a 22 y 3 mM glucosa, aumentó conforme los ratones se alimentaron con un aceite de mayor contenido en hidroxitirosol. Con el aceite de oliva, esta proporción fue similar a la de los islotes no tratados.

Los resultados obtenidos en este estudio con islotes tratados con peróxido de hidrógeno, nos dan a conocer que los islotes pancreáticos del grupo AO mantuvieron su función fisiológica tras haber sido tratados con un agente oxidante. Parece que la alimentación con este aceite de oliva virgen extra tiene un efecto protector frente a la oxidación en los islotes de Langerhans.

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica caracterizada por una deficiencia absoluta ó relativa de insulina y/o una resistencia a la insulina. En los pacientes diabéticos se produce hiperglicemia y glicosuria.

En la actualidad, gracias a la terapia con insulina, no se produce coma glucémico, sino que las complicaciones más peligrosas de la diabetes son de tipo cardiovascular, como aterosclerosis, enfermedad coronaria, infarto de miocardio, y modificaciones microvasculares, responsables de daños en la retina, riñón y nervios periféricos (Abuja *et al.*, 2001). Se ha descrito que los pacientes diabéticos tienen mayor estrés oxidativo (Ceriello *et al.*, 2000, 2003; Facchini *et al.*, 2003), corroborado por los bajos niveles de glutatión, vitaminas C y E en plasma y mayores niveles de MDA en suero (Kesavulu *et al.*, 2001). El origen de los radicales libres en la diabetes podría ser la glicosilación de las proteínas.

En los estados hiperglucémicos la cantidad de ROS es muy elevada Robertson *et al.* (2003), de manera que los islotes tienen mayor riesgo de sufrir estrés oxidativo crónico que otros tejidos (Mercuri *et al.*, 2000) cuando se hayan expuestos a hiperglucemia, por dos motivos: es un tejido donde hay mayor oxidación y sus defensas enzimáticas antioxidantes son menores. Por eso, no es difícil que se produzca la disfunción de la célula β (Chandra *et al.*, 2001).

En cuanto a las complicaciones que aparecen como consecuencia de la diabetes, se ha estudiado el efecto de dietas ricas en polifenoles en la progresión de la nefropatía diabética (Facchini *et al.*, 2003; Mounsey A., 2003), donde se ha visto una disminución del daño renal de estos enfermos.

Una vez realizado el estudio del nivel general de antioxidantes de los tres grupos de ratones, se seleccionó el islote de Langerhans como tejido modelo para comprobar los posibles efectos biológicos de los aceites a nivel de membrana. Para realizar estos experimentos se escogieron los islotes pancreáticos por varios motivos:

- Por una parte, como ya se ha comentado, la diabetes es una enfermedad relacionada con el estrés oxidativo.
- Las defensas antioxidantes de este tejido son inferiores a las de otros tejidos, de manera que los islotes están menos protegidos frente a los cambios en el potencial redox.
- El desarrollo de la diabetes tipo 2 se relaciona en gran medida con los hábitos alimentarios.

Al mismo tiempo, hay que tener en cuenta que las complicaciones de la diabetes están también relacionadas con el estrés oxidativo.

Los resultados de estos experimentos muestran cómo, a pesar de estar sometidos a un estrés oxidativo, los islotes de los ratones alimentados con aceite de oliva resistieron el tratamiento con peróxido de hidrógeno. Esto se debe probablemente a un efecto de protección directo por parte de los polifenoles y otros compuestos del aceite de oliva virgen.

4.4. Medida de la peroxidación lipídica de las membranas celulares en islotes de Langerhans y en hígado

La oxidación de los fosfolípidos de membrana da lugar a una reacción en cadena en la que se induce la destrucción de otras biomoléculas y se produce la formación de compuestos cuya acumulación puede además tener un efecto tóxico sobre la célula. La medida del malonil dialdehído (MDA), un derivado oxidado de los lípidos de membrana, nos puede dar una idea de la integridad de las membranas celulares de los animales alimentados con aceite. Por el contrario, el aumento de la concentración de MDA se debe, por tanto, a una mayor peroxidación lipídica.

El estudio se realizó con cuatro ratones de cada uno de los tres grupos y además, se hicieron los controles internos necesarios para asegurar la fiabilidad de los resultados. La concentración de MDA se determinó en 20, 50 y 100 mg de hígado, obteniéndose resultados similares. Estos controles internos se realizaron también en la determinación del MDA en islotes, de manera que la concentración media calculada por islote resultó equivalente cuando la medida se realizó en 50 y 100 islotes.

Los experimentos se realizaron con muestras de 50 mg de hígado y grupos de 50 y 100 islotes pancreáticos tratados previamente con 10 μ M de peróxido de hidrógeno durante 30 minutos y posteriormente, se determinó la acumulación de MDA en las membranas de estos tejidos por espectrofotometría.

Las figuras 7 y 8 nos muestran una tendencia decreciente en la formación de MDA, conforme se suplementa la dieta de los ratones con aceite de mayor contenido en compuestos fenólicos.

En los dos tejidos estudiados, la concentración de MDA medida en controles fue más del doble de la encontrada en los alimentados con aceite de oliva. Cuando se compararon los controles con el grupo alimentado con aceite de girasol se encontraron también diferencias estadísticamente significativas, aunque en islotes esta diferencia fue menor que en hígado.

La acumulación de MDA en el grupo AG fue 1,5 veces superior a la del grupo AO tanto en hígado como en islotes, diferencia considerada estadísticamente significativa.

Los valores de MDA en islotes fueron superiores (aproximadamente 1,7 veces) a los medidos en hígado, para los tres grupos de animales.

Como se puede ver en la figura 7, la concentración de MDA en $\mu\text{M} / \text{mg}$ de proteína en el hígado de los ratones controles (n° determinaciones= 11) fue 1,6 veces superior a la del grupo AG (n° determinaciones= 11; $p < 0,05$) y 2,4 veces superior a la del grupo AO (n° determinaciones= 16; $p < 0,001$). La diferencia entre AO y AG también resultó ser estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

En las membranas de los islotes los resultados fueron similares a los obtenidos en el hígado. El grupo control (n° determinaciones= 8) presentó una concentración de MDA 1,5 veces la del grupo AG (n° determinaciones= 14; $p < 0,05$) y aproximadamente 2,2 veces superior a la del grupo AO (n° determinaciones= 13; $p < 0,001$). Como ya se ha comentado anteriormente, esta concentración en el grupo AG fue 1,5 veces superior a la del grupo AO ($p < 0,05$).

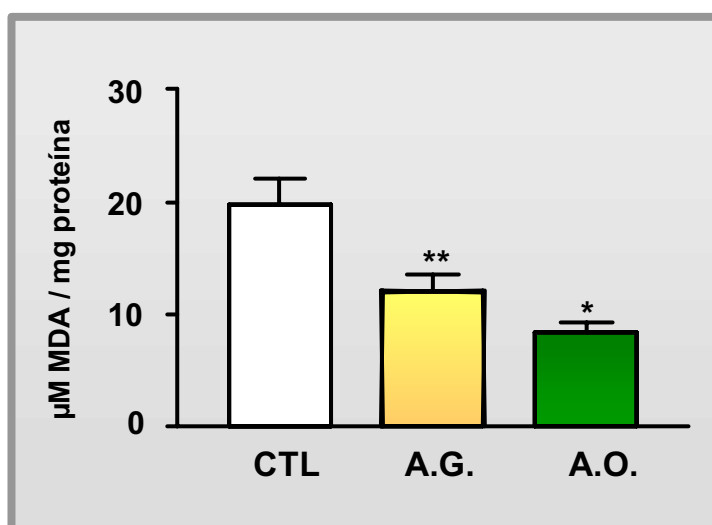


Figura 7: Determinación de la peroxidación lipídica en muestras de hígado tratado con peróxido de Hidrógeno. La figura muestra los resultados obtenidos en las muestras de hígado de los tres grupos de ratones: a) Grupo de ratones controles (CTL; n= 4); b) Grupo de ratones alimentados con 50 μ L de aceite de girasol durante cuatro días (AG; n= 4) y c) Grupo de ratones alimentados con 50 μ L de aceite de oliva durante cuatro días (AO; n= 4).

* $p < 0,05$ vs AG. ** $p < 0,001$ vs CTL.

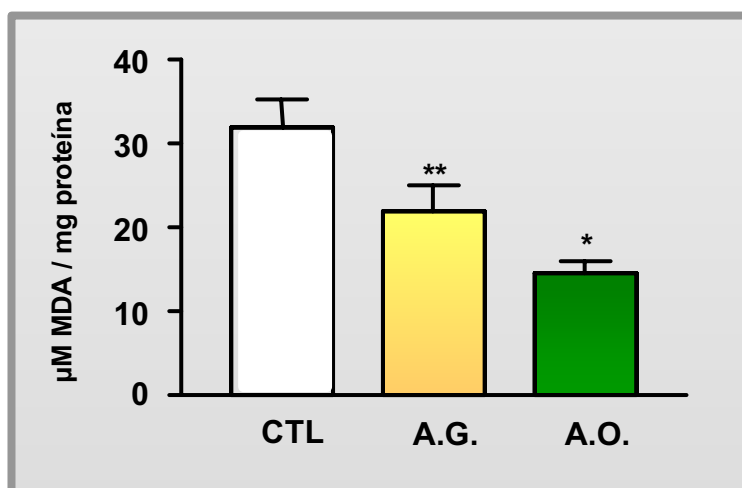


Figura 8: Determinación de la peroxidación lipídica en islotes de Langerhans tratados con peróxido de Hidrógeno. La figura muestra los resultados obtenidos en los islotes de los tres grupos de ratones: a) Grupo de ratones controles (CTL; n= 4); b) Grupo de ratones alimentados con 50 μ L de aceite de girasol durante cuatro días (AG; n= 4); c) Grupo de ratones alimentados con 50 μ L de aceite de oliva durante cuatro días (AO; n= 4). * $p < 0,05$ vs AG. ** $p < 0,001$ vs CTL.

La mayoría de los estudios sobre el MDA describen los mecanismos por los que este compuesto puede *in vitro* alterar proteínas, DNA, RNA y otras biomoléculas (Kim *et al.*, 2000). Recientemente, Erba *et al.* (2003) han detectado una disminución de la cantidad de MDA al añadir catequinas (EGCG) en cultivos celulares expuestos a peróxido de hidrógeno.

Para confirmar los resultados obtenidos en islotes de Langerhans, la medida del MDA se realizó también en hígado, para determinar su resistencia al estrés oxidativo. El hígado tiene mayores defensas antioxidantes, pero es un tejido metabólico que también está expuesto a un continuo ataque por parte de los radicales libres formados en las reacciones de óxido-reducción del metabolismo.

A la vista de estos resultados, podemos decir que la acumulación de MDA, es decir, la peroxidación lipídica de las membranas celulares fue mayor en los islotes de Langerhans que en el tejido hepático. La oxidación fue menor en los animales alimentados con aceite y los niveles más bajos de MDA se encontraron en el grupo del aceite de oliva virgen extra estudiado.

Los resultados de nuestro estudio ponen de manifiesto que el aceite de oliva virgen tiene un efecto directo como antioxidante, ya que a nivel de las membranas de dos tejidos fácilmente oxidables, disminuyó de forma significativa la peroxidación lipídica.

4.5. Expresión de enzimas antioxidantes en islotes de Langerhans

En la regulación del estado oxidativo de las células intervienen enzimas antioxidantes, cuya función es captar el peróxido de hidrógeno y radicales libres y transformarlos por medio de una serie de reacciones en compuestos no dañinos para las células.

Los experimentos realizados con RT-PCR cuantitativa pretenden estudiar si en los animales alimentados con aceite existe una modificación en la expresión de genes que codifican para enzimas con capacidad antioxidante. Los genes estudiados son los correspondientes a los enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD-2) y glutatión peroxidasa (GT_{px}). La expresión de los mencionados genes se llevó a cabo en los islotes de los tres grupos de ratones estudiados.

La figura 9 representa el nivel de expresión relativa, en tanto por uno, del RNA_m de las enzimas estudiadas en los tres grupos de animales. Las cantidades relativas de RNA_m de los islotes se cuantificaron por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak *et al.*, 2001), empleando como control endógeno PGK-1 (fosfoglicerato kinasa). El valor de referencia tomado para el grupo CTL fue el uno y la expresión en los grupos AG y AO se cuantificó de forma relativa a la expresión en el grupo CTL.

La primera parte de la figura 9 representa la expresión génica de la enzima catalasa. En el grupo de animales alimentados con aceite de girasol se produjo una disminución de la expresión de CAT, comparada con el grupo control, mientras que en el grupo AO, la expresión de CAT aumentó con respecto a los controles. La expresión de esta enzima en el grupo AG fue el 40% de la expresión del control, en cambio, la expresión del grupo AO fue aproximadamente un 50%

superior a la del grupo control. La diferencia entre los dos grupos alimentados con aceite fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

La expresión de la enzima SOD-2 se vió modificada de forma negativa en los ratones alimentados con ambos tipos de aceite ($p < 0,05$). Esta disminución fue más acusada en el grupo AO, aunque no se encontraron diferencias significativas entre este grupo y el AG.

La ingestión de aceite no modificó la expresión de la enzima GT_{PX} de forma significativa. Como puede verse en la figura, los valores de los grupos AO y AG fueron muy próximos al del control. Tampoco hubo diferencias significativas entre los dos grupos de ratones que recibieron aceite.

Los resultados obtenidos del estudio del RNA_m de los islotes pancreáticos nos muestran el efecto de una alimentación extra con aceite, en las condiciones ensayadas, sobre la expresión génica de las enzimas antioxidantes estudiadas.

En los dos grupos alimentados con aceite se produjo una modificación de la cantidad/expresión de RNA_m de las enzimas SOD-2 y CAT. La expresión de esta última fue mayor cuando se trataba del aceite de oliva virgen extra estudiado, de manera que estos resultados nos orientan sobre el posible papel protector de este aceite frente a la oxidación gracias a un mecanismo de acción a nivel del núcleo.

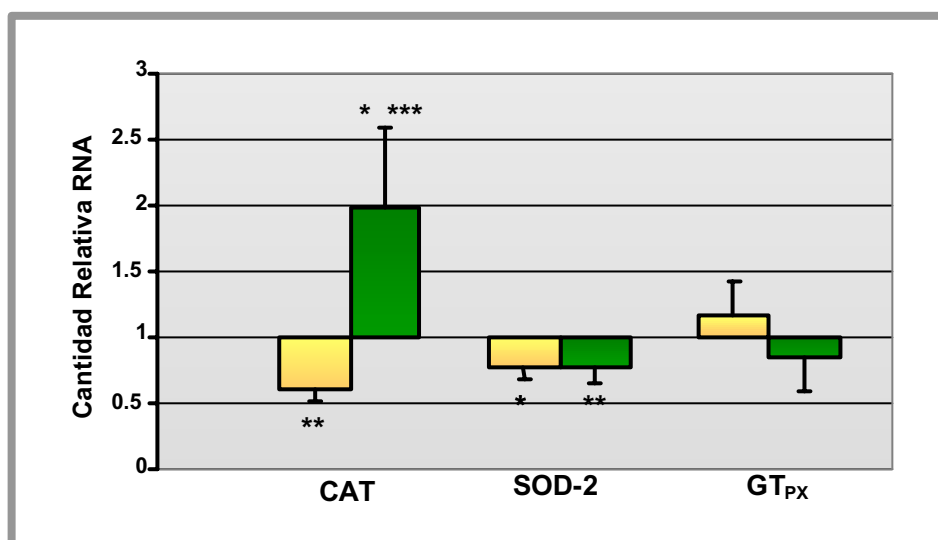


Figura 9: Expresión de enzimas antioxidantes en islotes pancreáticos de ratón.

La figura representa las cantidades relativas de RNA_m de los islotes de Langerhans de los tres grupos de animales, medidas por RT-PCR y cuantificadas por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El endógeno empleado fue el PGK-1. Se tomó como valor de referencia el grupo CTL (valor 1), y los grupos AG y AO se expresan como valores relativos al grupo CTL. Grupo de ratones alimentados con 50 μ L de aceite de girasol durante cuatro días (AG; n=4). Grupo de ratones alimentados con 50 μ L de aceite de oliva durante cuatro días (AO; n= 4).

CAT: * $p < 0,05$ CTL vs AO. ** $p < 0,05$ CTL vs AG. *** $p < 0,05$ AO vs AG. SOD-2: * $p < 0,05$ CTL vs AG. ** $p < 0,05$ CTL vs AO. AO vs AG= NS. GPx: AO vs AG= NS. AO y AG vs CTL= NS.

El estrés oxidativo se debe al desequilibrio entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes del organismo. Los radicales libres se han asociado a multitud de procesos clínicos, como lesiones inflamatorias, deficiencias nutricionales, enfermedades autoinmunes, enfermedad de Parkinson, envejecimiento, neoplasias, aterosclerosis y diabetes (Ceriello *et al.*, 2001).

Las actividades de las enzimas antioxidantes dependen del equilibrio entre su inactivación y su inducción, de manera que la inducción mantenida de enzimas antioxidantes representaría un factor protector frente a la generación de radicales libres. En este sentido, el incremento de la expresión de alguna de estas enzimas, que actúan de forma coordinada entre sí, supondría un mecanismo de acción beneficioso en la protección antioxidante.

Por otra parte, se han descrito grados de actividad bajos de estas enzimas en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como la enfermedad coronaria, diabetes mellitus (Kesavulu *et al.*, 2001), neoplasias y enfermedades cerebrales asociadas al envejecimiento. El nivel de expresión extremadamente bajo de enzimas antioxidantes en las células productoras de insulina (Lenzen *et al.*, 1996) se ha considerado la característica principal de la poca resistencia de la célula β contra el estrés oxidativo (Lortz *et al.*, 2003). Además, mientras que otros tejidos aumentan la expresión de estas enzimas ante un daño oxidativo, parece que las células productoras de insulina no pueden desarrollar este mecanismo de defensa (Tiedge *et al.*, 1997, 2003).

En estudios anteriores (Tiedge *et al.*, 1999; Lortz *et al.*, 2000; Tejedo J.R., 2000) se vio que el daño oxidativo de los lípidos inducido por NO podía ser atenuado por la adición de enzimas antioxidantes como la CAT ó la SOD y que esta protección se elevaba cuando se modificaban las células para que sobreexpresaran estas enzimas.

En células RINm5F (productoras de insulina) se estudió cómo el efecto del NO y de los ROS se producía cuando las células eran expuestas a la acción de citoquinas y que podía ser suprimido al sobreexpresar enzimas como la CAT, la GT_{PX} ó la SOD, ya que a diferencia de otros tejidos, las células β -pancreáticas tienen un bajo nivel de enzimas antioxidantes, particularmente de CAT y GT_{PX} (Maitre *et al.*, 1993; Lenzen *et al.*, 1996; Lortz *et al.*, 2000).

Al incubar las células en presencia de la enzima SOD, la peroxidación lipídica fue inhibida en un 40%, con la CAT, esta protección fue del 50% y en presencia de ambas enzimas, la protección, si bien no es aditiva, aumentó hasta el 70%. Esto se debería a que ambas enzimas reducen los radicales superóxido y peróxido de hidrógeno y además intervendrían en la reducción del hierro (Tiedge *et al.*, 1999).

Adicionalmente, se ha encontrado que la Mn-SOD puede activar las vías de supervivencia de las MAP kinasas (Chen *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2000; Kong *et al.*,

2001), y que esta enzima está más relacionada con la protección de la célula contra la muerte celular, mientras que la CuZn-SOD protegería a la célula del estrés oxidativo (Tiedge *et al.*, 1999; Lortz *et al.*, 2000).

En estudios *in vitro* se ha visto que el tratamiento con compuestos antioxidantes protege a las células β , como es el caso de la sulfonilurea gliclazida (Jenninngs *et al.*, 2000; O'Brien *et al.*, 2000) cuyos efectos antioxidantes son independientes del mecanismo hipoglucémico de este fármaco. Los experimentos de Kimoto *et al.* (2003) pretenden demostrar cómo en células β previamente dañadas con peróxido de hidrógeno, la gliclazida evitaba parcialmente la muerte celular inducida por el oxidante, mediante un aumento de la expresión de la CAT y SOD-1. En un trabajo más reciente (Hong *et al.*, 2004) la suplementación de ratas con vitamina E provocó una mayor expresión de la SOD y GT_{PX} en cerebro.

Maittre *et al.* (1993) observaron cómo el estrés oxidativo puede provocar un descenso de la actividad de los enzimas antioxidantes asociados al sistema glutatión. Debido a que estas enzimas trabajan más para eliminar los radicales libres cuando existe un estado de estrés oxidativo, un patrón habitual en esas situaciones sería un descenso de la actividad de las enzimas antioxidantes debido a su consumo (Ceriello *et al.*, 2000; Tejedo J.R., 2000).

Este mecanismo de acción, como adaptación frente a un estado de mayor oxidación, consistiría por tanto, en un aumento de la actividad de la enzima. Por otra parte, la función de estas enzimas antioxidantes puede regularse a nivel del núcleo, con una mayor expresión del RNA_m que daría lugar a una mayor síntesis de la enzima. Este mecanismo se desencadenaría en el núcleo de la célula como protección en una situación de daño oxidativo.

Como ya se ha comentado, esta sobreexpresión enzimática es un mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo, que tiene lugar en las células de manera espontánea frente a un tóxico (Reddi *et al.*, 1997) ó que es inducida voluntariamente en un experimento (Hauck *et al.*, 2002; Soto *et al.*, 2003; Ananthan *et al.*, 2004).

Otros autores han estudiado la relación entre algunos nutrientes de la dieta, como las proteínas y la modificación de la expresión de determinados genes implicados en enfermedades como la diabetes (Arantes *et al.*, 2002; Laybutt *et al.*, 2002). En el caso de los polifenoles, estaríamos hablando de componentes no nutricionales de la dieta, que podrían tener efectos sobre la expresión de genes.

En nuestro estudio, a diferencia de otros trabajos, se midió la expresión de estas tres enzimas en ratones no diabéticos y en condiciones normales, ya que los islotes de Langerhans no habían sido expuestos previamente a un oxidante. Estos experimentos se realizaron en islotes pancreáticos porque, como ya se ha explicado, cuando se incrementa la expresión de enzimas antioxidantes mejora la defensa frente al daño oxidativo, protección especialmente importante en este tejido.

La finalidad ha sido conocer si se producía una sobreexpresión de enzimas protectoras, pero en este caso mediada por la ingesta de aceite, y comprobar si en el grupo AO la expresión enzimática era superior.

Los resultados muestran un incremento significativo en la expresión de CAT y un descenso de SOD para el grupo alimentado con el aceite de oliva. En la bibliografía se recoge cómo las tres enzimas antioxidantes actúan de manera coordinada, de modo que una adecuada defensa no implicaría una sobreexpresión de las tres. Un incremento en la expresión de SOD y GT_{PX} y una disminución de CAT (Reddi *et al.*, 1997) supone una defensa frente a la oxidación en ratas diabéticas, mientras que un aumento de la expresión de SOD en células humanas (Maitre *et al.*, 1993) provoca una menor expresión del RNAm de CAT y GT_{PX} . Los estudios de Hauck *et al.* (2002) con ratones asocian bajos niveles de expresión de CAT y GT_{PX} con peroxidación lipídica en hígado, mientras que en riñón este daño lipídico provocó una mayor expresión de GT_{PX} y menor de SOD.

En otros estudios con roedores se observó que la sobreexpresión gradual de la CAT disminuía la toxicidad del peróxido de hidrógeno en células productoras de insulina (Tiedge *et al.*, 1998), mientras que un aumento de la expresión de la

GT_{PX} (Tiedge *et al.*, 1997), ó de la superóxidodismutasa, MnSOD ó CuZnSOD no aportaba una protección significativa (Lortz *et al.*, 2003). Además, hay un nivel umbral de peróxido de hidrógeno a partir del cual se sobreexpresó la CAT como protección frente al oxidante. La sobreexpresión de estas enzimas citoprotectoras supondría pues un avance en la protección de los islotes pancreáticos humanos contra la destrucción autoinmune.

Los genes de estas tres enzimas protectoras, que en las células β pancreáticas se expresan poco, suponen una defensa fundamental frente a los ROS, de manera que cuando la célula sufre un estrés oxidativo se inducen como respuesta a ese daño (Laybutt *et al.*, 2002). Sin embargo, la modificación de la expresión de enzimas antioxidantes en nuestro estudio no fue un mecanismo de adaptación frente a un daño oxidativo, sino una mayor respuesta en la síntesis del RNA_m modulada por la ingestión de aceite.

Podemos por tanto afirmar que el aceite de oliva virgen tiene también un efecto antioxidante indirecto, mediante la regulación de la expresión de genes, es decir, mejora las defensas enzimáticas antioxidantes.

Como resumen final, la figura 10 recoge los efectos antioxidantes *in vivo* observados en nuestro estudio con aceite de oliva virgen.

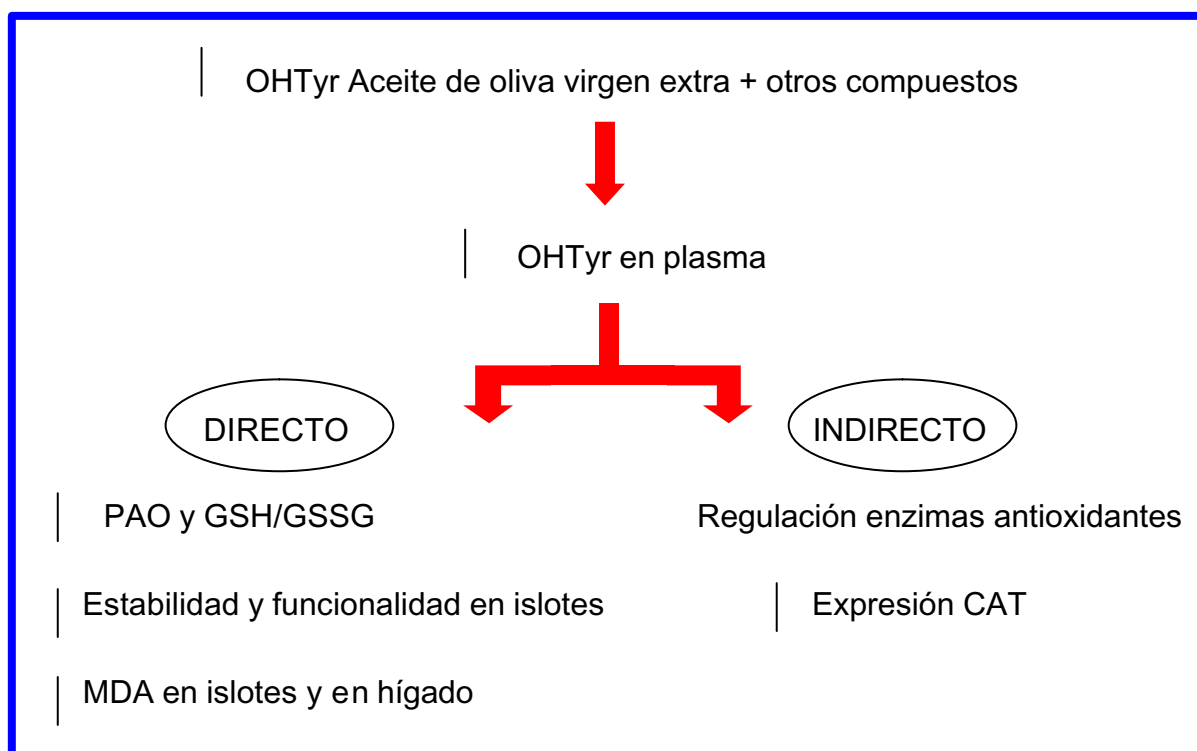


Figura 10: Mecanismos de acción directos e indirectos del aceite de oliva virgen extra en la protección *in vivo* frente al estrés oxidativo.

Para concluir, podemos destacar que el siguiente paso sería demostrar en humanos los efectos beneficiosos *in vivo* de los polifenoles del aceite de oliva virgen extra estudiados en este trabajo con ratones. Además, habría que comprobar si los efectos biológicos se deben al sinergismo entre distintos compuestos antioxidantes presentes en el aceite. Por otra parte, sería interesante estudiar si los efectos beneficiosos de un consumo regular de aceite de oliva virgen extra se manifiestan de forma más relevante en personas con distintos tipos de patologías, sobre todo en las relacionadas con el estrés oxidativo.

Las poblaciones que siguen una dieta mediterránea pueden beneficiarse de los efectos saludables de un alimento natural como es el aceite de oliva virgen extra, lo que es importante para poder recomendar su consumo como estrategia nutricional.

IV. CONCLUSIONES

1. Los aceites estudiados se pueden clasificar como aceites de oliva vírgenes extra y presentan una elevada calidad, de acuerdo con los valores de los parámetros analíticos estudiados. Además, muestran un perfil lipídico idóneo y una relación $\omega 6/\omega 3$ muy adecuada desde el punto de vista nutricional.
2. El α -tocoferol determinado en estos aceites se encuentra en unos niveles suficientes para cubrir, con un consumo diario de aceite, los requerimientos necesarios de esta vitamina. El incremento de la temperatura en el proceso de extracción del aceite produce una disminución significativa de su contenido.
3. Los aceites estudiados presentan un elevado contenido polifenólico, entre los que destacan los fenoles simples hidroxitirosol y tirosol, considerados de los antioxidantes más activos y las flavonas luteolina y apigenina. El tratamiento tecnológico y en concreto, el control de la temperatura, es un factor crítico para mantener la estabilidad de estos polifenoles.
4. El estudio de los compuestos fenólicos ha permitido clasificar aceites españoles e italianos en función de la variedad de aceituna. Los aceites de la variedad Picual presentan características similares a los aceites de la variedad Seggianese. Sin embargo, la composición fenólica de los aceites de la variedad Arbequina es semejante a la de los aceites de la variedad Taggiasca.

Los lignanos son polifenoles mayoritarios en los aceites vírgenes de las variedades Arbequina y Taggiasca. Se ha determinado que el pinoresinol y el acetoxipinoresinol se encuentran en el hueso de la aceituna de ambas variedades, mientras que en la Taggiasca sólo está presente el acetoxipinoresinol en la pulpa.

5. En el estudio con animales de experimentación se ha observado que un consumo diario de aceite de oliva virgen extra rico en polifenoles eleva los niveles de hidroxitirosol plasmáticos. Comprobamos que con una ingesta de tres días se alcanza un nivel máximo de este compuesto en plasma, a dosis determinadas.
6. Los niveles de glutatión reducido y de antioxidantes generales, indican que los ratones alimentados con aceite de oliva virgen extra tienen mayores defensas antioxidantes no enzimáticas. El efecto protector del aceite de oliva virgen extra tiene lugar en parte, por un mecanismo directo de aumento de los niveles de antioxidantes generales.
7. El aceite de oliva virgen extra tiene un efecto directo como antioxidante, ya que disminuye de forma significativa la peroxidación lipídica en las membranas de tejidos fácilmente oxidables.
8. La suplementación con aceite de oliva virgen extra modifica la expresión génica de las enzimas antioxidantes, desempeñando un papel protector frente a la oxidación mediante un mecanismo de acción indirecto, a nivel del núcleo.

CONCLUSIONS

1. The studied oils have a high quality and can be classified as extra virgin olive oils, according to the values obtained for the analytic parameters studied. Moreover, they show a suitable lipid profile and an $\omega 6/\omega 3$ ratio considered appropriate within a nutritional point of view.
2. The α -tocopherol content of these oils is enough to supply the requirements of this vitamin, with a daily ingestion of oil. The increase of temperature in the extraction oil process produces a significant decrease of vitamin's quantity.
3. These oils present a high polyphenolic content, pointing up simple phenols such as hydroxytyrosol and tyrosol, considered one of the most powerful antioxidants, and the flavones luteolin and apigenin. Technological processing, particularly temperature control, is a critical parameter to preserve the stability of these polyphenols.
4. The study of phenolic compounds allowed to classify Spanish and Italian oils in accordance with olive cultivar. Oils from Picual cultivar show similar characteristics to Seggianese oils. Instead, phenolic composition from Arbequina oils looks alike that of Taggiasca variety oils.

Lignans are major polyphenols in virgin oils from Arbequina and Taggiasca cultivars. It has been described that pinoresinol and acetoxypinoresinol are located in olive's stone from both cultivars, whereas in Taggiasca one there is just acetoxypinoresinol in the pulp.

5. The research with laboratory animals revealed that a daily consumption of extra virgin olive oil with high phenolic content, rise up hydroxytyrosol

plasmatic levels. We tested that a three-day ingestion reaches maximum quantity of this compound in plasma, with specific oil dosages.

6. Reduced glutation and general antioxidants levels illustrate that mice fed with extra virgin olive oil have better non-enzymatic antioxidant defenses. The protective effect of extra virgin olive oil takes place, partially, by an indirect mechanism of increasing general antioxidants levels.
7. Extra virgin olive oil has a direct effect as antioxidant, because reduces significantly lipid peroxidation in cell membranes from easily oxidable tissues.
8. Supplementation with extra virgin olive oil modifies genic expression of antioxidant enzymes, performing a protective role against oxidation through an action mechanism in cell nucleus.

V. BIBLIOGRAFÍA

Abuja P.M., Albertini R. Methods for Monitoring Oxidative Stress, Lipid Peroxidation and Oxidation Resistance of Lipoproteins. *Clin. Chim. Acta.* 2001; 306, 1-17.

Agati G., Pinelli P., Cortés S., Romani A., Cartelat A., Cerovic Z.G. Nondestructive Evaluation of Anthocyanins in Olive (*Olea europaea*) Fruits by in Situ Chlorophyll Fluorescence Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53, 1354-1363.

Albalá-Hurtado S., Novella-Rodríguez S., Veciana-Nogués M.T., Mariné-Font A. Determination of Vitamins A and E in Infant Milk Formulae by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A.* 1997; 778, 243-246.

Allouche N., Fki I., Sayadi S. Toward a High Yield recovery of Antioxidants and Purified Hydroxytyrosol from Olive Mill Wastewaters. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52, 267-273.

Amirante P., Catalana P., Amirante R., Clodoveo M.L., Leone A., Tamborino A. Prove Sperimentali di Estrazione di Oli da Olive Snocciolate. *Olive e Olio.* 2002; 6, 16-22.

Amirante R., Cini E., Montel G.L., Pasqualone A. Influencia del Batido y de los Parámetros de Extracción en la Calidad del Aceite de Oliva Virgen. *Grasas y Aceites.* 2001; 52(3-4), 198-201.

Ananthan R., Latha M., Ramkumar K.M., Pari L., Baskar C., Narmatha V. Modulatory Effects of *Gymnema montanum* Leaf Extract on Alloxan-Induced Oxidative Stress in Wistar Rats. *Nutrition.* 2004; 20, 280-285.

Andrews P., Johanneke L., Busch H.C., De Joode T., Groenewegen A., Alexandre H. Sensory Properties of Virgin Olive Oil Polyphenols: Identification of Deacetoxy-Ligstroside Aglycon as a Key Contributor to Pungency. 2003; 51, 1415-1420.

Angerosa F., di Giovacchino L. Antioxidantes Naturales de Aceite de Oliva Virgen obtenido por Decantadores Centrifugos de Dos y Tres Fases. *Grasas y Aceites*. 1996; 47(4), 247-254.

Aparicio R., Harwood J. Manual del Aceite de Oliva. Ed. Madrid Vicente, Mundiprensa. Madrid, 2003.

Aparicio R., Luna G. Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002; 104, 614-627.

Arantes V.C., Teixeira V.P., Reis M.A., Latorraca M.Q., Leite A.R., Carneiro E.M., Yamada A.T., Boschero A.C. Expresión of PDX-1 is reduced in Pancreatic Islets from Pups of Rat Dams Fed a Low Proteein Diet during Gestation and Lactation. *J. Nutr.* 2002; 132, 3030-3035.

Asgary S., Naderi G.H., Sarrafzadegan N., Mohammadifard N., Mostafavi S., Vakili R. Antihypertensive and Antihyperlipidemic Effects of *Achillea Wilhelmsii*. *Drugs Exp. Clin. Res.* 2000; 26, 89-93.

Aust O., Sies H., Stahl W., Polidori M.C. Analysis of Lipophilic Antioxidants in Human Serum and Tissues: Tocopherols and Carotenoids. *Journal of Chromatography A*. 2001; 936, 83-93

Baddi G.A., Hafidi M., Merlina G., Revel J.C. Characterization and Identification of Polyphenols during Composting of Olive Mill Waste. *Agrochimica*. 2003; 47, 161-172.

Baldioli M., Servili M., Perreti G., Montedoro G.F. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996; 73, 1589-1593.

Baraldi P.G., Simoni D., Manfredini S., Menziani E. Preparation of 3,4-dihydroxy-1-benzeneethanol: A reinvestigation. *Liebigs Ann. Chem.* 1983; 684-686.

Barranco D., Fernández Escobar R., Rallo L. El Cultivo del Olivo. Ed. Junta de Andalucía, Mundiprensa. Madrid, 1997.

Bellosta S., Dell'Agli M., Canavesi M., Mitro N., Monetti M., Crestani M., Verotta L., Fuzzati N., Bernini F., Bosisio E. Inhibition of Metalloproteinase-9 Activity and Gene Expression by Polyphenolic Compounds Isolated from the Bark of *Tristaniopsis Calobuxus* (Myrtaceae). *Cell. Mol. Life Sci.* 2003; 60, 1440-1448.

Bendini A., Bonoli M., Cerretani L., Biguzzi B., Lercker G., Toschi T.G. Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *Journal of Chromatography A* 2003; 985, 425-433.

Berra B., Caruso D., Cortesi N., Fedeli E., Raseti M.F., Galli G. Antioxidant Properties of Minor Polar Components of Olive Oil on the Oxidative Processes of Cholesterol in Human LDL. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*. 1995; 72, 285-288.

Bianchi G., Pozzi N. 3,4-Dihydroxyphenylglycol, a major C₆-C₂ Phenolic in *Olea europaea* Fruits. *Phytochemistry*. 1994; 35, 1335-1337.

Boersma B.J., Barnes S., Kirk M., Wang C.C., Smith M., Kim H., Xu J., Patel R., Darley-Usmar V.M. Soy Flavonoids and Cancer. Metabolism at the Target Site. *Mutat. Res.* 2001; 480, 121-127.

Bonner-Weir S. Anatomy of the islet of Langerhans. The endocrine pancreas. Ed. Samols E., Raven Press. Nueva York, 1991.

Bonoli M., Bendini A., Cerretani L., Lercker G., Toschi T.G. Qualitative and Semiquantitative Analysis of Phenolic Compounds in Extra Virgin Olive Oils as a Function of the Ripening Degree of Olive Fruits by Different Analytical Techniques. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52, 7026-7032.

Bonoli M., Montanucci M., Toschi T.G., Lercker G. Fast Separation and Determination of Tyrosol, Hydroxytyrosol and other Phenolic Compounds in Extra Virgin Olive Oil by Capillary Zone Electrophoresis with Ultraviolet-Diode Array Detection. *J. Chrom. A* 2003; 1011, 163-172.

Botsoglou N., Fletouris D., Psomas I., Mantis A. Rapid Gas Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Cholesterol and Alpha-Tocopherol in Eggs. *Journal of AOAC International*. 1998; 81(6), 1177-1183.

Bouaziz M., Grayer R.J., Simmonds M., Damak M., Sayadi S. Identification and Antioxidant Potential of Flavonoids and Low Molecular Weight Phenols in Olive Cultivar Chemlali Growing in Tunisia. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53, 236-241.

Brash D.E., Havre P.A. New Careers for Antioxidants. *PNAS*. 2002; 99, 13969-13971.

Brenes M., García A., García P., Ríos J.J., Garrido A. Phenolic Compounds in Spanish Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47, 3535-3540.

Brenes M., García A., García P., Garrido P. Rapid and Complete Extraction of Phenols from Olive Oil and Determination by means of a Colourimetric Electrode Array System. *J. Agric. Food Chem.* 2000a; 48, 5178-5183.

Brenes M., Hidalgo F.J., García A., Ríos J.J., García P., Zamora R., Garrido A. Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2000b; 77, 715-720.

Brenes M., García A., Ríos J.J., García P., Garrido A. Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *Internacional Journal of Food Science and Technology*. 2002; 37, 615-625.

Buetler T.M., Renard M., Offord E.A., Schneider H., Ruegg U.T. Green Tea Extract Decreases Muscle Necrosis in Mdx Mice and Protects against ROS. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002; 75, 749-753.

Burri B.J., Dopler-Nelson M., Neidlinger T.R. Measurements of the Major Isoforms of Vitamins A and E and Carotenoids in the Blood of People with Spinal-Cord Injuries. *Journal of Chromatography A*. 2003; 987, 359-366.

Caruso D., Colombo R., Patelli R., Giavarini F., Galli G. Rapid Evaluation Of Phenolic Component Profile and Analysis of Oleuropein Aglycon in Olive Oil by Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry (APCI-MS). *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48, 1182-1185.

Ceriello A. New Insights on Oxidative Stress and Diabetic Complications May Lead to a "Causal" Antioxidant Therapy. *Diabetes Care*. 2003; 26, 1589-1596.

Ceriello A. Oxidative Stress and Glycemic Regulation. *Metabolism*. 2000; 49, 27-29.

Ceriello A., Bortolotti N., Motz E., Lizzio S., Pirisi M., Russo A., Selmo V., Catone , Tonutti L., Taboga C. Meal-Generated Oxidative Stress in Diabetes. The Protective Effect of Red Wine. *Diabetes Care*. 1999; 22, 2084-2085.

Ceriello A., Bortolotti N., Pirisi M., Crescentini A., Tonutti L., Motz E., Russo A., Giacomello R., Stel G., Taboga C. Total Plasma Antioxidant Capacity Predicts Thrombosis-Prone Status in NIDDM Patients. *Diabetes Care*. 1997; 20, 1589-1593.

Ceriello A., Mercuri F., Quagliari L., Assaloni R., Motz E., Tonutti L., Taboga C. Detection of Nitrotyrosine in the Diabetic Plasma: Evidence of Oxidative Stress. *Diabetologia*. 2001; 44, 834-838.

Chandra J., Zhivotovsky B., Zaitsev S., Juntti-Berggren L., Berggren P.O., Orrenius S. Role of Apoptosis in Pancreatic Beta-Cell Death in Diabetes. *Diabetes*. 2001; 50, S44-S47.

Chen C., Yu R., Owuor., Kong A.N. Activation of Antioxidant-Response Element (ARE), MAPKs and Caspases by Major Green Tea Polyphenol Components during Cell Survival and Death. *Archives of Pharm. Res.* 2000; 23, 605-612.

Chen Z.Y., Zhu Q.Y., Tsang D., Huang Y. Degradation of Green Tea Catechins in Tea Drinks. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49, 477-482.

Cinquanta J., Esti M., La Notte E. Evolution of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil during Storage. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997; 74, 1259-1264.

Cornwell T., Wendie C., Raskin I. Dietary Phytoestrogens and Health. *Phytochemistry.* 2004; 65, 995-1016.

Cortesi N., Azzolini M., Rovellini P. Dosaggio dei Componenti Minori Polari (CMP) in Oli Vergini di Oliva. *Riv. Ital. Sostanze Grasse.* 1995b; 72, 333-337.

Cortesi N., Azzolini M., Rovellini P. I Componenti Minori Polari degli Oli Vergini di Oliva: Ipotesi di struttura mediante LC-MS. *Riv. Ital. Sostanze Grasse.* 1995a; 72, 241-251.

Covas M.I., Miró-Casas E., Fitó M, Farré-Albadalejo M, Gimeno E., Marrugat J., De La Torre R. Bioavailability of Tyrosol, an Antioxidant Phenolic Compound Present in Wine and Olive Oil, in Humans. *Drugs Exp. Clin. Res.* 2003 ; 29, 203-206.

Dashwood W.M., Orner G.A., Dashwood R.H. Inhibition of β -Catenin/Tcf Activity by White Tea, Green Tea and EGCG: Minor Contribution of H_2O_2 at Physiologically Relevant EGCG Concentrations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 296, 584-588.

de la Puerta R., Ruiz-Gutiérrez V. Efecto Protector de los Polifenoles del Aceite de Oliva Virgen en Sistemas de Liberación de Radicales Libres y Eicosanoides. *Clínica e Investigación en Arterioesclerosis.* 2000; 12, 183-190.

de la Puerta R., Ruiz-Gutiérrez V., Houlst J.R. Inhibition of Leukocyte 5-Lipoxygenase by Phenolics from Virgen Olive Oil. *Biochem. Pharmacol.* 1999; 57, 445-449.

Deepak M., Handa S. Antiinflammatory Activity and Chemical Composition of Extracts of *Verbena officinalis*. *Phytother. Res.* 2000; 14, 463-465.

Deiana M., Rosa A., Cao C.F., Pirisi F.M., Bandino G., Dessi M.A. Novel Approach to Study Oxidative Stability of Extra Virgin Olive Oils: Importance of Alpha-Tocopherol Concentration. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50(15), 4342-4346.

Del Boccio P., Di Deo A., De Curtis A., Celli N., Iacoviello L., Rotilio D. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Oleuropein and its Metabolite Hydroxytyrosol in Rat Plasma and Urine after Oral Administration. *J. Chrom. B.* 2003; 785, 47-56.

Directiva (CEE) nº45/2000 de la Comisión de 6 de julio de 2000, por la que se fijan los Métodos de Análisis Comunitarios para la Determinación de Vitamina A, Vitamina E y Triptófano en los Piensos (DOCE nºL174 de 13.07.2000).

Droge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 2002; 82, 47-95.

Duthie G.G., Pedersen M.W., Gardner P.T., Morrice P.C., Jenkinson A.M., McPhail D.B., Steele G.M. The Effect of Whisky and Wine Consumption on Total Phenol Content and Antioxidant Capacity on Plasma from Healthy Volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1998; 52, 733-736.

Erba D., Riso P., Criscuoli F., Testolin G. MDA Production in Jurkat T Cells Subjected to Oxidative Stress. *Nutrition.* 2003; 19, 545-548.

Escrivá A., Esteve M.J., Farré R., Frígola A. Determination of Liposoluble Vitamin in Cooked Meals, Milk and Milk Products by Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A.* 2002; 947, 313-318.

Esterbauer H., Cheeseman K.H. Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products: Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186, 407-421.

Exner R., Wessner B., Manhart N., Roth E. Therapeutic Potential of Glutathione. *Wien Klin Wochenschr.* 2000; 14, 610-616.

Facchini F.S., Saylor K.L. A Low Iron Available, Polyphenol Enriched, Carbohydrate restricted Diet to Slow Progression of Diabetic Nephropathy. *Diabetes*. 2003; 52, 1204-1209.

Fang Y.Z., Yang S., Wu G. Free Radicals, Antioxidants and Nutrition. *Nutrition*. 2002; 18, 872-879.

Feng R., He W., Ochi H. A New Murine Oxidative Stress Model Associated with Senescence. *Mech. Ageing Dev.* 2001; 122, 547-559.

Fernández-Pachón M. S., Villaño D., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C. Antioxidant Capacity of Plasma after Red Wine Intake in Human Volunteers *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53, 5024-5029.

Finkel T. A Toast to Long Life. *Nature*. 2003; 425, 132-133.

Fitó Colomer M. Efectos Antioxidantes del Aceite de Oliva y de sus Compuestos Fenólicos. Tesis Doctoral. Universidad Barcelona. 2003.

Frega N., Caglioti L., Mozzon M. Oli Estratti da Olive Denocciolate: Composizione Chimica e Parametri di Qualità. *Olivo e Olio*. 1999; 12, 40-44.

Friedman J., Peleg E., Kagan T., Shnizer S., Rosenthal T. Oxidative Stress in Hypertensive, Diabetic and Diabetic Hypertensive Rats. *Am. J. Hypertension*. 2003; 16, 1049-1052.

Galli C., Visioli F. Antioxidant and Other Activities of Phenolics in Olives/Olive Oil, Typical Components of the Mediterranean Diet. *Lipids* 1999; 34, S23-S26.

Ganafa A.A., Socci R.R., Eatman D., Silvestrova N., Abukhalaf I.K., Bayo M.A. Acute Inhibition of Glutathione Biosynthesis Alters Endothelial Function and Blood Pressure in Rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 454, 217-223.

García A., Brenes M., Romero C., García P., Garrido A. Study of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil of Picual Variety. *European Food Research and Technology*. 2002; 215, 407-412.

Giacometti J., Milin C. Composición y Parámetros de Calidad de Aceites de Oliva Vírgenes Producidos en el Norte de la Región Adriática, República de Croacia. *Grasas y Aceites*. 2001; 52(6), 397-402.

Gimeno E., Calero E., Castellote A.I., Lamuela-Raventós R.M., de la Torre-Boronat M.C., López-Sabater M.C. Simultaneous Determination of α -Tocopherol and β -Caroteno in Olive Oil by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2000; 881, 255-259.

Gimeno E., Castellote A.I., Lamuela-Raventós R.M., de la Torre-Boronat M.C., López-Sabater M.C. Rapid High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Retinol, α -Tocopherol and β -Carotene in Human Plasma and Low-Density Lipoproteins. *J. Chromatogr.* 2001; 758, 315-322.

Gimeno E., Castellote A.I., Lamuela-Raventós R.M., de la Torre-Boronat M.C., López-Sabater M.C. The Effects of Harvest and Extraction Method on Antioxidants (Phenolics, α -Tocopherol and β -Carotene) Content in Virgin Olive Oil. *Food Chem.* 2002a; 78, 207-211.

Gimeno E., Fitó M., Lamuela-Raventós R.M., Castellote A.I., Covas M., Farre M., De la Torre Boronat M.C., López-Sabater M.C. Effect of Ingestion of Virgin Olive Oil on Human Low-Density Lipoprotein Composition. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2002b; 56, 114-120.

Giustarini D., Dalle-Donne I., Colombo R., Milazani A., Rossi R. An Improved HPLC Measurement for GSH and GSSG in Human Blood. *Free Radic. Biol. Med.* 2003; 35, 1365-1372.

Gohil K., Packer L. Bioflavonoid-Rich Botanical Extracts Show Antioxidant and Gene regulatory Activity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2002; 957, 70-77.

Gómez Candela C. El papel de los ácidos grasos ω 3: estudios clínicos. *Nutrición Clínica*. 2002; XXII/204(6), 56-58.

Gómez-Alonso S., Salvador M.D., Fregapane G. Phenolic Compounds Profile of Cornicabra Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50, 6812-6817.

Gordon M.H., Paiva-Martins F., Almeida M. Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol Acetate Compared with That of Other Olive Oil Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49, 2480-2485.

Gracia M.S. Composición Química de Distintas Calidades de Aceites de Oliva Virgen de la Variedad "Empeltre" en el Bajo Aragón. *Grasas y Aceites*. 2001; 52(1), 52-58.

Gutfinger T. Polyphenols in Olive Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1981; 58, 966-968.

Gutiérrez F., Fernández J.L. Determinant Parameters and Components in the Storage of Virgin Olive Oil. Prediction of Storage Time beyond which the Oil is No Longer of "Extra" Quality. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50, 571-577.

Gutiérrez-Rosales F., Ríos J.J., Gómez-Rey L. Main Polyphenols in the Bitter Taste of Virgin Olive Oil. Structural Confirmation by On-Line HPLC Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51, 6021-6025.

Gutteridge J.M., Halliwell B. Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000. A Historical Look to the Future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000; 899, 136-147.

Hall S. In Vino Vitalis? Compounds Activate Life-Extending Genes. *Science*. 2003; 301, 1165.

Halliwell B. Health Benefits of Eating Chocolate? *Nature*. 2003, 424, 787.

Hauck S.J., Aaron J.M., Wright C., Kopchick J.J., Bartke A. Antioxidant Enzymes, Free-radical Damage and Response to Paraquat in Liver and Kidney of Long-Living

Growth Hormone receptor/Binding Protein Gene-Disrupted Mice. *Horm. Metab. Res.* 2002; 34, 481-486.

Higdon J., Frei B. Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism and Antioxidant Functions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2003; 43, 89-143.

Hong J.H., Kim M.J., Park M.R., Kwag O.G., Lee I.S., Byun B.H., Lee S.C., Lee K.B., Rhee S.J. Effects of Vitamin E on Oxidative Stress and Membrane Fluidity in Brain of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Clin. Chim. Acta.* 2004; 340, 107-115.

Hopia A., Heinonen M. Antioxidant Activity of Flavonol Aglycones and their Glucosides in Methyl Linoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1999; 76, 139-144.

Howitz K. T., Bitterman K.J., Cohen H.Y., Lamming D.W., Lavu S., Wood J.G., Ipkin R.E., Chung P., Kisielewski A., Zhang L. Scherer B. Sinclair D. Small Molecule Activators of Sirtuins Extend *Saccharomyces cerevisiae* Lifespan. *Nature.* 2003; 425, 191-196.

Ibern-Gómez M., Andrés-Lacueva C., Lamuela-Raventós R.M., Waterhouse A.L. Rapid HPLC Method For Phenolic Compounds In Red Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 2002, 53, 218-221.

Ibrahim W., Lee U.S., Yeh C.C., Szabo J., Bruckner G., Chow C.K. Oxidative Stress and Antioxidant Status in Mouse Liver: Effects of Dietary Lipid, Vitamin E and Iron. *J. Nutr.* 1997; 127, 1401-1406.

Iwase H. Determination of Tocopherol Acetate in Emulsified Nutritional Supplements by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of Chromatography A.* 2000; 881, 243-249.

Janice F.W., Schramm D.D., Holt R.R., Ensunsa J.L., Fraga C.G., Schmitz H.H., Keen C.L. A Dose-Response Effect from Chocolate Consumption on Plasma Epicatechin and Oxidative Damage. *J. Nutr.* 2000; 130, 2115S-2119S.

Jankun J., Selman H.S., Swiercz R. Why Drinking Green Tea Could Prevent Cancer. *Nature*. 1997; 387, 561.

Jenninngs P.E., Belch J.J. Free radical Scavenging Activity of Sulfonilureas: A Clinical Assesment of the Effect of Gliclazide. *Metabolism*. 2000; 49, 23-26.

Jessup J.V., Horne C., Yarandi H., Quindry J. The Effects of Endurance Exercise and Vitamin E on Oxidative Stress in the Elderly. *Biol. Res. Nurs.* 2003; 5, 47-55

Jiménez A., Hermoso M., Uceda M. Elaboración del Aceite de Oliva Virgen Mediante Sistema Continuo en Dos Fases. Influencia de Diferentes Variables del Proceso en Algunos Parámetros Relacionados con la Calidad del Aceite. *Grasas y Aceites*. 1995; 46(4-5), 299-303.

Kadowaki E., Yoshida Y., Nitoda T., Baba N., Nakajima S. (-)-Olivil and (+)-1-Acetoxy-pinoreosinol from the Olive Tree (*Olea europaea* LINNE Oleaceae) as Feeding Stimulants of the Olive Weevil (*Dyscerus perforatus*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003; 67 (2), 415-419.

Kaneto H., Fujii J., Myint T., Miyazawa N., Islam K.N. Kawasaki Y., Suzuki K., Nakamura M., Tatsumi H., Yamasaki Y., Taniguchi N. Reducing Sugars Trigger Oxidative Modification and Apoptosis in Pancreatic β -Cells by Provoking Oxidative Stress through the Glycation Reaction. *J. Biochem.* 1996; 320, 855-863.

Kang M.H. Sesamol Inhibits Lipid Peroxidation in Rat Liver and Kidney. *J. Nutr.* 1998; 128, 1018-1022.

Kang M.H., Naito M., Sakai K., Uchida K., Osawa T. Mode of Action of Sesame Lignans in Protecting Low-Density Lipoprotein Against Oxidative Damage *in vitro*. *Life Sci*. 2000; 66, 161-171.

Kay T.W., Thomas H.E., Harrison L.C., Allison J. The β Cell in Autoimmune Diabetes: Many Mechanisms and Pathways of Loss. *Trends Endocrinol. Metab.* 2000; 11, 11-15.

Kesavulu M.M., Rao B.K., Giri R., Vijaya J., Subramanyam G., Apparao C. Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Status in Type 2 Diabetics with Coronary Heart Disease. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2001; 53, 33-39.

Khallouki F., Younos C., Soulimani R., Oster T., Charrouf Z., Spiegelhalter B., Bartsch H, Owen R.W. Consumption of Argan Oil (Morocco) with its Unique Profile of Fatty Acids, Tocopherols, Squalene, Sterols and Phenolic Compounds Should Confer Valuable Cancer Chemopreventive Effects. *Eur. J. Cancer Prev.* 2003; 12 (1), 67-75.

Kim J., Chehade J., Pinnas J.L., Arshag D.M. Effect of Select Antioxidants on MDA Modification of Proteins. *Nutrition.* 2000; 16, 1079-1081.

Kimoto K., Suzuki K., Kizaki T., Hitomi Y., Ishida H., Katsuta H., Itoh E., Ookawara T., Suzuki K., Honke K., Ohno H. Gliclazide Protects Pancreatic β -Cells from Damage by Hydrogen Peroxide. *Biochem. BioPhys. Res.* 2003; 303, 112-119.

Kong A.N., Owuor E., Hebbar V., Chen C., Hu R., Mandlekar S. Induction of Xenobiotic Enzymes by the MAP Kinase Pathway and the Antioxidant or Electrophile Response Element. *Drug Metab. Rev.* 2001; 33, 255-271.

Kundu J.K., Na H.K., Chun K.S., Kim Y.K., Lee S.J., Lee S.S., Lee S.O., Sim Y.J. Inhibition of Phorbol Ester-Induced COX-2 Expression by EGCG in Mouse Skin and Cultured Human Mammary Epithelial Cells. *J. Nutr.* 2003; 133, 3805S-3810S.

Lambert *et al.* Inhibition of Carcinogenesis by Polyphenols Evidence from Laboratory Investigations. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005; 81, 284.

Lapidot T., Walker M.D., Kanner J. Antioxidant and Prooxidant Effects of Phenolics on Pancreatic Beta-Cells *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50, 7220-7225.

Lavelli V. Comparison of the Antioxidant Activities of Extra Virgin Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50, 7704-7708.

Lavelli V., Bondesan L. Secoiridoids, Tocopherols and Antioxidant Activity of Monovarietal Extra Virgin Olive Oils Extracted from Destoned Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53, 1102-1107.

Laybutt D.R., Kaneto H., Hasenkamp W., Grey S., Jonas J.C., Sgroi D.C., Groff A., Ferran C., Bonner-Weir S., Sharma A., Weir G.C. Increased Expression of Antioxidant and Antiapoptotic Genes in Islets that May Contribute to β -Cell Survival during Chronic Hyperglycemia. *Diabetes.* 2002; 51, 413-423.

Lenzen S., Drinkgern J., Tiedge M. Low Antioxidant Enzyme Gene Expression in Pancreatic Islets Compared with Various Other Mouse Tissues. *Free Radic. Biol. Med.* 1996; 20, 463-466.

Lesage-Meessen L., Navarro D., Maunier S., Sigoillot J.C., Lorquin J., Delattre M., Simon J.L., Asther M., Labat M. Simple Phenolic Content in Olive Oil Residues as a Function of Extraction Systems. *Food Chem.* 2001; 75, 501-507.

Lin S.J., Defossez P.A., Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for Life-Span Extension by Calorie Restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science.* 2000; 289, 2126-2128.

Lissi E., Salim-Hanna M., Pascual C., del Castillo M.D. Evaluation of Total Antioxidant Potential (TRAP) and Total Antioxidant Reactivity from Luminol-Enhanced Chemiluminescence Measurements. *Free Radic. Biol. Med.* 1995; 18, 153-158.

Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods.* 2001; 25, 402-408.

Lodge J.K., Traber M.G., Elsner A., Brigelius-Flohé R. A Rapid Method for the Extraction and Determination of Vitamin E Metabolites in Human Urine. *J. Lipid. Res.* 2000; 41, 148.

Lortz S., Tiedge M. Sequential Inactivation Of Reactive Oxygen Species By Combined Overexpression Of Sod Isoforms And Catalase In Insulin-Producing Cells. *Free Rad. Biol. Med.* 2003; 34, 683-688.

Lortz S., Tiedge M., Nachtwey T., Karlsen A.E., Nerup J., Lenzen S. Protection of Insulin-Producing RINm5F Cells Against Cytokine-Mediated Toxicity Through Overexpression of Antioxidant Enzymes. *Diabetes.* 2000; 49, 1123-1130.

M.C. S., Kuttan R. Antidiabetic Activity of Green Tea Polyphenols and Their Role in Reducing Oxidative Stress in Experimental Diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 2002; 83, 109-116.

Maitre B., Jornot L., Junod A.F. Effects of Inhibition of Catalase and Superoxide Dismutase Activity on Antioxidant Enzyme mRNA Levels. *Am. J. Physiol.* 1993; 265, L636-643.

Manna C., Galletti P., Cucciolla V., Moltedo O., Leone A., Zappia V. The Protective Effect of the Olive Oil Polyphenol (3,4-Dihydroxyphenyl)-ethanol Counteracts Reactive Oxygen Metabolite-Induced Cytotoxicity in Caco-2 Cells. *J. Nutr.* 1997; 127, 286-292.

Maraschiello C., Esteve E., García Regueiro J.A. Cholesterol Oxidation in Meat from Chickens Fed Alpha-Tocopherol and Beta-Carotene-Supplemented Diets with Different Unsaturation Grades. *Lipids.* 1998;33(7), 705-13.

Marín Sáez R.M., Llobat Estellés M., Castellote F., Maurí Aucejo A.R. Identificación de Tocoferoles en Aceites Vegetales mediante el Método de las Curvas de Contenido Aparente. *I Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Calidad y Seguridad Alimentaria.* 2001.

Marra G., Cotroneo P., Pitocco D., Manto A., Di Leo M.A., Ruotolo V., Caputo S., Giardina B., Ghirlanda G., Santini A. Early Increase of Oxidative Stress and Reduced Antioxidat defenses in Patients with Uncomplicated Type 1 Diabetes: a Case for Gender Difference. *Diabetes Care.* 2002; 25, 370-372.

Martín F., Ribas J., Soria B. Cytosolic Ca²⁺ gradients in pancreatic islet-cells stimulated by glucose and carbachol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 235, 465-468.

Martín-Gallán P., Carrascosa A., Gussinyé M., Domínguez C. Biomarkers of Diabetes-Associated Oxidative Stress and Antioxidant Status in Young Diabetic Patients with or without Subclinical Complications. *Free Rad. Biol. Med.* 2003; 34, 1563-1574.

Mataix Verdú J. Aceite de Oliva Virgen: Nuestro Patrimonio Alimentario. Ed. Universidad de Granada, Puleva Food. Granada, 2001.

Mataix Verdú J., Martínez de Vitoria E. Bases para el futuro, El Aceite de Oliva. Ed. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla, 1988.

Mateos R., Domínguez M.M., Espartero J.L., Cert A. Antioxidant Effect of Phenolic Compounds, Alpha-Tocoferol, and other Minor Components in Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51(24), 7170-7175.

Mateos R., Espartero J.L., Trujillo M., Ríos J.J., León-Camacho M., Alcudia F., Cert A. Determination of Phenols, Flavones and Lignans in Virgin Olive Oils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49, 2185-2192.

Matsuoka T., Kajimoto Y., Watada H., Kaneto H., Kishimoto M., Umayahara Y., Fujitani Y., Kamada T., Kawamori R., Yamasaki Y. Glication-Dependent, ROS-Mediated Suppression of the Insulin Gene Promoter Activity in HIT Cells. *J. Clin. Invest.* 1997; 99, 144-150.

McCord J.M. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *Am. J. Med.* 2000; 108, 652-659.

Meagher L., Beecher G., Flanagan V., Li B. Isolation and Characterization of the Lignans Isolariciresinol and Pinoresinol, in flaxseed Meal. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47, 3173-3180.

Mercuri F., Quagliari L., Ceriello A. Oxidative Stress Evaluation in Diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* 2000; 2, 589-600.

Milder I., Arts I., Venema D., Lasaroms J., Wähälä K., Hollman H. Optimization of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Quantification of the Plant Lignans Secoisolariciresinol, Matairesinol, Lariciresinol, and Pinoresinol in Foods. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52, 4643-4651.

Miller N.J., Rice-Evans C.A. Antioxidant Activity of Resverastrol in Red Wine. *Clin. Chem.* 1995; 41, 1789.

Miró-Casas E., Farré-Albadalejo M., Covas Planells M.I., Fitó Colomer M., Lamuela Raventós R.M., de la Torre F.R. Tyrosol Bioavailability in Humans After Ingestion of Virgin Olive Oil. *Clin. Chem.* 2001a; 47, 341-343.

Miró-Casas E., Farré-Albadalejo M., Covas Planells M.I., Rodríguez J.O., Menoyo C.E., Lamuela Raventós R.M., de la Torre R. Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry Quantitative Determination of Hydroxytyrosol and Tyrosol in Human Urine After Olive Oil Intake. *Anal. Biochem.* 2001b; 294, 63-72.

Miró-Casas E., Covas Planells M.I., Fitó Colomer M., Farré-Albadalejo M., Marrugat J., de la Torre R. Tyrosol and Hydroxytyrosol are Absorbed from Moderate and Sustained Doses of Virgin Olive Oil in Humans. *European Journal of Clinical Nutrition.* 2002; 57, 186-190.

Montedoro G., Servili M., Baldioli M., Miniati E. Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 1. Their Extraction, Separation, and Quantitative and Semiquantitative Evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 1992a; 40, 1571-1576.

Montedoro G., Servili M., Baldioli M., Miniati E. Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 2. Initial Characterization of the Hydrolyzable Fraction. *J. Agric. Food Chem.* 1992b; 40, 1577-1580.

Montedoro G., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A. Simple and Hydrolyzable Compounds in Virgin Olive Oil. 3. Spectroscopic Characterization of the Secoiridoid Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 1993; 41, 2228-2234.

Morelló J.R., Vuorela S., Romero M.P., Motilva M.J., Heinonen M. Antioxidant Activity of Olive Pulp and Olive Oil Phenolic Compounds of the Arbequina Cultivar. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53, 2002-2003.

Mosca L., DeMarco C., Visioli F., Cannella C. Enzymatic Assay for the Determination of Olive Oil Polyphenol Content: Assay Conditions and validation of the Method. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48, 297-301.

Motilva M.J., Jaria I., Bellart I., Romero M.P. Estudio de la Calidad del Aceite de Oliva Virgen de la Denominación de Origen "Les Garrigues" (Lleida) durante la Campaña 1995/1996. *Grasas y Aceites.* 1998; 49(5-6), 425-433.

Motilva M.J., Ramo T., Romero M.P. Caracterización Geográfica de los Aceites de Oliva Vírgenes de la Denominación de Origen Protegida "Les Garrigues" por su Perfil de Ácidos Grasos. *Grasas y Aceites.* 2001; 52(1), 26-32.

Mounsey A. Diet May Slow Progression of Diabetic Nephropathy. *J. Fam. Pract.* 2003; 52, 672-673.

Mukhtar H., Ahmad N. Green Tea Chemoprevention of Cancer. *Toxicol. Sci.* 1999; 52, 111-117.

Mulinacci N., Romani A., Galardi C., Pinelli P., Giaccherini C., Vincieri F.F. Polyphenolic Content in Olive Oil Wastewaters and Related Olive Samples. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49, 3509-3514.

Mulinacci N., Giaccherini C., Ieri F., Romani A., Vincieri F.F. Evaluation of Lignans and Free and Linked Hydroxy-Tyrosol and Tyrosol in Extra Virgin Olive Oil after Hydrolysis Processes. *In press*, 2005a.

Mulinacci N., Giaccherini C., Innocenti M., Romani A., Vincieri F.F., Marotta F., Mattei A. Analysis of Extra Virgin Olive Oils from Stoned Olives. *Revista J. Science Food Agric. In press*, 2005b.

Nadal A., Quesada I., Soria B. Homologous and Heterologous Asynchronicity between Identified Alpha-, Beta- and Delta-Cells within Intact Islets of Langerhans in The Mouse. *J. Physiol.* 1999; 517, 85-93.

Nakamura Y., Tsuji S., Tonogai Y. Determination of the Levels of Isoflavonoids in Soybeans and Soy-Derived Foods and Estimation of Isoflavonoids in the Japanese Daily Intake. *J. AOAC. Int.* 2000; 83, 635-650.

Natsume M., Osakabe N., Oyama M., Sasaki M., Baba S., Nakamura Y., Osawa T., Terao J. Structures of (-)-Epicatechin Glucuronide Identified from Plasma and Urine after Oral Ingestion of (-)-Epicatechin: Differences between Human and Rat. *Free Radical Biol.* 2003; 34, 341-344.

Navarro J., Obrador E., Pellicer J.A., Aseni M., Vina J., Estrela J.M. Blood Glutathione as an Index of Radiation-Induced Oxidative Stress in Mice and Humans. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 22, 1203-1209.

Negishi H., Xu J.W., Ikeda K., Njelekela M., Nara Y., Yamori Y. Black and Green Tea Polyphenols Attenuate Blood Pressure Increases in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Nutr.* 2004; 134, 38-42.

Niki E. Antioxidant Activity: Are We Measuring It Correctly?. *Nutrition.* 2002; 18, 524-525.

Ntambi J.M. Regulation of Stearoyl-CoA desaturase by Polyunsaturated Fat Acids and Cholesterol. *J. Lipid Res.* 1999; 40, 1549-1558.

O'Brien R.C., Luo M., Balazs N., Mercuri J. *In vitro* and *In vivo* Antioxidant Properties of Gliclazide. *J. Diabetes Complications.* 2000; 14, 201-206.

Obied H., Allen M.S., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Robards K., Stockmann R. Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53, 823-837.

Opara EC, Garfinkel M, Hubbard VS, Burch WM, Akwari OE. Effect of fatty acids on insulin release: role of chain length and degree of unsaturation. *Am J Physiol.* 1994; 266, 635-639.

Orzechowski A., Ostaszewski P., Jank M., Berwid S.J. Bioactive Substances of Plant Origin in Food-Impact on Genomics. *Reprod. Nutr. Dev.* 2002; 42, 461-477.

Owen R.W., Giacosa A., Hull W.E., Haubner B., Spiegelhalder B., Bartsch H. The Antioxidant/Anticancer Potential of Phenolic Compounds Isolated from Olive Oil. *Eur. J. Cancer.* 2000a; 36, 1235- 1247.

Owen R.W., Mier W., Giacosa A., Hull W.E., Spiegelhalder B., Bartsch H. Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil. *Clinical Chemistry.* 2000b; 46:7, 976-988.

Owen R.W., Mier W., Giacosa A., Hull W.E., Spiegelhalder B., Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology.* 2000c; 38, 647-659.

Owen R.W., Haubner R., Mier W., Giacosa A., Hull W.E., Spiegelhalder B., Bartsch H. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology.* 2003; 41, 703-717.

Owuor E.D., Kong A.T. Antioxidant and Oxidants regulated Signal Transduction Pathways. *Biochem. Pharm.* 2002; 64, 765-770.

Paulo M.G., Cabral H.M., Morais J.A., Almeida A.J. An Isocratic Method for the Simultaneous Determination of Vitamins A, C, E and β -Carotene. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1999; 21(2), 399-406.

Pedrielli P., Skibsted L.H. Antioxidant Synergy and Regeneration Effect of Quercetin, (-)-Epicatechin, and (+)-Catechin on α -Tocopherol in Homogeneous Solutions of Peroxidating Methyl Linoleate. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50, 7138-7144.

Peña-Neira A., Hernández T., García-Vallejo C., Estrella I, Suárez J.A. *Eur. Food Res. Technol.* 2000; 210, 445-448.

Pinelli P., Galardi C., Mulinacci N., Vincieri F.F., Cimato A., Romani A. Minor polar compounds and fatty acid analyses in monocultivar virgin olive oils from Tuscany. *Food Chemistry*. 2003; 80, 331-336.

Pirisi F., Angioni A., Cabras P., Garau V.L., Sanjust di Teulada M.L., Kaim dos santos M., Bandino G. Phenolic Compounds in Virgin Olive Oils. I. Low-wavelength Quantitative determination of Complex Phenols by High-Performance Liquid Chromatography under Isocratic Elution. *J. Chromatogr. A*. 1997;768, 207-213.

Pirisi F., Cabras P., Falqui C., Migliorini M., Muggelli M. Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 2. Reappraisal of the Extraction, HPLC Separation and Quantification Procedures. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48, 1191-1196.

Psomiadou E., Tsimidou M., Boskou D. Alpha-Tocopherol Content of Greek Virgin Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48(5), 1770-1775.

Psomiadou E., Tsimidou M., Boskou D. Alpha-tocopherol content of Greek virgin olive oils. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(5):1770-5

Qiang M., Arista K. Chemoprotection by Phenolic Antioxidants. Inhibition of Tumor Necrosis Factor α Induction in Macrophages. *J. Biol. Chem.* 2002; 277, 2477-2484.

Quiles J.L., Farquharson A.J., Simpson D.K., Grant I., Wahle K.W. Olive Oil Phenolics : Effects on DNA Oxidation and Redox Enzyme mRNA in Prostate Cells. *Br. J. Nutr.* 2002; 88, 223-234.

Quiles J.L., Ramirez-Tortosa M.C., Ibañez S., Alfonso J., Duthie G.G., Huertas J.R., Mataix J. Vitamin E Supplementation Increases the Stability and the *In vivo* Antioxidant Capacity of Refined Olive oil. *Free Radic. Res.* 1999; S129,135.

Quilez J., Rafecas M., Brufau G., García-Lorda P., Megías I., Bullo M., Ruiz J.A., Salas-Salvado J. Bakery Products Enriched with Phytosterol Esters, α -Tocopherol and β -Carotene Decrease Plasma LDL-Cholesterol and Maintain Plasma β -Carotene Concentrations in Normocholesterolemic Men and Women. *J. Nutr.* 2003; 133, 3103-3109.

Ranalli A., Angerosa F. Integral Centrifuges for Olive Oil Extraction. The Quantitative Characteristics of Products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996a; 73, 417-422.

Ranalli A., Serraiocco A. Evaluation of Characteristics of Olive Oil Produced by Innovative or Traditional Processing Technologies. *Riv. Ital. Sostanze Grasse.* 1996b; 73; 303-314.

Ranalli A., De Mattia G., Patumi M., Proietti P. Calidad del Aceite de Oliva Virgen con Relación a la Zona de Origen. *Grasas y Aceites.* 1999; 50(4), 249-259.

Ranieri R., Milzani A., Dalle Donne I., Giustarini D., Lusini L., Colombo R., Di Simplicio P. Blood Glutathione Disulfide: *In vivo* Factor or *In vitro* Artifact?. *Clin. Chem.* 2002; 48, 742-753.

Reddi A.S., Bollineni J.S. Renal Cortical Expression of mRNAs for Antioxidant Enzymes in Normal and Diabetic Rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 235, 598-601.

Reglamento (CE) nº1989/2003 de la Comisión de 6 de noviembre de 2003, que modifica el Reglamento (CEE) nº2568/91, relativo a las Características de los Aceites de Oliva y de los Aceites de Orujo de Oliva y sobre sus Métodos de Análisis (DOCE nº L295 de 13.11.03).

Reglamento (CEE) nº2568/91 de la Comisión de 11 de julio de 1991, relativo a las Características de los Aceites de Oliva y de los Aceites de Orujo de Oliva y sobre sus Métodos de Análisis (DOCE nº L248 de 5.9.91).

Rein D., Lolito S., Holt R.R., Keen C.L., Schmitz H.H., Fraga C.G. Epicatechin in Human Plasma: *In vivo* Determination and Effect of Chocolate Consumption on Plasma Oxidation Status. *J. Nutr.* 2000; 130, 2109S-2114S.

Rice-Evans C., Miller N.J., Paganga G. Structure-Antioxidant relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free radical Res.* 1996; 20, 933-956.

Robertson R.P., Harmon J., Tran P.O., Tanaka Y., Takahashi H. Glucose Toxicity in β -Cells: Type 2 Diabetes, Good Radicals Gone Bad and the Glutathion Connection. *Diabetes.* 2003; 52, 581-587.

Rodrigo N., Alegría A., Barberá R., Farré R. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Tocopherols in Infant Formulas. *Journal of Chromatography A.* 2002; 947, 97-102.

Rodrigo R., Rivera G., Orellana M., Araya J., Bosco C. Rat Kidney Antioxidant response to Long-Term Exposure to Flavonol Rich red Wine. *Life Sci.* 2002; 71, 2881-2895.

Romani A., Mulinacci N., Pinelli P., Vincieri F.F., Cimato A. Polyphenolic Content in Five Tuscany Cultivars of *Olea europaea* L. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47, 964-967.

Romani A., Pinelli P., Mulinacci N., Galardi C., Vincieri F.F., Liberatore L., Cichelli A. HPLC and HRGC Analyses of Polyphenols and Secoiridoid in Olive Oil. *Chromatographia.* 2001; 53, 279-284.

Romani A., Pinelli P., Mulinacci N., Vincieri F.F., Gravano E., Tattini M. HPLC Analysis of Flavonoids and Secoiridoids in Leaves of *Ligustrum vulgare* L. (Oleaceae). *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48, 4091-4096.

Romera Gómez J.M. Optimización de Técnicas Analíticas para la Cuantificación de Vitaminas en Productos Dietéticos para Nutrición Infantil. Tesis Doctoral. Universidad Granada. 1994.

Romero C., Brenes M., Yousfi K., García P., García A., Garrido A. Effect of Cultivar and Processing Method on the Contents of Polyphenols in Table Olives. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52, 479-484.

Romero C., García P., Brenes M., García A., Garrido A. Hydroxytyrosol 4- β -D-Glucoside, an Important Phenolic Compound in Olive Fruits and Derived Products. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50, 3835-3839.

Rovellini P., Cortesi N., Fedeli E. Analysis of Flavons from *Olea Europaea* by HPLC-UV and HPLC-electrospray MS. *Riv. Ital. Sostanze Grasse.* 1997; 74, 273-279.

Ruiz López M.D., Artacho R., Fernández Pineda M.A., López García de la Serrana H., López Martínez M.C. Stability of α -Tocopherol in Virgin Olive Oil during Microwave Heating. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 1995; 28, 644-646.

Ruiz-Gutiérrez V., Juan M.E., Cert A., Planas J.M. Determination of Hydroxytyrosol in Plasma by HPLC. *Anal. Chem.* 2000; 72, 4458-4461.

Sakac V., Sakac M. Free Oxygen Radicals and Kidney Diseases. *Med. Pregl.* 2000; 53, 463-474.

Salvador M.D., Aranda F., Gómez-Alonso S., Fregapane G. Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. *Food Chem.* 2003; 80, 359-366.

Sánchez-Machado D.I., Llópez-Hernández J., Paseiro-Losada P. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Tocopherols in Microalgae. *Journal of Chromatography A*. 2002; 976, 277-284.

Santini S.A., Marra G., Giardina B., Cotroneo P., Mordente A., Martorani G.E., manto A., Ghirlanda G. Defective Plasma Antioxidant Defenses and Enhanced Susceptibility to Lipid Peroxidation in Uncomplicated IDDM. *Diabetes*. 1997; 46, 1853-1858.

Sarkar A., Bhaduri A. Black Tea is Powerful Chemopreventor of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Comparison with Its Individual Catechin Constituents and Green Tea. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 284, 173-178.

Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J. Reactive Oxygen Species as Intracellular Messengers during Cell Growth and Differentiation. *Cell Physiol. Biochem.* 2001; 11, 173-186.

Scalbert A., Williamson G. Dietary Intake and Bioability of Polyphenols. *J. Nutr.* 2000; 130, S2073-2085.

Scalbert A., Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J. Nutr.* 2000; 130, 2073-2085.

Schroeter H., Holtz R.R., Orozco T.J., Schmitz H.H., Keen C.L. Milk and Absorption of Dietary Flavanols. *Nature*. 2003, 424, 787.

Serafini M., Bugianesi R., Maiani G., Valtuene D.S., Crozier A. Plasma Antioxidants from Chocolate. *Nature*. 2003a; 424, 1013.

Serafini M., Crozier A. Milk and Absorption of Dietary Flavanols. *Nature*. 2003b; 424, 788.

Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A., Montedoro G.F. High-Performance Liquid Chromatography Evaluation of Phenols in Olive Fruit, Virgin Olive Oil, Vegetation waters and Pomace and 1D- and 2D-Nuclear Magnetic resonance Characterization. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1999; 76, 873-882.

Servili M., Montedoro G.F. Contribution of Phenolic Compounds to Virgin Olive Oil Quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002; 104, 602-613.

Shea T.B., Rogers E., Ashline D., Ortiz D., Sheu M.S. Quantification of Antioxidant Activity in Brain Tissue Homogenates Using the TEAC. *J. Neur. Methods.* 2003; 125, 55-58.

Sinclair D.A. Paradigms and Pitfalls of Yeast Longevity Research. *Med. Ageing Dev.* 2002; 123, 857-867.

Soto C., Recoba R., Barrón H., Álvarez C., Favari L. Silymarin Increases Antioxidant Enzymes in Alloxan-Induced Diabetes in Rat Páncreas. *Comprar. Biochem. Phys. Part C.* 2003; 136, 205-212.

Strauss E. Longevity Research. Single Signal Unites Treatment that Prolong Life. *Science.* 2003; 300, 881-883.

Su Q., Rowley K.G., O'Dea K. Stability of Individual Carotenoids, Retinol and Tocopherol in Human Plasma during Exposure to Light and Alter Extraction. *J. Chrom. B.* 1999; 729, 191-198.

Suh J.H., Wang H., Liu R.M., Hagen T.M. Alpha-Lipoic Acid Reverse the Age-Related Loss in GSH Redox Status in Post-Mitotic Tissues: Evidence for Increased Cysteine Requirement for GSH Syntesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 2004; 423, 126-135.

Talwar D., Ha T.K.K., Cooney J., Brownlee C., O'Reilly D. St. A Routine Method for the Simultaneous Measurement of Retinol, a-Tocopherol and Five Carotenoids in Human Plasma by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Clin. Chim.* 1998; 270, 85-100.

Tammy M., Bray P. Dietary Antioxidants and Assessment of Oxidative Stress. *Nutrition*. 2000; 16, 578-581.

Tan H.W., Kellie L., Tuck L., Stupans I., Hayball P.J. Simultaneous Determination of Oleuropein and Hydroxytyrosol in Rat Plasma Using Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. Chrom. B*. 2003; 785, 187-191.

Tejedo Huamán J.R. Papel de la Proteinkinasa Dependiente de cGMP (PGK) y de la c-SRC Tirosina Kinasa en la Regulación Antagónica del Óxido Nítrico sobre la Apoptosis. Tesis Doctoral. Universidad Sevilla. 2000.

Thompson L.U., Yoon J.H., Jenkins D.J., Wolever T.M., Jenkins A.L. Relationship between Polyphenol Intake and Blood Glucose Response of Normal and Diabetic Individuals. *Am. J. Clin. Nutr.* 1984; 39, 745-751.

Tiedge M., Lortz S., Drinkgern J., Lenzen S. Relation Between Antioxidant Enzyme Gene Expression and Antioxidative Defense Status of Insulin-Producing Cells. *Diabetes*. 1997; 46, 1733-1742.

Tiedge M., Lortz S., Munday R., Lenzen S. Complementary Action of Antioxidant Enzymes in the Protection of Bioengineered Insulin-Producing RINm5F Cells Against the Toxicity of ROS. *Diabetes*. 1998; 47, 1578-1585.

Tiedge M., Lortz S., Munday R., Lenzen S. Protection Against the Cooperative Toxicity of Nitric Oxide and Oxygen Free Radicals by Overexpression of Antioxidant Enzymes in Bioengineered Insulin-Producing RINm5F Cells. *Diabetologia*. 1999. 42, 849-855.

Tobiasch E., Gunther L., Bach F.H. Heme Oxygenase-1 Protects Pancreatic Beta Cells from Apoptosis Caused by Various Stimuli. *J. Investig. Med.* 2001; 49, 566-571.

Tous J., Romer A., Plana J., Guerrero L., Díaz I., Hermoso J.F. Características Químico-Sensoriales de los Aceites de Oliva "Arbequina" Obtenidos en Distintas Zonas de España. *Grasas y Aceites*. 1997; 48(6), 415-424.

Tsimidou M., Lytridou M., Boskou D., Pappa-Louis A., Kotsifaki F., Petrakis C. Sobre la Determinación de Ácidos Fenólicos Minoritarios de Aceite de Oliva Virgen mediante RP-HPLC. *Grasas y Aceites*. 1996; 47(3), 151-157.

Tsakamoto H., Hisada S., Nishibe S. Lignans from Bark of the Olea Plants. I. *Chem. Pharm. Bull.* 1984; 32(7), 2730-2735.

Tsakamoto H., Hisada S., Nishibe S. Lignans from Bark of the Olea Plants. II. *Chem. Pharm. Bull.* 1985; 33(3), 1232-1241.

Tuck K.L., Freeman M.P., Hayball P.J., Stretch G.L., Stupans I. The *In vivo* Fate of Hydroxytyrosol and Tyrosol, Antioxidant Phenolic Constituents of Olive Oil, after Intravenous and Oral Dosing of Labeled Compounds to Rats. *J. Nutr.* 2001; 131, 1993-1996.

Uceda M., Aguilera M.P., Beltrán G., Jiménez A. Aceites de Oliva Vírgenes Extra. Calidad y diversidad. Ed. Patrimonio Comunal Olivarero. Junta de Andalucía. Sevilla, 2000.

Uceda M., Hermoso M. La Calidad del Aceite de Oliva. El Cultivo del Olivo. Eds Barranco D., Fernández-Escobar R., Rallo L. Junta de Andalucía. Sevilla, 1997.

Upritchard J.E., Schuurman C.R., Wiersma A., Tijburg L.B., Coolen S.A., Rijken P.J., Wiseman S.A. Spread Supplemented with Moderate Doses of Vitamin E and Carotenoids Reduces Lipid Peroxidation in Healthy, Nonsmoking Adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003; 78, 985-992.

Vázquez A., Janer del Valle M.L., Janer del Valle C. Determinación de Polifenoles Totales en Aceite de Oliva. *Grasas y Aceites*. 1973; 24, 350-57.

Vekiari S.A., Koutsaftakis A. Efecto de las Diferentes Etapas del Proceso de Extracción en la Aceituna sobre el Contenido de Polifenoles en el Aceite de Oliva. *Grasas y Aceites*. 2002a; 53(3), 304-308.

Vekiari S.A., Papadopoulou P., Koutsaftakis A. Comparación entre diferentes sistemas de extracción de aceite de oliva y efecto de las condiciones de almacenamiento en la calidad del mismo. *Grasas y Aceites*. 2002b; 53(3), 324-329.

Velasco J., Dobarganes C. Oxidative Stability of Virgin Olive Oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002; 104, 661-679.

Violi F., Micheletta F., Iluliano L. Antioxidants and Atherosclerosis. *Eur. Heart J. Suppl.* 2002; 4B, 17-21.

Visioli F., Bellomo G., Galli C. Free Radical-Scavenging Properties of Olive Oil Polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998a; 247, 60-64.

Visioli F., Galli C. Olive Oil Phenols and their Potential Effects on Human Health. *J. Agric. Food Chem.* 1998b; 46, 4292-4296.

Visioli F., Galli C. Free Radical-Scavenging Actions of Olive Oil Phenolics. *Lipids*. 1999a; 34 S315.

Visioli F., Romani A., Mulinacci N., Zarini S., Conte D., Vincieri F.F., Galli C. Antioxidant and Other Biological Activities of Olive Mill Waste Waters. *J. Agric. Food Chem.* 1999b; 47, 3397-3401.

Visioli F., Galli C., Bornet F., Mattei A., Patelli R., Galli G., Caruso D. Olive Oil Phenolics Are Dose-Dependently Absorbed in Humans. *FEBS*. 2000; 468, 159-160.

Visioli F., Caruso D., Plasmati E., Patelli R., Mulinacci N., Romani A., Galli G., Galli C. Hydroxytyrosol, as a component of Olive Mill Waste Water, is Dose-Dependently Absorbed and Increases the Antioxidant Capacity of Rat Plasma. *Free Radic. Res.* 2001; 34, 301-305.

Visioli F., Galli C. Biological Properties of Olive Oil Phytochemicals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2002a; 42, 209-221.

Visioli F., Galli C., Galli G., Caruso D. Biological Activities and Metabolic Fate of Olive Oil Phenols. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002b; 104, 677-684.

Visioli F., Galli C., Grande S., Colonnelli K., Patelli C., Galli G., Caruso D. Hydroxytyrosol Excretion Differs Between Rats And Humans And Depends On The Vehicle Of Administration. *J. Am. Oil Soc.* 2003; 2612-2615.

Vissers M.N., Zock P.L., Katan M.B. Bioavailability and Antioxidant Effects of Olive Oil Polyphenols in Humans: A Review. *E. J. C. N.* 2004; 58, 955-965.

Vissers M.N., Zock P.L., Roodenburg A.J., Leenen R., Katan M.B. Olive Oil Phenols are Absorbed in Humans. *J. Nutr.* 2002; 132, 409-417.

Weber P, Bendich A, Machain LJ. Vitamin E and Human Health: Rationale for Determining Recommended Intake Levels. *Nutrition.* 1997; 13:450-460.

Wilkinson A.P., Wähälä K., Williamson G. Identification and Quantification of Polyphenol Phytoestrogens in Foods and Human Biological Fluids. *J. Chrom. B.* 2002; 777, 93-109.

Wiseman S.A., Tijburg L.B., Van de Put F.H. Olive Oil Phenolics Protect LDL Damage and Spare Vitamin E in the Hamster. *Lipids.* 2002; 37, 1053-1057.

Wolfender J.L., Ndjoko K., Hostettmann K. Liquid Chromatography with Ultraviolet Absorbance - Mass Spectrometric Detection and with Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry: a Powerful Combination for the On-line Structural Investigation of Plant Metabolites. *J. Chromatogr. A.* 2003; 1000, 437-455.

Wu J.M., Wang Z.R., Hsieh T.C., Bruder J.L., Zou J.G., Huang Y.Z. Mechanism Of Cardioprotection By Resveratrol, A Phenolic Antioxidant Present In Red Wine. *Int. J. Mol. Med.* 2001; 8, 3-17.

Yang S., Landau M., Huang T., Newmark H. Inhibition of Carcinogenesis by Dietary Polyphenolic Compounds. *Annu. Rev. Nutr.* 2001; 21, 381-406.

Ying C.J., Xu J.W., Ikeda K., Takahashi K., Nara Y., Yamori Y. Tea Polyphenols Regulate NADPH Oxidase Subunit Expression and Ameliorate Angiotensin II-Induced Hypermeability in Endothelial Cells. *Hypertens. Res.* 2003; 26, 823-828.

Young V.R. 2001 W.O. Atwater Memorial Lectura: Human Nutrient Requirements: The Challenge of the Post-Genome Era. *J. Nutr.* 2002; 132, 621-629.

Yu R., Chen C., Mo Y.Y., Hebbar V., Owuor E., Tan T.H., Kong A.T. Activation of MAPK Pathways Induces Antioxidant Response Element-Mediated Gene Expression Via Nrf2-Dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* 2000; 51, 39907-39913.

Zandomenighi M., Carbonaro L., Caffarata C. Fluorescence of Vegetable Oils: Olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53, 759-766.

