



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FENOLES DE *Olea europaea L.*, EN LA PREVENCIÓN DE UN PROCESO DE NEURODEGENERACIÓN PROGRESIVA EN UN MODELO MURINO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**EDUARDO PAVEL HERNÁNDEZ CORTÉS**

TUTORA PRINCIPAL: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
MIEMBRO DEL COMITÉ TUTOR: M. EN C. RICARDO JORGE CÁRDENAS PÉREZ  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM  
MIEMBRO DEL COMITÉ TUTOR: M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FENOLES DE *Olea europaea L.*, EN LA PREVENCIÓN DE UN PROCESO DE NEURODEGENERACIÓN PROGRESIVA EN UN MODELO MURINO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**EDUARDO PAVEL HERNÁNDEZ CORTÉS**

TUTORA PRINCIPAL: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
MIEMBRO DEL COMITÉ TUTOR: M. EN C. RICARDO JORGE CÁRDENAS PÉREZ  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM  
MIEMBRO DEL COMITÉ TUTOR: M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2015

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 08 de junio de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **HERNÁNDEZ CORTÉS EDUARDO PAVEL** con número de cuenta **303274290**, con la tesis titulada **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FENOLES DE *Olea europaea* L., EN LA PREVENCIÓN DE UN PROCESO DE NEURODEGENERACIÓN PROGRESIVA EN UN MODELO MURINO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SELVA LUCÍA RÍVAS ARANCIBIA**:

Presidente: DRA. ANA ERIKA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ  
Vocal: DR. JOSÉ ANTONIO MORALES SERNA  
Secretario: M. EN C. RICARDO JORGE CÁRDENAS PÉREZ  
Suplente: DRA. CLAUDIA GÓMEZ ACEVEDO  
Suplente: M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”  
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de septiembre de 2015

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la formación brindada en la maestría, por las facilidades brindadas para la realización de la estancia de investigación y por todos los recursos tangibles e intangibles que se pusieron a disposición.

A CONACYT por la beca de maestría otorgada de enero de 2013 a julio de 2014 y la extensión de beca o beca mixta otorgada de febrero a mayo de 2014

A la UNAM por la asignación de recursos a través del programa: DGAPA No. IN221114 S. R-A

A la Doctora Selva Lucia Rivas Arancibia por darme la oportunidad de ingresar a su laboratorio para la realización de este trabajo en general y tiempo destinado a este proyecto. Muchísimas gracias

Al Maestro en Ciencias Ricardo Jorge Cárdenas Pérez por darme la oportunidad de ingresar a su laboratorio para la realización de este trabajo, por todas las facilidades que me concedió, los recursos destinados al desarrollo de este proyecto, por la formación brindada, por su ayuda en general y tiempo destinado. Muchísimas gracias

Al Maestro en Ciencias Luis Sánchez Sánchez por su ayuda en general y tiempo destinado a este proyecto. Muchísimas gracias

Al Doctor José Antonio Morales Serna por todas las facilidades que me concedió, por la formación brindada, por su ayuda en general y tiempo destinado. Muchísimas gracias

A la Doctora Ana Erika Rodríguez Martínez por su apoyo teórico y técnico, su amable trato y cordialidad. Muchas gracias.

A la Doctora Claudia Gómez Acevedo por los conocimientos brindados, su atención y amable trato. Muchas gracias.

A la Química Eréndira García Ríos por la ayuda brindada en la realización e interpretación de análisis por medio de cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas. Muchísimas gracias

Al Doctor Rúben Luis Gaviño Ramírez por la ayuda brindada en la realización e interpretación de análisis por medio de resonancia magnética nuclear. Muchas gracias

Al técnico Gabino Borgonio Pérez por la ayuda brindada en la realización de los experimentos in vivo. Muchísimas gracias

A mis compañeros del laboratorio y amigos en el Instituto de Química: Armando, Joaquin, Rosita, Olivia, Jorge

A mis compañeros del laboratorio y amigos en la Facultad de Medicina: Erika, Enrique, Daniel, Elisa, Raúl, Ever, Paola, Mariana.

Agradezco a Edgar Pioquinto Nandho por haberme compartido la información que a él había llegado acerca de las bondades del aceite de olivo en la salud humana, por su colaboración en este proyecto, su amistad y confianza

Agradezco a la vida por haberme puesto en este camino y permitirme iniciar el proceso para llevar un sueño a hacerse realidad, por poder ser inspirado e inspirar a seres extraordinarios.

Dedico esta tesis a mis padres, mis hijas, a mi familia y amigos

Los amo.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE FIGURAS Y CUADROS</b>	<b>i</b>
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	<b>ii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>3</b>
<b>EL olivo</b>	<b>3</b>
<b>Antioxidantes fenólicos del olivo</b>	<b>3</b>
<b>Oleuropeína</b>	<b>4</b>
<b>La paradoja francesa y la paradoja mediterránea</b>	<b>6</b>
<b>Antioxidantes</b>	<b>6</b>
<b>Radicales y especies reactivas de oxígeno</b>	<b>8</b>
<b>Estrés oxidativo y neurodegeneración</b>	<b>9</b>
<b>Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>9</b>
<b>El ozono</b>	<b>10</b>
<b>El modelo de neurodegeneración por ozono</b>	<b>11</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>13</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>13</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>15</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>22</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>45</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>46</b>

## LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

### Figura

- 1) Perfil cromatográfico HPLC de extracto de hoja de olivo. Página 4.
- 2) Estructura de la molécula de oleuropeína y regiones que conforman la molécula. Página 5.
- 3) Interacción del la SOD y el sistema glutati6n. P6gina 7.
- 4) Perfil cromatogr6fico del extracto refinado de hojas de olivo (M). P6gina 23.
- 5) Perfil cromatogr6fico de la parte en acetato de etilo del extracto refinado de hojas de olivo (M-AE). P6gina 24.
- 6) Perfil cromatogr6fico de la parte en agua del extracto refinado de hojas de olivo (M-H<sub>2</sub>O). P6gina 25.
- 7) Placa cromatogr6fica de fracciones con mayor pureza aparente de la cromatograf6a en columna realizada al extracto M-AE. P6gina 26.
- 8) Perfil cromatogr6fico de la oleurope6na de hojas de olivo. P6gina 27,
- 9) Espectro de resonancia magn6tica nuclear de hidrogeno de la oleurope6na obtenida de hojas de olivo. P6gina 29.
- 10) Fotograf6a de la oleurope6na obtenida a partir de hojas de olivo. P6gina 30.
- 11) Efecto antioxidante de la oleurope6na sobre el aumento en la peroxidaci6n lip6dica causado en hipocampo de ratas por la exposici6n a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas. P6gina 31.
- 12) Efecto antioxidante de fracciones del extracto metan6lico de hojas de olivo sobre el aumento en la peroxidaci6n lip6dica causado en hipocampo de ratas por la exposici6n a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas. P6gina 31.
- 13) Efecto antioxidante de la oleurope6na sobre la disminuci6n en los niveles de glutati6n disponible causada en hipocampo de ratas por la exposici6n a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas. P6gina 32.
- 14) Efecto antioxidante de las fracciones del extracto metan6lico de hojas de olivo sobre la disminuci6n en los niveles de glutati6n disponible ocasionada en hipocampo de ratas por la exposici6n a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas. P6gina 32.
- 15) Efecto antioxidante de la oleurope6na ante la modificaci6n de los niveles de glutati6n disponible ocasionada en hipocampo de ratas por la exposici6n a 0.25 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas. P6gina 34.
- 16) Efecto antioxidante de la oleurope6na ante la peroxidaci6n lip6dica ocasionada en hipocampo de ratas por la exposici6n a 0.25 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas durante 30d6as. P6gina 36.
- 17) Efecto antioxidante de la oleurope6na ante la modificaci6n de los niveles de glutati6n disponible ocasionada en hipocampo de ratas por la exposici6n a 0.25 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas durante 30 d6as. P6gina 36.
- 18) Efecto antioxidante del catecol y 6cido cafeico sobre el aumento en peroxidaci6n de l6pidos causado en hipocampo de ratas por la exposici6n a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas. P6gina 38.
- 19) Efecto antioxidante de catecol y 6cido cafeico ante la modificaci6n de los niveles de glutati6n disponible ocasionada en hipocampo de ratas por la exposici6n a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas. P6gina 38.

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ANOVA	Análisis de varianza (Analysis of variance)
C18	Molécula que contiene 18 carbonos en su estructura
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
COV's	Compuestos orgánicos volátiles
Cu/Zn	Cobre/Zinc
DTNB	Dinitrothiocyanobenzene
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
GSH	Glutation o glutatión reducido ( $\gamma$ -glutamyl-cisteinil-glicina)
GSSG	Glutation disulfuro o glutatión oxidado (L-gamma-glutamyl-L-cisteinil-glicina disulfuro)
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (zwitterion)
HPLC	Cromatografía Liquida de Alta Eficacia (high performance liquid chromatography)
KCl	Cloruro de calcio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monobásico de potasio
KRH	Solución Krebs Ringers Henseleit
LD <sub>50</sub>	Dosis letal para el 50 porciento de el numero muestral
M	Extracto metanólico refinado de hojas de <i>Olea europaea</i> L.
M-AE	Fracción acetato de etilo del extracto metanólico
MDA	Malondialdehido
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
M-H <sub>2</sub> O	Fracción acuosa del extracto metanólico
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato monobásico de sodio
NaCl	Cloruro de sodio

NADPH	Dinucleótido de nicotinamida adenina difosfato
NO	Oxido nítrico
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
O <sub>3</sub>	Ozono
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos (phosphate buffered saline)
ppm	Partes por millón
ROS	Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Acido tiobarbitúrico
TBARS	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
UV	Luz ultra violeta
η	Eficacia luminosa (lm•W)

Unidades aceptadas por la Conferencia General de Pesos y Medidas (CGPM)

Unit	Symbol	Unit	Symbol
• metre	m	ampere	A
• square metre	m <sup>2</sup>	volt	V
• cubic metre	m <sup>3</sup>	watt	W
• micron	μ	ohm	Ω
• litre	l	coulomb	C
• gram	g	farad	F
• tonne	t	henry	H
second	s	hertz	Hz
erg	erg	poise	P
dyne	dyn	newton	N
degree Celsius	°C	• candela (new candle)	cd
• degree absolute	°K	lux	lx
calorie	cal	lumen	lm
bar	bar	stilb	sb
hour	h		

## RESUMEN

De acuerdo con cifras del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en México más de 350,000 personas están afectadas por la enfermedad de Alzheimer y mueren por ella anualmente 2,030 pacientes, convirtiendo a la enfermedad de Alzheimer en la cuarta causa de muerte entre adultos. Se estima que en todo el mundo hay alrededor de 24 millones de personas con Alzheimer y que este dato se incrementará hasta alcanzar la cifra de 81 millones en 2040. No existe tratamiento para detener o revertir el deterioro mental en la enfermedad; por tal motivo existe la necesidad de encontrar moléculas que puedan prevenir, detener, o incluso revertir los daños que dan lugar a las enfermedades neurodegenerativas. Existe evidencia de que los antioxidantes pueden ser una alternativa farmacológica para detener el avance de esta enfermedad. La oleuropeína es un antioxidante que ha sido evaluado en modelos *in vitro*, en donde se demostró que previene alteraciones que son patognomónicas de la enfermedad de Alzheimer como la polimerización de las proteínas Tau y beta amiloide. Sin embargo no se han realizado estudios en modelos animales de neurodegeneración. En este trabajo se purificó oleuropeína (92.6 %) a partir de extractos de hojas de *Olea europaea* ricos en oleuropeína (19.2% ). Se evaluó el efecto antioxidante de dichos extractos y de la oleuropeína, midiendo para ello la peroxidación de lípidos y los niveles de glutatión (total, oxidado y reducido) en el hipocampo de ratas expuestas a 1 ppm de O<sub>3</sub> en forma aguda. Los resultados indican que la dosis de 5 mg/Kg de oleuropeína es la mínima necesaria para evitar el incremento en la peroxidación de lípidos en el hipocampo de ratas expuestas a 1 ppm de O<sub>3</sub> de forma aguda. Además, en este trabajo se encontró que la dosis mínima necesaria para evitar la depleción en los niveles de glutatión en el hipocampo de ratas por la exposición aguda a 1 ppm de O<sub>3</sub> fue de 20 mg/Kg de oleuropeína. Los datos muestran que la cantidad de oleuropeína cuantificada en los extractos es directamente proporcional al efecto antioxidante para evitar la peroxidación de lípidos provocada en el hipocampo de ratas expuestas a 1 ppm de O<sub>3</sub> de manera aguda. Por otra parte se encontró que la dosis de oleuropeína de 10 mg/Kg es la mínima necesaria para lograr un incremento significativo en los niveles de glutatión disponible en hipocampo de ratas expuestas a 0.25 ppm de O<sub>3</sub> de manera aguda. En conclusión la oleuropeína disminuye la peroxidación de lípidos y actúa sobre el sistema glutatión, aumentando los niveles de esta molécula en el modelo empleado en este trabajo.

## ABSTRACT

According to the *Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía* in Mexico more than 350 000 people are affected by the Alzheimer disease, and die by it 2 030 patients annually, making Alzheimer disease the fourth cause of death in adults. It is estimated that around the world there are 24 million people with Alzheimer, and that this figure will increase to reach 81 million in 2040. There is not treatment for stopping or reverse the mental damage in the disease; for this reason exist the need of finding molecules that can prevent, stop or even revert the neurodegenerative diseases. There is evidence that the antioxidants can be a pharmaceutical alternative for stopping the progress of this disease.

The oleuropein is an antioxidant that has been evaluated at *in vitro* models, where it was demonstrated that prevents pathognomonic alterations of Alzheimer disease, like Tau and beta amyloid proteins polymerization. Although studies about neurodegeneration in animal models have not yet been made. In this work oleuropein was purified (92.6%) from extract of *Olea europaea* leaves rich in oleuropein (19.2%).

The antioxidant effect of these extracts and the oleuropein was evaluated measuring the lipid peroxidation and the glutathione levels (total, oxidized, reduced) in rats hippocampus exposed acutely to 1 ppm of O<sub>3</sub>. Results indicate that the oleuropein dose of 5 mg/Kg is the minimum necessary for avoiding the increment in lipid peroxidation in the hippocampus of rats exposed acutely to 1 ppm of O<sub>3</sub>.

In addition, in this work we found that the minimum dose for avoiding the depletion at glutathione hippocampus levels of rats exposed acutely to 1 ppm of O<sub>3</sub> was 20 mg/Kg of oleuropein. The data shows that the quantity of oleuropein quantified at the extracts is directly proportional to the antioxidant effect for avoiding the lipid peroxidation provoked in rats hippocampus exposed acutely to 1 ppm of O<sub>3</sub>. On the other hand, it was found that the oleuropein dose of 10 mg/Kg is the minimum necessary for a significant increment in the hippocampus glutathione levels in rats exposed acutely to 0.25 ppm of O<sub>3</sub>. In conclusion the oleuropein reduces the lipid peroxidation and acts over the glutathione system, increasing this molecule levels in the model used in this work.

## MARCO TEÓRICO

### **El olivo**

El olivo (*Olea europea L.*) es una planta longeva, perennifolia, de corte arbustivo o arbóreo, distribuida principalmente entre los paralelos 20 y 45 norte y sur del planeta, domesticada desde los inicios de la civilización humana en la antigua Mesopotamia, históricamente ha sido de importancia cultural a lo largo de la historia, se le ha dado valor ritual e industrial, pero sobre todo culinario, en forma de aceitunas de mesa y aceite de olivo.

El fruto del olivo o aceituna posee un sabor amargo y astringente, por lo cual puede ser macerado para consumirlo en fresco o bien encurtido o conserva dulce o salada. La composición química media de una aceituna es: agua 50%, aceite 22%, azúcares 19%, fibra dietética 5.8%, proteínas 1.6% oligocompuestos: hidrocarburos fragantes, alcoholes alifáticos, esteroides, pigmentos clorofílicos y carotenoides, compuestos fenólicos y polifenólicos.

El aceite de oliva virgen y extra virgen son aceites de máxima calidad, se obtienen directamente de aceitunas en buen estado únicamente por procedimientos mecánicos. Las proporciones medias de ácidos grasos que componen al aceite de oliva son: Oleico 73.62, Palmítico 12.61, Linoleico 9.67, Esteárico 2.11, Palmitoleico 1.21, y de otros ácidos grasos en bajas concentración como el Aráquidico, Linolénico y Margárico, además de otros oligocompuestos.

### **Antioxidantes fenólicos del olivo**

Los efectos antioxidantes de los polifenoles de *Olea europaea L* son ampliamente conocidos. A lo largo de la historia del olivo (*Olea europaea L.*), las hojas han sido empleadas para la prevención o el tratamiento de la hipertensión, la aterosclerosis, carcinogénesis, la diabetes y muchos otros usos terapéuticos tradicionales. Se cree que estas propiedades se deben a micronutrientes de la oliva especialmente los polifenoles. El

hidroxitirosol y la oleuropeína son considerados como los principales compuestos polifenólicos en la hoja de olivo [36, 37].

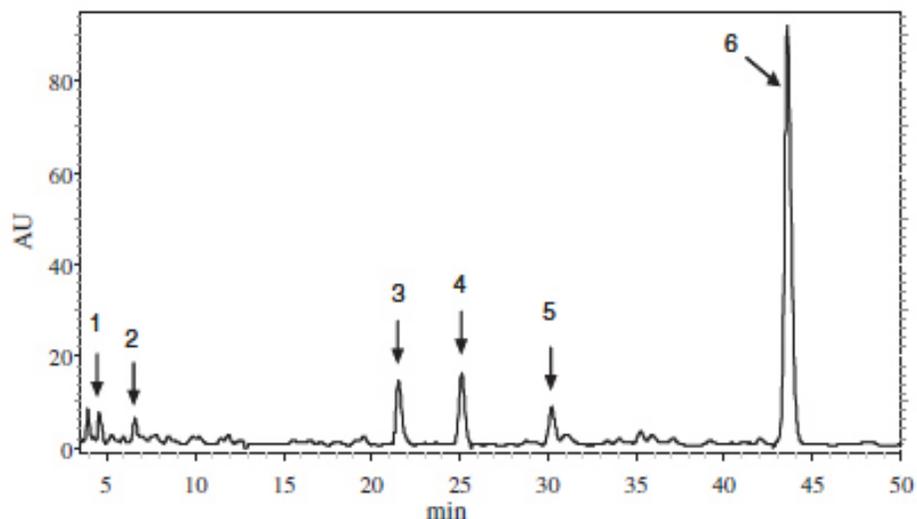


Figura 1. Perfil cromatográfico HPLC de extracto de hoja de olivo. UV 280 nm (1)Hidroxitirosol, (2) tirosol, (3) Luteolin 7-O-glucosido, (4) vervascosido, (5) apigenina7-O-glucosido. (6) oleuropeína. (Tomado de Hayes et al, 2011).

## Oleuropeína

La oleuropeína es un polifenol catalogado como secoiridoide, este compuesto se puede encontrar en abundancia en frutos, hojas y yemas de olivo, es un metabolito secundario de la familia de los secoiridoideos (monoterpenos derivados del geraniol). Es un poderoso antioxidante [38], antibacteriano [39], antiinflamatorio [40], anticancerígeno [41-43], antinociceptivo [44]; también se le atribuyen propiedades cardioprotectoras ya que se sabe que puede prevenir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, reducir la presión arterial y mejora la respuesta celular ante isquemia y cardiotóxicos [45, 46], también se le atribuyen propiedades neuroprotectoras porque posiblemente pueda evitar la oxidación interagregación y polimerización de péptidos, ya que se ha visto que puede formar un complejo no covalente con el péptido  $\beta$  amiloide [47] y que previene la agregación de la proteína Tau [48]. Además se ha encontrado relación epidemiológica entre el consumo de polifenoles y una menor incidencia de demencia senil, pues se sabe que los antioxidantes

pueden mejorar la funcionalidad mitocondrial e inhibir la oxidación de lípidos y otros efectos asociados al envejecimiento [38]

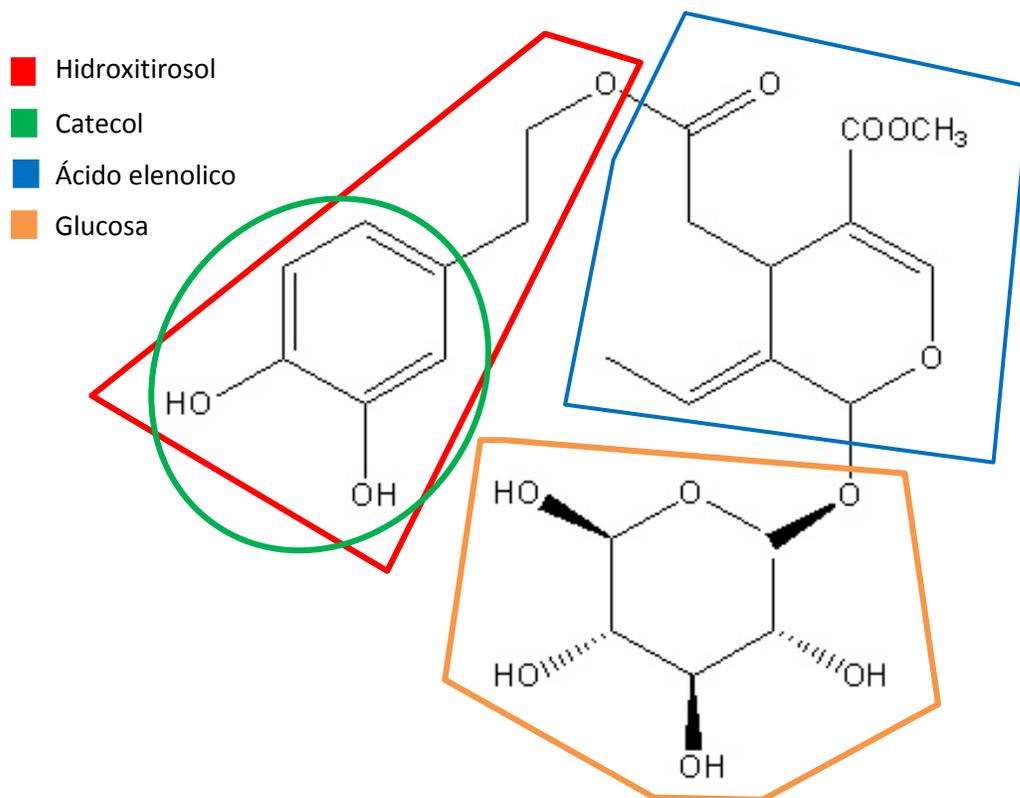


Figura.2 Estructura de la molécula de oleuropeína y regiones que conforman la molécula.

Estructuralmente la oleuropeína está conformada por glucosa, ácido elenólico e hidroxitirosol, estos tres residuos se generan cuando esta molécula se hidroliza. La región del hidroxitirosol es a la que se le atribuye la acción antioxidante de la oleuropeína, principalmente por la capacidad del catecol para que los electrones desapareados resuenen en el anillo aromático [38]; sin embargo también puede ser importante la actividad quelante de la molécula, la cual es atribuida principalmente a la región del ácido elenólico [45, 49]. Por último, es importante mencionar la posible capacidad de moverse a través de membranas celulares y barrera hematoencefálica, que podría conferir la región de la glucosa [34, 45, 50-52].

## **La paradoja francesa y la paradoja mediterránea**

Paradoja francesa es el nombre que se le da al fenómeno en el esquema nutricional propio de Francia que no se corresponde con la teoría nutricional anteriormente establecida. En ese país la incidencia de enfermedades cardiovasculares es mucho menor que en Estados Unidos, aunque se sigue una dieta más rica en grasas saturadas [32].

El irlandés Samuel Black, observador y amante de la cultura y la buena mesa, publicó en 1819 un artículo científico en el que hizo la siguiente observación: “Los franceses comen una gran cantidad de grasas, quesos, otros derivados de la leche completa y *foie gras* en general tienen menos ataques al corazón que los ingleses y otros europeos”. Al final del artículo Black dejó entrever que el consumo de vino tinto podía tener alguna participación en el asunto.

Parece claro que un consumo moderado de alcohol, especialmente de vino (que contiene resveratrol, polifenoles y flavonoides), es beneficioso para la salud, pero los estudios más recientes tienden a tener en cuenta otros factores en la paradoja francesa, como el consumo de aceite de oliva y otros ingredientes típicos de la llamada dieta mediterránea con alto contenido en ácido oleico

El aceite de olivo contiene diversos compuestos antioxidantes de naturaleza fenólica algunos como los lignanos proceden de la semilla, sin embargo los más abundantes como el hidroxitirosol, el tirosol, la oleuropeína y la oleuropeína aglicona están alojados junto a los depósitos de aceite del epicarpio del fruto [33-35].

### **Antioxidantes**

Los antioxidantes son moléculas reductoras, su estructura les permite interactuar con radicales libres, absorbiendo la energía de activación de estos atrapando al electrón desapareado, dicho electrón puede resonar en la estructura del antioxidante, la energía de activación del radical libre se traduce en una reacción de oxidación (reversible en muchos

casos) de la especie antioxidante. Tal es el caso de antioxidantes como tocoferoles, tioles y fenoles; sin embargo existen otros mecanismos antioxidantes en los que la energía de activación lleva a la formación de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno por acción de la superóxido dismutasa, también hay sistemas que actúan reduciendo a otras moléculas, como en el caso de la catalasa o la glutatión reductasa. Por último, hay que mencionar que los quelantes pueden actuar en contra de la oxidación atrapando iones metálicos como el hierro. Dentro de la célula existen sistemas antioxidantes que pueden neutralizar la acción en cadena de los radicales libres, tal es el caso de la superóxido dismutasa (SOD) de Cu/Zn que se encuentra en la membrana celular y el citosol, la SOD de Mn que se encuentra en la mitocondria y algunas bacterias o la SOD de Fe que es exclusiva de bacterias. La SOD actúa junto con otros sistemas antioxidantes, como ejemplo el sistema glutatión. La SOD transmuta al radical superóxido en peróxido de hidrógeno que en el sistema glutatión o por acción de la catalasa es reducido finalmente a  $H_2O$  y  $O_2$  [20].

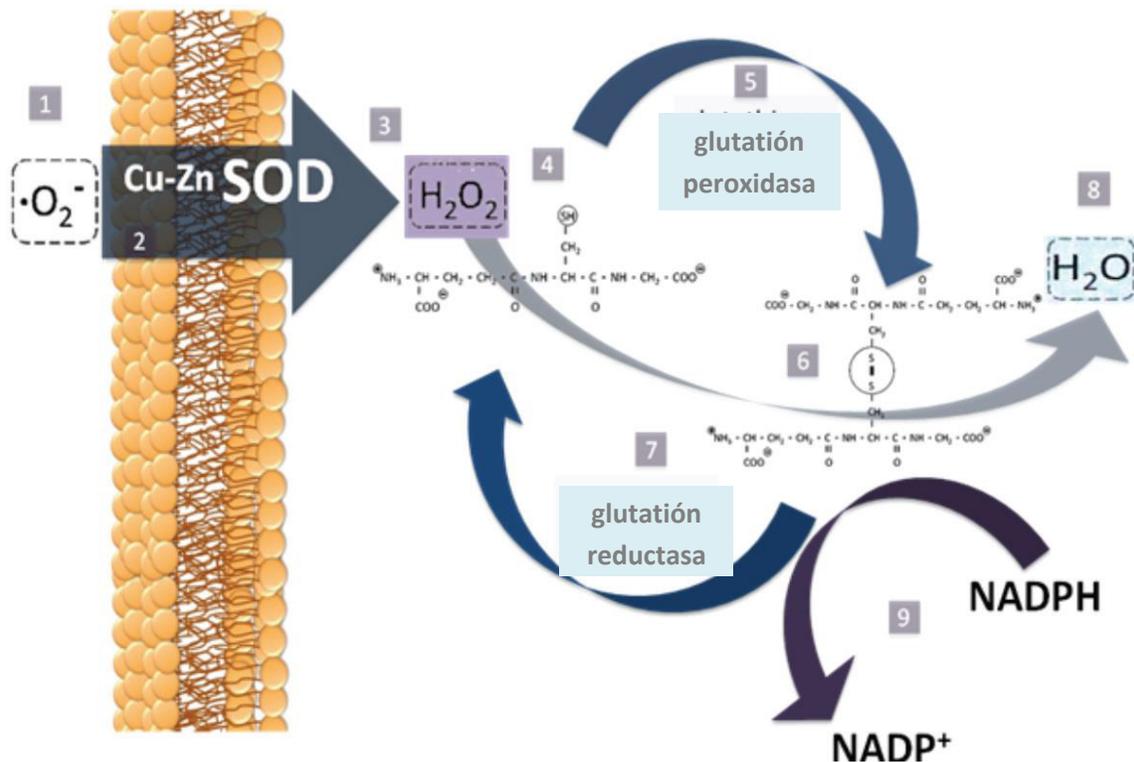


Figura 3. Interacción de la SOD y el sistema glutatión.

- (1) Radical libre de oxígeno (2) Superóxido dismutasa de Cu/Zn (3) Peróxido de hidrógeno (4) Glutatión reducido (5) Glutatión peroxidasa (6) Glutatión Oxidado (7) Glutatión reductasa (8) Agua (9) Dinucleótido nicotinamida adenina difosfato reducida y oxidada.

(Modificado de Rivas-Arancibia *et, al* 2010).

Además de los antioxidantes endógenos, las sustancias antioxidantes exógenas pueden servir para contrarrestar los efectos del estrés oxidativo, existen resultados experimentales que indican que sustancias como la vitamina C, tocoferoles, tocotrienoles, carotenoides, flavonoides, y polifenoles son sustancias antioxidantes que pueden ser consumidas a través de la dieta y ejercen su efecto en el organismo, ayudando a mantener el equilibrio redox [29, 30].

Diversos estudios científicos han demostrado que los antioxidantes reducen el riesgo de padecer: cáncer, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y diabetes además de retrasar el envejecimiento prematuro y modular el sistema inmunológico [29, 31].

### **Radicales y especies reactivas de oxígeno**

Los radicales son especies químicas (orgánicas o inorgánicas) que tienen uno o más electrones desapareados. Los radicales a menudo son también llamados centros de reacción, ya que debido a su alta reactividad pueden iniciar reacciones en cadena. Los radicales libres son formados a través de la transferencia de energía de activación que puede tener origen químico, fotoeléctrico o térmico. Los organismos vivos están expuestos a radicales libres formados fuera o dentro de ellos mismos; la exposición a energía ionizante como la luz ultravioleta o el metabolismo del oxígeno generan radicales libres dentro de los seres vivos, la generación de radicales en los seres vivos da lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como radicales libres de óxido nítrico (NO) las cuales sirven como señalizador molecular en diversos procesos [24].

## **Estrés oxidativo y neurodegeneración**

Dentro de las células los radicales pueden ser neutralizados por moléculas antioxidantes o por sistemas antioxidantes endógenos, como el sistema de la superóxido dismutasa (SOD), formando especies reactivas de oxígeno como el  $H_2O_2$ , que a su vez es transformado en sustancias inocuas como agua y oxígeno por enzimas como la catalasa o el sistema glutatión. Cuando las especies reactivas de oxígeno rebasan la capacidad de respuesta antioxidante de la células, en ellas se presenta una condición denominada estrés oxidativo. Las ROS actúan como señalizador molecular interviniendo en procesos metabólicos, de diferenciación, proliferación, epigenética y postranscripción. Sin embargo, la exposición crónica a estrés oxidativo causa cambios en las respuestas que se dan en las células ante la presencia de ROS. Dichas alteraciones están presentes en procesos patológicos, tales como, síndrome metabólico, enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencia, cáncer y neurodegeneración. Las enfermedades neurodegenerativas cursan un estado de estrés oxidativo e inflamación que altera la capacidad de regeneración cerebral (neurogénesis), además de desencadenar la muerte de numerosas células nerviosas maduras y sus progenitoras [20].

## **Enfermedad de Alzheimer**

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que se manifiesta en el deterioro cognitivo y trastornos conductuales. Se caracteriza por la pérdida de la memoria principalmente de corto y mediano plazo, este deterioro es debido a la muerte neuronal y la pérdida de conexiones neuronales, en las regiones cerebrales afectadas suele manifestarse pérdida de la neurogénesis y plasticidad cerebral, inflamación, hiperactividad inmunitaria, después de años de desarrollo de la enfermedad se pueden apreciar en el cerebro por medio de tomografía zonas atrofiadas y una disminución del volumen del encéfalo.

Existen diversas hipótesis de la etiología de la enfermedad de Alzheimer, actualmente las principales ideas tiene que ver con los mecanismos que llevan a la generación de las placas seniles, para lo cual se estudian principalmente los mecanismos de polimerización y agregación de péptidos como la proteína Tau y el péptido  $\beta$  amiloide.

Actualmente la enfermedad de Alzheimer es incurable y terminal. El tratamiento del Alzheimer se enfoca en frenar el avance de la enfermedad y en reducir sus síntomas y consiste en el manejo no farmacológico y el tratamiento farmacológico.

El tratamiento farmacológico emplea Inhibidores de la colinesterasa como galantamina, rivastigmina y donepezilo; aumentando la disponibilidad de acetilcolina y con ello promoviendo la sinapsis y la transmisión nerviosa. Y reguladores de la actividad glutamatergica como la memantina que pueden retrasar la aparición de síntomas de grado moderado o severo.

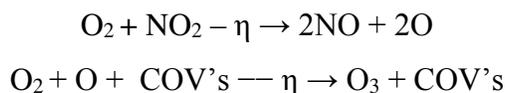
### **El ozono**

El ozono es un alótropo de oxígeno, en la estratósfera se forma gracias a la incidencia de energía ionizante sobre los átomos de oxígeno, es una molécula altamente reactiva e inestable que se descompone de forma espontánea principalmente en presencia de moléculas reductoras y ausencia de luz solar [1, 2]. De hecho el ozono es tan inestable que su degradación espontanea a gran escala es evidente en el polo sur del planeta; durante el invierno la luz solar no incide en absoluto por lo que año con año las concentraciones de ozono en esta zona se ven drásticamente reducidas y se recuperan hasta entrada la primavera [1, 3-5]. Se asegura en múltiples trabajos que la degradación del ozono se ve incrementada cuando interactúa con átomos de halógenos que pueden provenir de la degradación fotolítica de sales cuyo anión es un halógeno o con compuestos orgánicos halogenados; el inconveniente de esta propuesta es la dificultad de que tanto sales suspendidas como compuestos halogenados superen la tropósfera [6, 7].

La concentración de ozono sobre la superficie terrestre aparece referida entre los límites de 0.01 a 0.05 ppm. Su concentración en áreas urbanas y rurales de países industrializados es mayor. En algunos lugares de Estados Unidos se han registrado episodios con concentraciones del orden de 0.2 ppm [8]. En la tropósfera el ozono se forma por una serie de reacciones fotoquímicas en las que los compuestos orgánicos volátiles (COV's) reaccionan con óxidos de nitrógeno (ambos provenientes principalmente de la combustión de gasolinas). Estas reacciones son promovidas por la incidencia de luz visible y luz

ultravioleta provenientes del sol. Se ha podido determinar que los óxidos de nitrógeno constituyen el reactivo limitante de las reacciones fotoquímicas en la formación del ozono, ya que su concentración se relaciona de manera directa con la velocidad de estas reacciones.

Hay dos reacciones que nos pueden aportar un panorama general de la formación fotoquímica del ozono [8, 9].



Hay un número importante de estudios que han mostrado que la inhalación prolongada de ozono puede alterar las funciones pulmonares y pueden conducir a enfermedades graves [10-20]. Además la evidencia epidemiológica indica la existencia de una relación significativa entre la exposición al ozono y la mortalidad por alguna de estas patologías [10, 18, 21-23].

Cualquier gas inspirado, dependiendo de su concentración y la presión, debe primero disolverse en la fase acuosa en el pulmón antes de llegar a la microcirculación alveolar y los eritrocitos. Aunque la solubilidad del ozono es diez veces más alta que la del oxígeno, no se transfiere a los capilares alveolares, ya que reacciona inmediatamente con las biomoléculas presentes en el recubrimiento epitelial [10]. El ozono oxida moléculas de forma espontánea, dando lugar a la formación de radicales libres.

### **El modelo de neurodegeneración por ozono**

Cuando el ozono ingresa al organismo se genera una sucesión de reacciones oxidantes. En condiciones normales ante estas reacciones la respuesta de los sistemas antioxidantes endógenos tendrá una relación directa con la magnitud del estrés oxidativo generado, propiciando la recuperación de la homeostasis; sin embargo la exposición prolongada a bajas dosis de ozono en algún momento llegará a generar una respuesta alterada, o a no

generarla ante cada nueva exposición, ya sea por un mecanismo de tolerancia, o bien por la incapacidad de los sistemas antioxidantes para responder ante la exposición crónica. Un dato clave descrito en nuestro laboratorio es que los daños a nivel molecular que se pueden encontrar en el hipocampo en la enfermedad de Alzheimer pueden ser inducidos en ratas por medio de dosis bajas de ozono administradas de forma crónica. Los resultados de estos experimentos muestran el incremento en la peroxidación de lípidos, disminución de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa, aumento de grupos carbonilo expuestos en péptidos y proteínas oxidadas, disminución de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa, aumento en la concentración de proteínas proapoptóticas como bax y p53, incremento en la microglia fagocítica. También se presenta alteración de astrocitos y de células neuronales precursoras. Estas evidencias moleculares son progresivas y pueden detectarse a partir del día 30 de exposición a ozono [20, 25-28].

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Uno de los principales intereses de la investigación médica actual, es el que concierne a las enfermedades asociadas al estrés oxidativo como las enfermedades neurodegenerativas, ya que a pesar de los esfuerzos por combatir la prevalencia de estas enfermedades, los métodos y recomendaciones para prevenirlas resultan ser ineficientes. El tratamiento de estos padecimientos resulta costoso y en la mayoría de los casos no revierte ni detiene el daño que el organismo ha sufrido. Múltiples estudios señalan el valor del uso de antioxidantes como preventivos de las patologías ya mencionadas. Entre ellos destacan los fenoles; por ello resulta importante evaluar estas sustancias en modelos *in vivo* de enfermedades neurodegenerativas.

## **JUSTIFICACIÓN**

La enfermedad de Alzheimer es la cuarta causa de muerte (muerte indirecta) entre adultos. No existe tratamiento o cura para detener o revertir el deterioro mental de la enfermedad. Sin embargo, los resultados de investigaciones recientes son alentadores. Existe evidencia de que los antioxidantes pueden ser una alternativa farmacológica que ayude a prevenir o detener el avance de esta patología. La oleuropeína ha sido evaluada en modelos *in vitro* en torno a las alteraciones moleculares que son evidentes en los análisis *posmortem* de enfermos de Alzheimer, en los cuales se pueden observar las llamadas placas seniles; sin embargo, no se tiene antecedentes en modelos de neurodegeneración *in vivo*.

## **HIPÓTESIS**

Sí el estado de estrés oxidativo en ratas expuestas a bajas dosis de ozono causa neurodegeneración en el hipocampo, entonces la administración de oleuropeína (la cual posee actividad antioxidante), prevendrá el estado de estrés oxidativo y la consiguiente neurodegeneración progresiva.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de extractos de *Olea europea* L. y de oleuropeína en la prevención del proceso de neurodegeneración, causado por estrés oxidativo en el hipocampo de ratas expuestas crónicamente a dosis bajas de ozono.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cuantificar la concentración de Oleuropeína en extractos de hojas, y desechos del fruto de *Olea europaea* L.
2. Purificar oleuropeína a partir de extractos de *Olea europaea* L.
3. Realizar una curva dosis respuesta para determinar el efecto antioxidante de extractos de *Olea europaea* L. y oleuropeína en el modelo murino de estrés oxidativo por medio de la determinación de lípidos peroxidados en hipocampo de ratas expuestas a ozono.
4. Realizar una curva dosis respuesta para determinar el efecto antioxidante de extractos de *Olea europaea* L. y oleuropeína en el modelo murino de estrés oxidativo por medio de la determinación glutatión oxidado y total en hipocampo de ratas expuestas a ozono de forma aguda.
5. Determinar el efecto antioxidante de la oleuropeína en el modelo murino de estrés oxidativo por medio de la determinación de lípidos peroxidados en hipocampo de ratas expuestas a ozono de forma crónica.
6. Determinar el efecto antioxidante de la oleuropeína en el modelo murino de estrés oxidativo por medio de la determinación glutatión oxidado y total en hipocampo de ratas expuestas a ozono de forma crónica.

## METODOLOGÍA

### Obtención de extractos

Para la obtención del extracto metanólico refinado de hojas de *Olea europaea* L. (denominado en el documento M): Se colectaron 3 Kg (peso fresco) de hojas de olivo de árbol del parque de los Olivos en el pueblo de Santiago Tulyehualco, de la variedad cornicabra con una edad aproximada de 450 años y se sumergieron en metanol. Después de 3 semanas se concentró el extracto por destilación en rotavapor, el metanol destilado se devolvió al recipiente de extracción. Se filtró el extracto concentrado, se repitió por cinco ocasiones este proceso (se obtuvieron 990 g de extracto). Después se particionó el extracto concentrado obtenido utilizando una quinta parte de agua destilada por volumen de extracto disuelto en metanol, y una mezcla 1:1 de hexano-benceno extrayendo hasta que la fase (hexano-benceno) permaneció transparente. Se destilaron los solventes orgánicos, para extraer clorofilas restantes se lavó con cloroformo hasta dejar de obtener coloración verde en el solvente orgánico. Se evaporaron los solventes orgánicos residuales y se secó al alto vacío (se obtuvieron 390 g de extracto lavado).

Para la obtención de los extractos metanólico fracción acuosa (M-H<sub>2</sub>O) y extracto metanólico fracción acetato de etilo (M-AE): Se disolvió el extracto M en agua destilada a 50 °C (en proporción 1:1 peso/volumen) y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, después se agregó acetato de etilo extrayendo hasta que la fase orgánica permaneció transparente. Posteriormente lo extraído en acetato de etilo se concentró por destilación del disolvente a presión reducida se obtuvieron 156g (esta fracción del extracto es denominada en el documento M-AE). La parte del extracto que permaneció disuelta en agua se concentró destilando el acetato de etilo residual con rotavapor a presión reducida y posteriormente liofilizando se obtuvieron 234g (esta fracción del extracto es denominada en el documento M-H<sub>2</sub>O).

## **Purificación de oleuropeína**

La purificación de la oleuropeína se llevó a cabo disolviendo 60 g extracto refinado de hojas de olivo (M) en metanol-agua 9:10; se evaporó el metanol y se extrajo la fase orgánica con acetato de etilo repitiendo la extracción hasta que el acetato de etilo se observó transparente, se concentró lo extraído y se vertió este concentrado sobre celita para colocar la muestra seca en una columna cromatográfica de sílica, se eluyó la muestra con 100 % acetato de etilo aumentando la polaridad hasta 100% metanol. El resto de muestra se recuperó con metanol. Posteriormente a las fracciones con oleuropeína (fracciones 12 a 29) se les recrystalizó en acetato de etilo / hexano, obteniendo 2.5 g se corroboró la identidad del compuesto por resonancia magnética nuclear y se determinó la pureza del compuesto por cromatografía de líquidos de alta resolución.

## **Cuantificación de oleuropeína**

Para cuantificar la oleuropeína en los extractos y fracciones se analizó por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), para ello se inyectó oleuropeína  $\geq 98\%$  de pureza (Sigma-Aldrich), en las siguientes concentraciones: 0.42, 0.29, 0.21, 0.126, 0.042 mg/ml en metanol, cada concentración se inyectó por triplicado en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Agilent1200) acoplado a detector de arreglo de diodos (Water 2996, 232 nm) a través de una columna de sílica modificada (Luna C18(2) 100A 100 x 2 mm 3 $\mu$ m), usando un gradiente de elución inicial de 10% de metanol, 90% de agua acidificada con 0.2 % ácido acético; hasta llegar a 100% de metanol en 70 min con un flujo de 0.2 ml/min . Se realizó una curva de calibración con la información de áreas en los cromatogramas. Se inyectaron las muestras de cada extracto disueltas en metanol por triplicado en concentraciones dentro del intervalo de la curva de calibración.

## Grupos experimentales

Se emplearon 170 ratas macho de la cepa Wistar en 17 grupos de 10 ratas cada uno para los siguientes tratamientos:

Tratamientos		Dosis		
Fármaco por inyección	Administración de O <sub>3</sub>	O <sub>3</sub> 1ppm 4h (Agudo)	O <sub>3</sub> 0.25 ppm 4h (Agudo)	O <sub>3</sub> 0.25 ppm 4h 30 días
<b>Oleuropeína 92.4% mg/Kg</b>		2.5	5	10
		5	10	
		10	20	
		20		
		30		
<b>Extracto metanólico fracción acetato de etilo (M-AE) 19.2% Oleuropeína mg/Kg</b>		30		
<b>Extracto metanólico fracción acuosa (M-H<sub>2</sub>O) 9.2% Oleuropeína mg/Kg</b>		40		
		80		
<b>Ácido cafeico mg/Kg</b>		4.5		
<b>Catecol mg/Kg</b>		4		
<b>Ozono O<sub>3</sub></b>		Expuestas a O <sub>3</sub> Sin inyección de fármaco	Expuestas a O <sub>3</sub> Sin inyección de fármaco	
<b>Control</b>		Sin exposición a O <sub>3</sub> Sin inyección de fármaco		

Las diferentes dosis de oleuropeína, ácido cafeico, catecol y extractos de hojas de olivo fueron administrados disueltos en solución salina inyectable via intraperitoneal con aguja de insulina, en un volumen de 500  $\mu$ l de inyección, después de la exposición a ozono por 4 horas. Dos horas después de la administración del fármaco las ratas fueron sacrificadas. Se extrajo el cerebro de cada una de las ratas inmediatamente después de ser guillotizadas y se colocó el hipocampo de cada una de ellas en Buffer de lisis, el tejido fue homogenizado y almacenado a -70 °C hasta el momento de su análisis.

### **Determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico**

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se detectaron por el ensayo con ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) descrito en Ohkawa y colaboradores en 1979 [53]. Este método se utiliza para determinar la peroxidación de lípidos mediante la cuantificación del cromógeno formado a través de la reacción del TBA con malondialdehído (MDA), un producto final de la peroxidación lipídica. El tejido de ambos hemisferios del hipocampo de rata se homogenizó en 600  $\mu$ l de buffer de lisis y se centrifugó a 14,000 rpm 20 min a 4 °C y se tomaron alícuotas (25  $\mu$ l) del sobrenadante. Cada muestra se mezcló con 475  $\mu$ l solución amortiguadora (Krebs Ringer Hepes) KRH (que por cada 50 ml contiene: 3.71 g de NaCl, 0.08 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.39 g de KCl, 0.55 g de  $\text{CaCl}_2$ , 0.71 g de  $\text{MgSO}_4$ , 1.00 g de Dextrosa y 2.38 g de HEPES (Sigma-Aldrich) ajustando el pH a 7.4 con ácido clorhídrico). A cada muestra en solución amortiguadora se le adicionaron 500  $\mu$ l de solución del reactivo de TBA (que contiene por cada 100 ml de agua: 750 mg de TBA, 15 g de ácido tricloroacético y 2.6 ml de HCl concentrado). Las muestras se incubaron durante 20 min en una placa de calentamiento de tubos a 92 °C. Después de este tiempo las muestras se colocaron en hielo durante 20 min y posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min. La densidad óptica de los sobrenadantes que se obtuvieron de esta centrifugación se midió a una longitud de 532 nm en un espectrofotómetro EPOCH (Biotek). La concentración final de los TBARS se calculó mediante la interpolación de los valores experimentales en una curva estándar de MDA incubada en paralelo con las muestras experimentales. La concentración de proteína se midió por el método de Bradford.

## **Cuantificación de proteína por el método de Bradford**

Después de la descongelación de los tejidos de hipocampos homogenados se procede a centrifugar a 1400 rpm por 20 minutos a 4 °C. Se colectó el sobrenadante por separado del botón de tejido precipitado, se prepararon placas de 96 pozos para ELISA, en cada pozo se colocaron 79  $\mu$ l de agua destilada y 1  $\mu$ l de muestra de sobrenadante del tejido homogenado. Se colocaron 20  $\mu$ l de reactivo de Bradford e inmediatamente se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de 532 nm en un espectrofotómetro EPOCH (Biotek). Los datos obtenidos fueron interpolados con curvas estándar de albúmina con las siguientes concentraciones: 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 ng/ $\mu$ l

## **Determinación de glutatión total**

La determinación del contenido de glutatión total se realizó de acuerdo al método de la reducción cíclica de DTNB-GSSG descrito por Griffith O.W. en 1980 [54]. Este método se basa en la cuantificación del glutatión oxidado y reducido presente libre en una muestra, el glutatión en forma oxidada es llevado a su forma reducida (GSH) y mediante su incubación con el ácido 5,5'-ditiobisnitrobenzoico (DTNB), se adquiere una coloración amarillenta que puede ser determinada espectrofotométricamente cuando esta molécula es reducida por acción del glutatión. El tejido de ambos hemisferios de hipocampo de rata se homogenizó en 600  $\mu$ l de buffer de lisis y se centrifugó a 14,000 rpm durante 20 min a 4 °C y se tomaron alícuotas (25  $\mu$ l) del sobrenadante. Cada muestra se mezcló con 475  $\mu$ l de solución amortiguadora de fosfatos PBS-EDTA (que por cada 10 ml contiene 1.36 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.42 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8612 g de EDTA sódico y se ajustó el pH a 8 con HCl). A cada muestra en solución amortiguadora se le adicionaron 500  $\mu$ l de mezcla de reacción {que contiene 250 ml de solución de DTNB 0.00064 g/ml (en buffer PBS-EDTA) y 250 ml de solución de NADPH 0.92 mg/ml (en buffer PBS-EDTA)}. Las muestras se incubaron durante 5 min en una placa de calentamiento de tubos a 37 °C. Después se colocó una alícuota de 90  $\mu$ l de la muestra incubada y 10  $\mu$ l de glutatión reductasa (*S. cerevisiae*, en suspensión de sulfato de amonio, 250 unidades/mg proteína; Sigma-Aldrich) 1:1500 en mezcla de reacción. La densidad óptica de los sobrenadantes que se obtuvieron de esta

centrifugación se midió a una longitud de 412 nm en un espectrofotómetro EPOCH (Biotek). Los resultados se extrapolan en una curva estándar con concentraciones crecientes de GSH comercial que se incubó en paralelo con las muestras experimentales. La concentración de proteína se midió por el método de Bradford.

### **Determinación de glutatión oxidado**

La determinación del contenido de glutatión oxidado se realizó de acuerdo al método descrito por Griffith O.W. en 1980 [54] donde el GSH endógeno es derivatizado con 4-vinilpiridina. El tejido de ambos hemisferios del hipocampo de rata se homogenizó en 600  $\mu$ l de buffer de lisis y se centrifugó a 14,000 rpm durante 20 min a 4 °C y se tomaron alícuotas (25  $\mu$ l) del sobrenadante. Cada muestra se mezcló con 475  $\mu$ l de solución amortiguadora de fosfatos PBS-EDTA (que por cada 10 ml contiene 1.36 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.42 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8612 g de EDTA sódico y se ajustó el pH a 8 con HCl). 4. Se adicionaron 2  $\mu$ l de 4-vinilpiridina y se agitó en el *vortex* a alta velocidad por 30 segundos. Los tubos se almacenaron por 30 minutos en obscuridad a temperatura ambiente, y se centrifugaron por 1 minutos 1400 rpm. A cada muestra donde el GSH fue secuestrado; se le adicionaron 500  $\mu$ l de mezcla de reacción (que contiene 250 ml de solución de DTNB 0.00064 g/ml (en buffer PBS-EDTA) y 250 ml de solución de solución de NADPH 0.92 mg/ml (en buffer PBS-EDTA)). Las muestras se incubaron durante 5 min en una placa de calentamiento de tubos a 37 °C. Después se colocó una alícuota de 90  $\mu$ l la muestra incubada y 10  $\mu$ l de glutatión reductasa (*S. cerevisiae*, en suspensión de sulfato de amonio, 250 unidades/mg proteína; Sigma-Aldrich) 1:1500 en mezcla de reacción. La densidad óptica de los sobrenadantes que se obtuvieron de esta centrifugación se midió a una longitud de 412 nm en un espectrofotómetro EPOCH (Biotek). Los resultados se extrapolan en una curva estándar con concentraciones crecientes de GSH comercial que se incubó en paralelo con las muestras experimentales. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford.

## **Análisis estadístico**

Para el análisis de distribución muestral se empleó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk en el programa SigmaPlot 12, y la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov en el paquete SPSS 22, para la prueba de Curtosis estandarizada y asimetría estandarizada el paquete STATGRAPHICS Plus 5.1. Para el análisis de Homogeneidad de varianzas (Estadístico de Levene) y para el análisis de varianza seguido de una Prueba de Tukey el paquete SPSS 22.

## RESULTADOS

En diversos trabajos la oleuropeína es aislada partir de extractos metanólicos de hojas de olivo, por lo cual en primera instancia se procedió a buscar la presencia y abundancia de la oleuropeína en los extractos metanólicos (Figura 4).

En el cromatograma (Figura 4) se puede apreciar la complejidad en la composición química del extracto M (metanólico refinado de hojas de olivo); sin embargo con el aclaramiento efectuado al extracto metanólico con la mezcla hexano-benceno y el cloroformo se consiguió que la concentración de oleuropeína llegara 13.9 mg oleuropeína/g muestra.

Una vez determinada la concentración de oleuropeína en el extracto M era importante obtener el perfil cromatográfico y determinar la concentración de oleuropeína en cada fracción por par de solventes, la fracción en acetato de etilo fue denominada extracto M-AE (Figura 5), y la parte en agua extracto M-H<sub>2</sub>O (Figura 6).

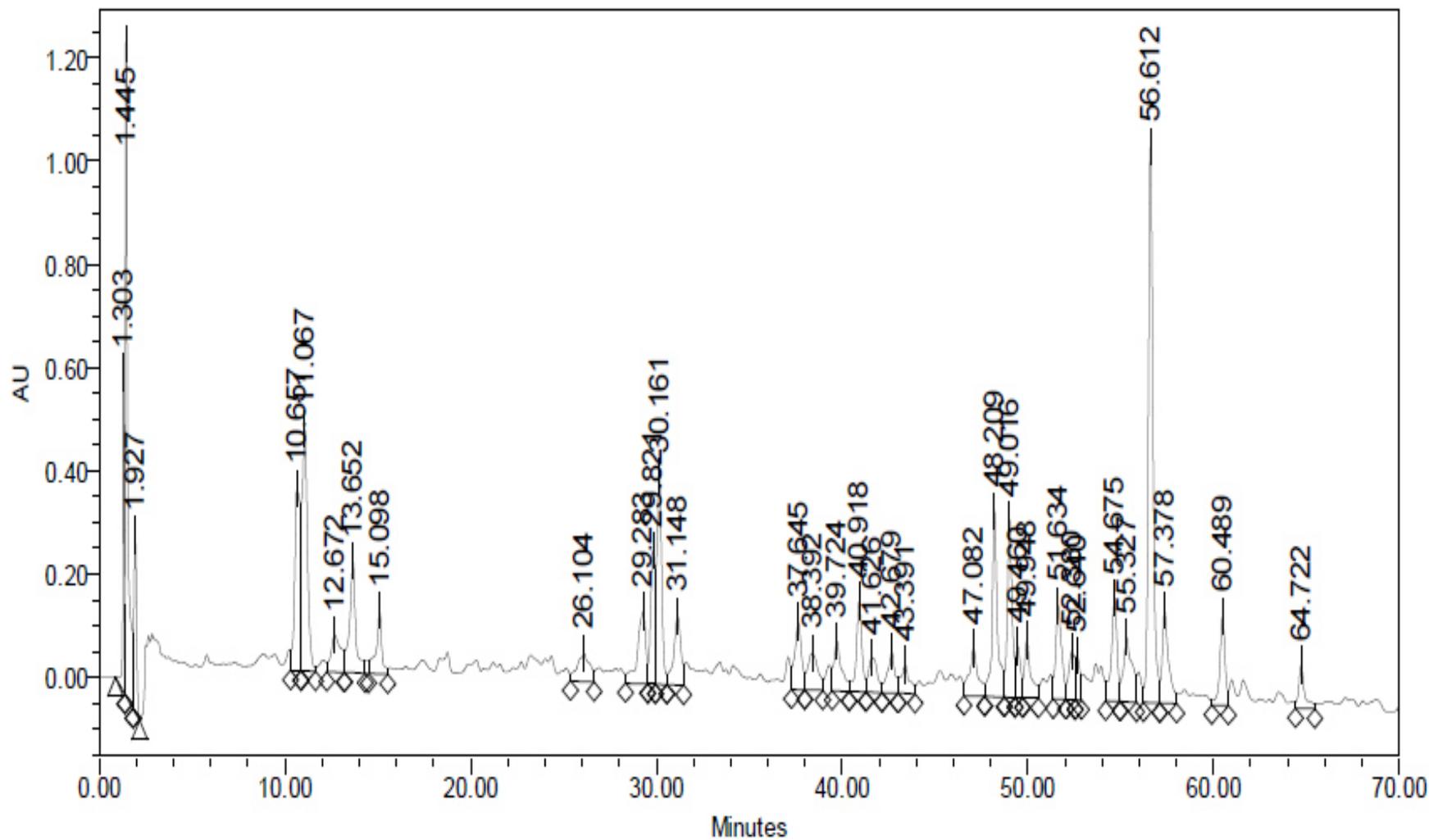


Figura 4. Perfil cromatográfico del extracto metanólico refinado de hojas de olivo (M). Columna Luna C18, 2mm diámetro interno, tamaño de partícula 3µm fase móvil MeOH - acético 0.2% inicial 30/70, 70 min 100/0 flujo 0.2 ml/min, 232 nm. 13.9 mg oleuropeína/g muestra.

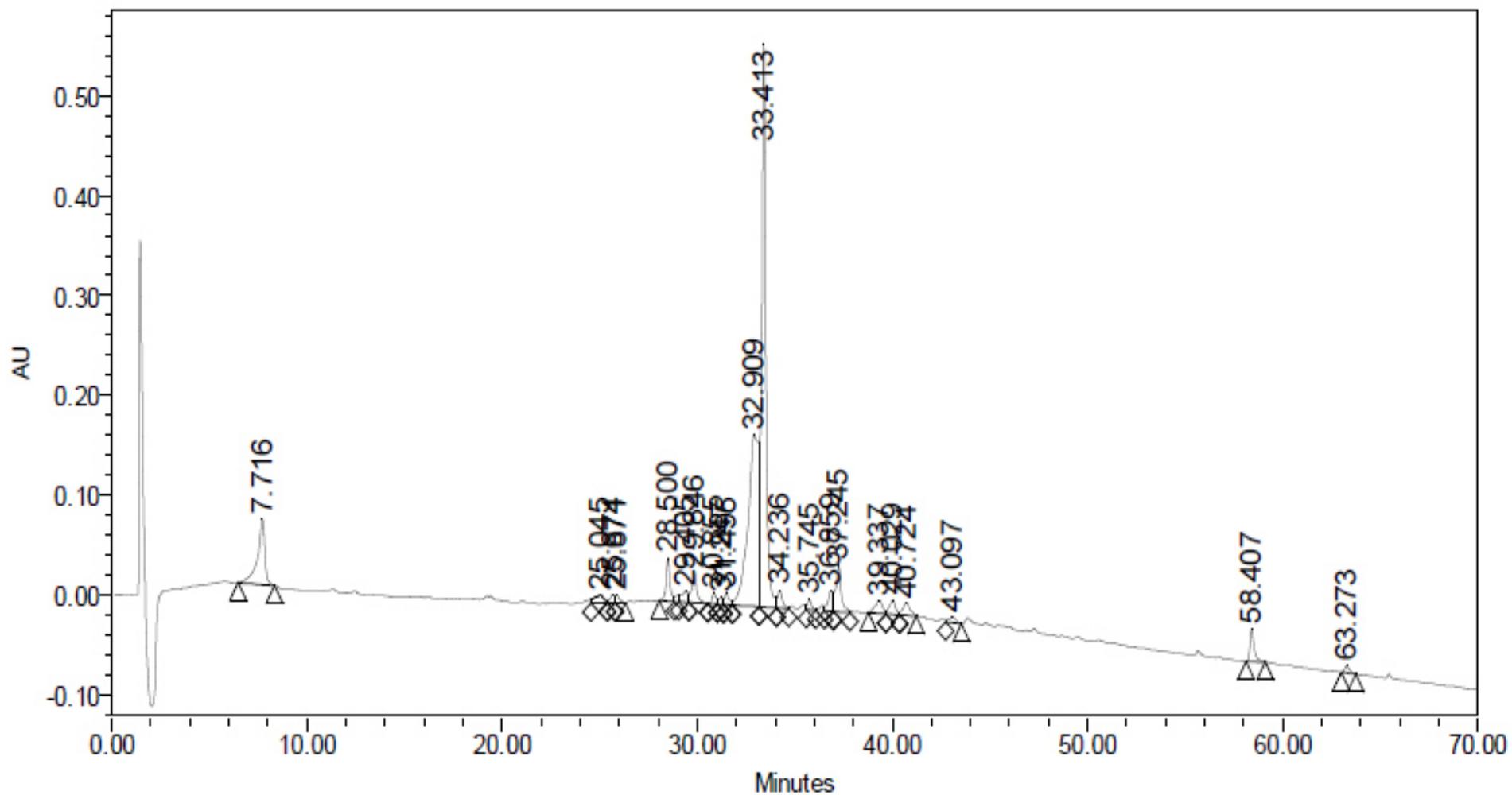


Figura 5. Perfil cromatográfico de la parte en acetato de etilo del extracto metanólico refinado de hojas de olivo (M-AE). Columna Luna C18, 2mm diámetro interno, tamaño de partícula 3µm fase móvil MeOH - acético 0.2% inicial 10/90, 70 min 100/0 flujo 0.2 ml/min, 232 nm. 192.4 mg oleuropeína/g muestra.

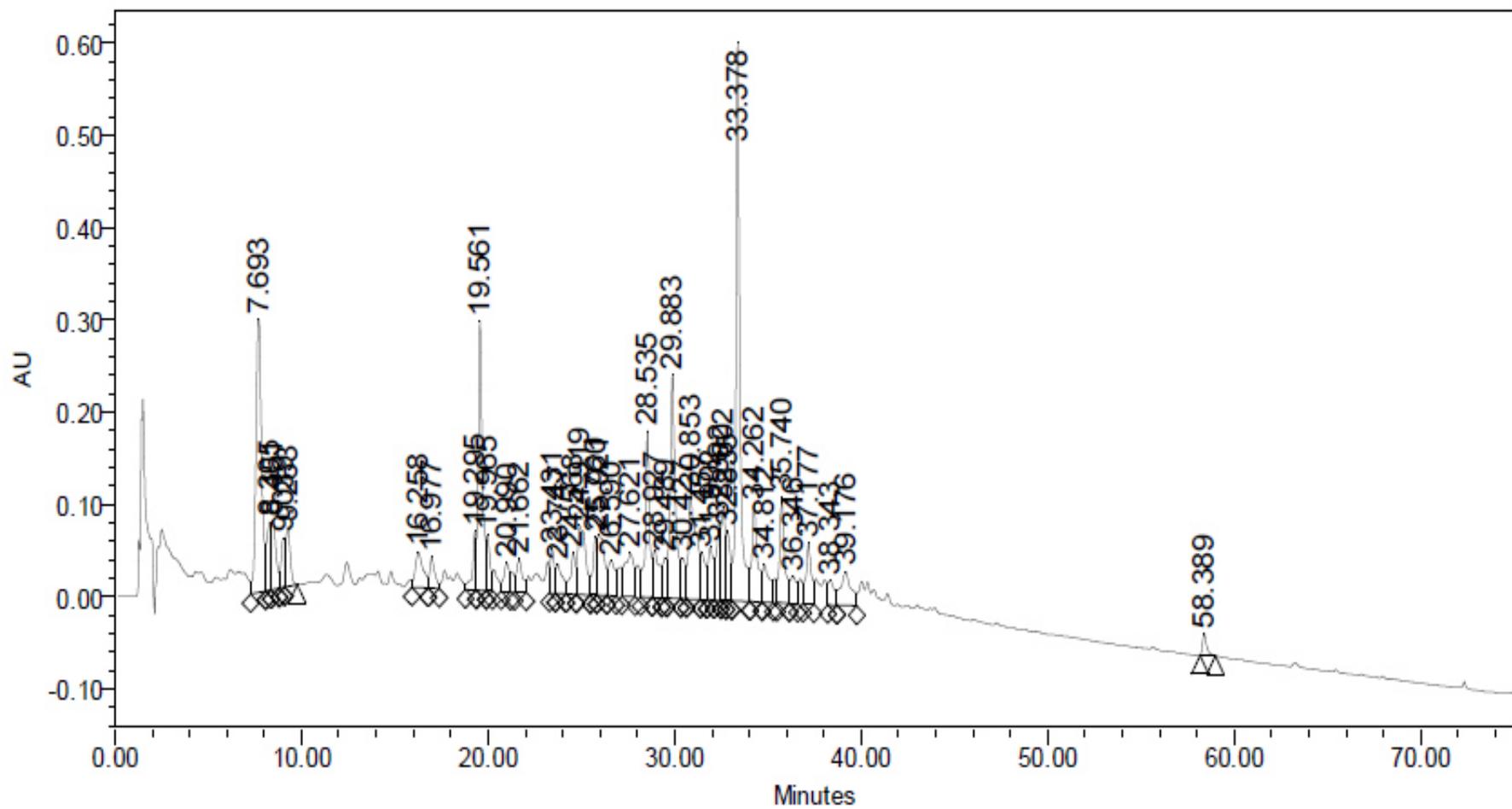


Figura 6. Perfil cromatográfico de la parte en agua del extracto metanólico refinado de hojas de olivo (M-H<sub>2</sub>O). Columna Luna C18, 2mm diámetro interno, tamaño de partícula 3µm fase móvil MeOH - acético 0.2% inicial 10/90, 70 min 100/0 flujo 0.2 ml/min, 232 nm. 92 mg oleuropeína/g muestra.

En los cromatogramas se puede apreciar que en la partición acuosa (Figura 6) se concentran la mayoría de los compuestos polares del extracto M mientras que la partición en acetato de etilo (Figura 5) se acumuló principalmente compuestos de mediana y baja polaridad.

Con el propósito de purificar la oleuropeína, el extracto M-AE (fracción en acetato de etilo del extracto M) fue fraccionado por cromatografía en columna, se reunieron las fracciones que presentaron mayor pureza aparente en cromatografía de capa delgada (Figura 7) y finalmente por cristalización pudo obtenerse oleuropeína con una pureza superior al 92 % (Figuras: 8 a 10).

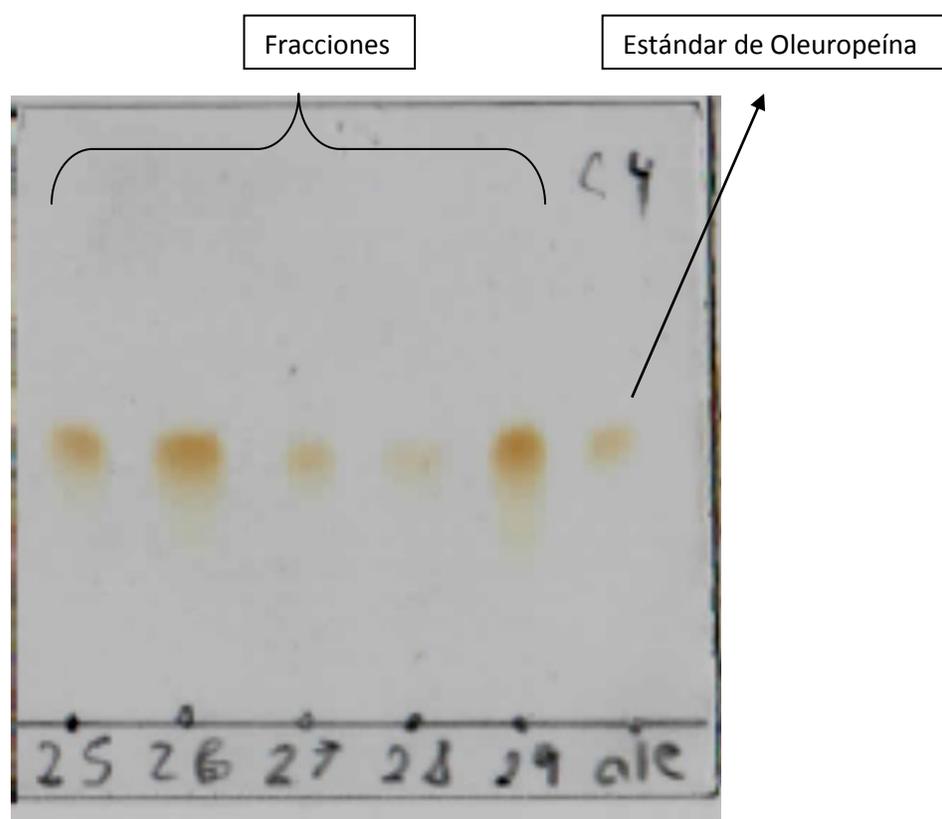


Figura 7. Placa cromatográfica de fracciones con mayor pureza aparente de la cromatografía en columna realizada al extracto M-AE: fracciones 25 a 29 y oleuropeína (ole) auto revelado después de 24 horas. Fase estacionaria gel de sílica, fase móvil 80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15 % MeOH, 5 % Hexano.

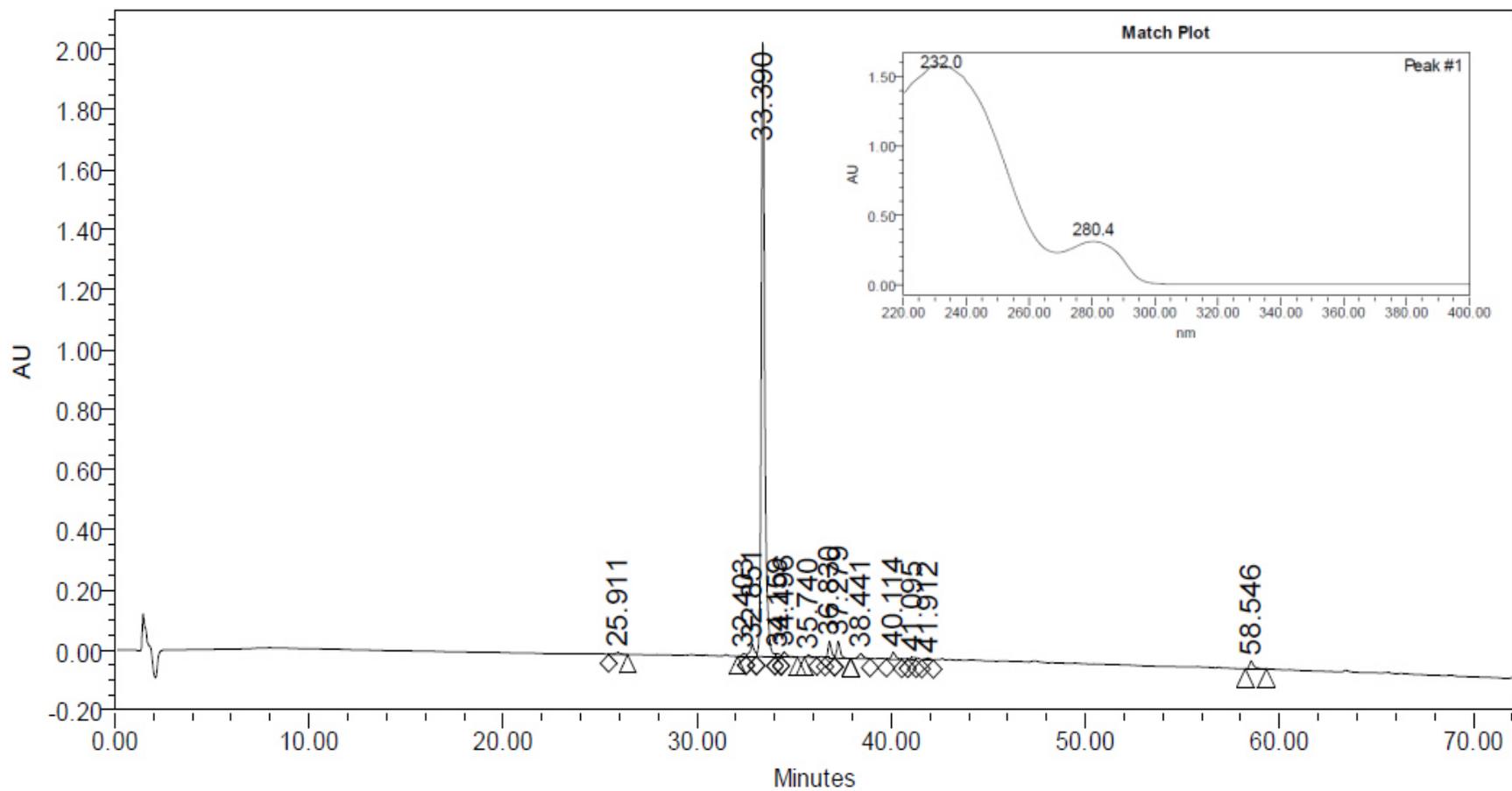


Figura 8. Perfil cromatográfico de la oleuropeína obtenida de extracto metanólico de hojas de olivo. Columna Luna C18, 2mm diámetro interno, tamaño de partícula 3µm fase móvil MeOH - acético 0.2% inicial 10/90, 70 min 100/0, flujo 0.2 ml/min, 232 nm. 924 mg oleuropeína/g muestra.

El perfil cromatográfico de la oleuropeína (92.4% pureza) obtenida a partir de la cristalización de las fracciones 25 a 29 de la columna cromatográfica de la fracción de acetato de etilo (M-AE) del extracto metanólico refinado de hojas de olivo (Figura 8) muestra un pico en el tiempo de retención a los 33.39 min correspondiente al del estándar oleuropeína. Podemos ver el espectro en UV a 320 nm y el tiempo de retención corresponde con el del estándar; conjuntamente se realizaron análisis de propiedades fisicoquímicas y resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono.

El espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno de la oleuropeína obtenida a partir de la cristalización de las fracciones 25 a 29 de la columna cromatográfica de la parte en acetato de etilo (M-AE) del extracto metanólico refinado de hojas de olivo (Figura 9) nos muestra que los desplazamientos químicos corresponden con la estructura de la oleuropeína y están acorde con lo reportado en la literatura [55, 56].

Desplazamientos químicos del espectro de resonancia magnética nuclear del Hidrogeno tomados de Damftoft 1992:  $^1\text{H}$  NRM ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$ 7.5(s, H-3), 6.79(d,  $J = 8.0$  Hz, H-5''), 6.66(d,  $J = 1.9$ Hz, H-2''). 6.54(dd, $J = 8.0$  Hz &  $J = 1.9$ Hz, H-6''), 6.07(br q,  $J = 7.2$  Hz, H-8), 5.90(br s, H-1), 4.20(dt,  $J = 10.7$  Hz &  $J = 7.0$  Hz, H<sub>b</sub>- $\alpha$ ), 3.96(dd,  $J = 9.2$  Hz &  $J = 4.4$  Hz, H-5), 3.70(3H, s, CoomE), 2.75(2H, t,  $J = 7.0$  Hz, H- $\beta$ ), 2.70(dd,  $J = 14.1$  Hz &  $J = 4.4$  Hz, H<sub>a</sub>-6), 2.42(dd,  $J = 14.1$  Hz, &  $J = 9.2$  Hz, H<sub>b</sub>-6), 1.65(3H, dd,  $J = 7.2$  Hz &  $J = 1.3$  Hz, 10-Me), 4.81(d,  $J = 7.6$  Hz, H1')

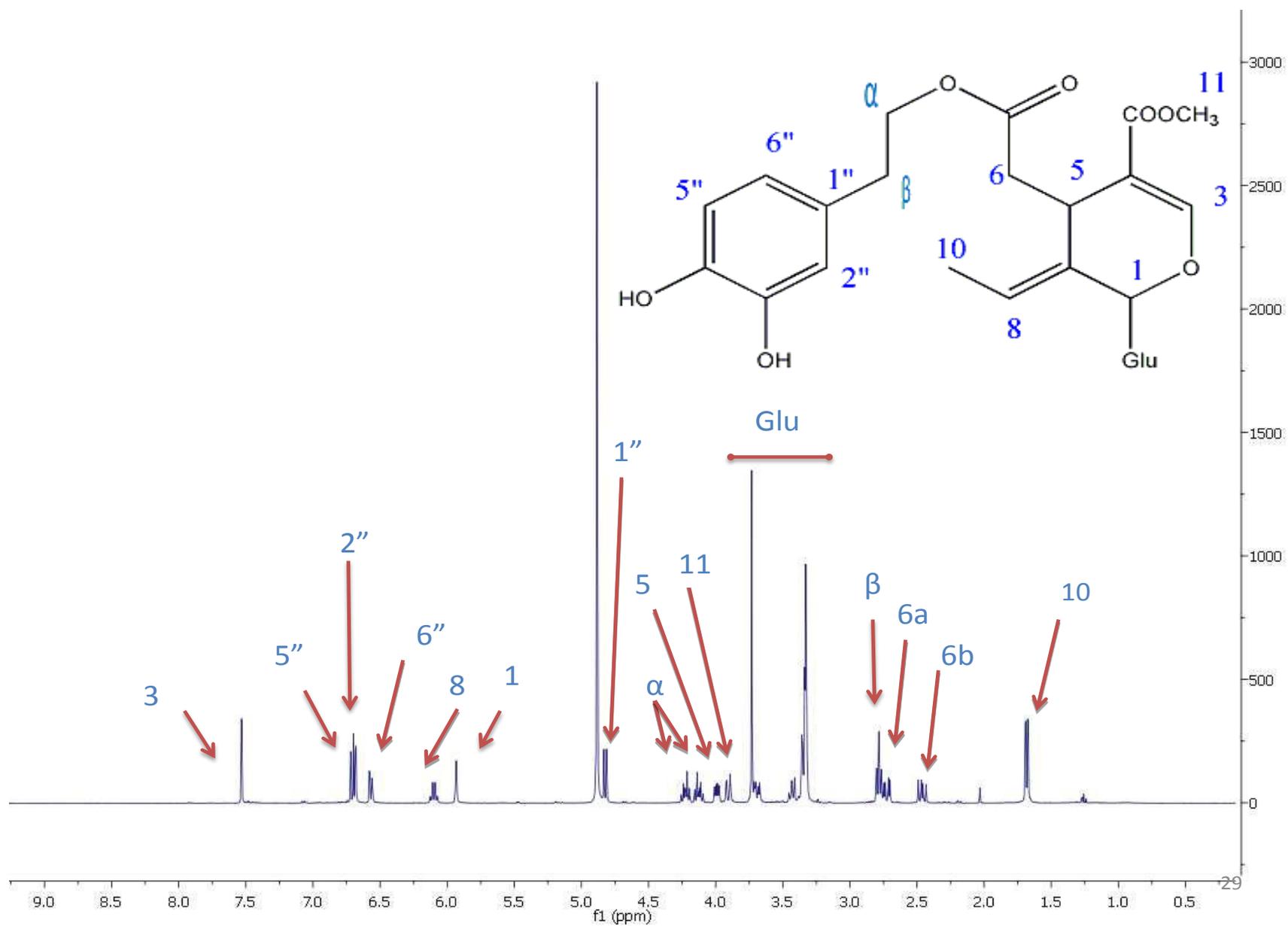




Figura 10. Fotografía de la oleuropeína obtenida a partir de hojas de olivo. Características físicas: sólido amarillo, punto de fusión: 87 a 90 °C (Shasha, Leibowitz 1961)

El análisis de las características fisicoquímicas, junto con la espectroscopia de resonancia magnética nuclear, el análisis por cromatografía líquida de alta resolución y el espectro en UV nos permite tener certeza de la identidad de la oleuropeína obtenida de hojas de olivo y también de la pureza de la muestra empleada en este estudio.

Con el propósito de conocer el efecto antioxidante de la oleuropeína y los extractos M-AE y M-H<sub>2</sub>O se realizó la determinación de las concentraciones de lípidos peroxidados y niveles de glutatión en hipocampo de ratas expuestas a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas.

Como se puede observar en la Figura 11 en la determinación de lípidos peroxidados en hipocampo de ratas expuestas a 1ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas podemos observar que a partir de la dosis de 10 mg/Kg de oleuropeína tenemos una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la disminución de la concentración de lípidos peroxidados con respecto a las ratas a las que no se les administró el fármaco.

En la Figura 12 podemos observar la determinación de lípidos peroxidados en hipocampo de ratas expuestas a 1ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas donde a partir de la dosis de 30 mg/Kg del extracto M-AE y de 80 mg/Kg del extracto M-H<sub>2</sub>O tenemos una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la concentración de lípidos peroxidados con respecto a las ratas a las que no se les administró el fármaco.

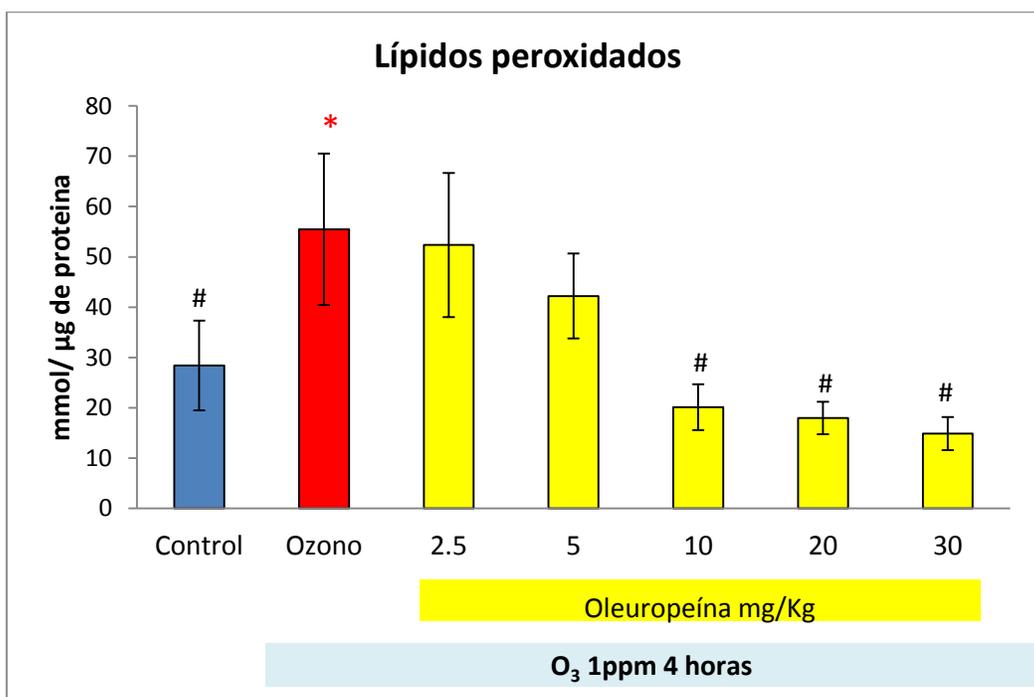


Figura 11. Efecto antioxidante de la oleuropeína sobre el aumento en la peroxidación lipídica causado en hipocampo de ratas por la exposición a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas. ANOVA seguida de una prueba de Tukey (\*p<0.05 vs control #p<0.05 vs Ozono)

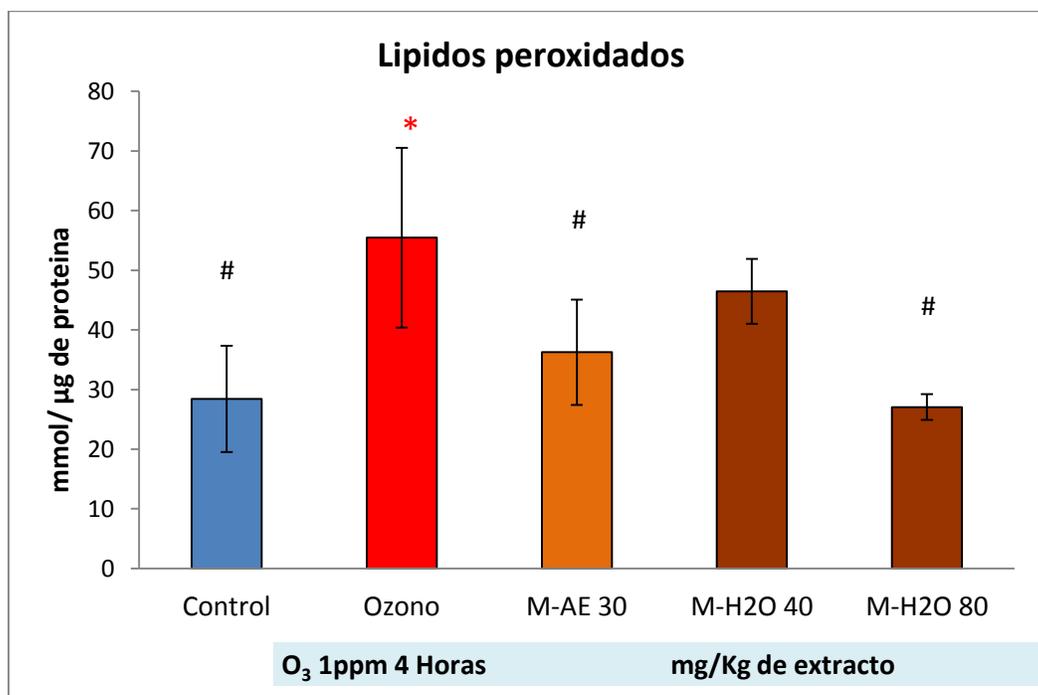


Figura 12. Efecto antioxidante de fracciones del extracto metanólico de hojas de olivo sobre el aumento en la peroxidación lipídica causado en hipocampo de ratas por la exposición a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas. ANOVA seguida de una prueba de Tukey (\*p<0.05 vs control #p<0.05 vs Ozono)

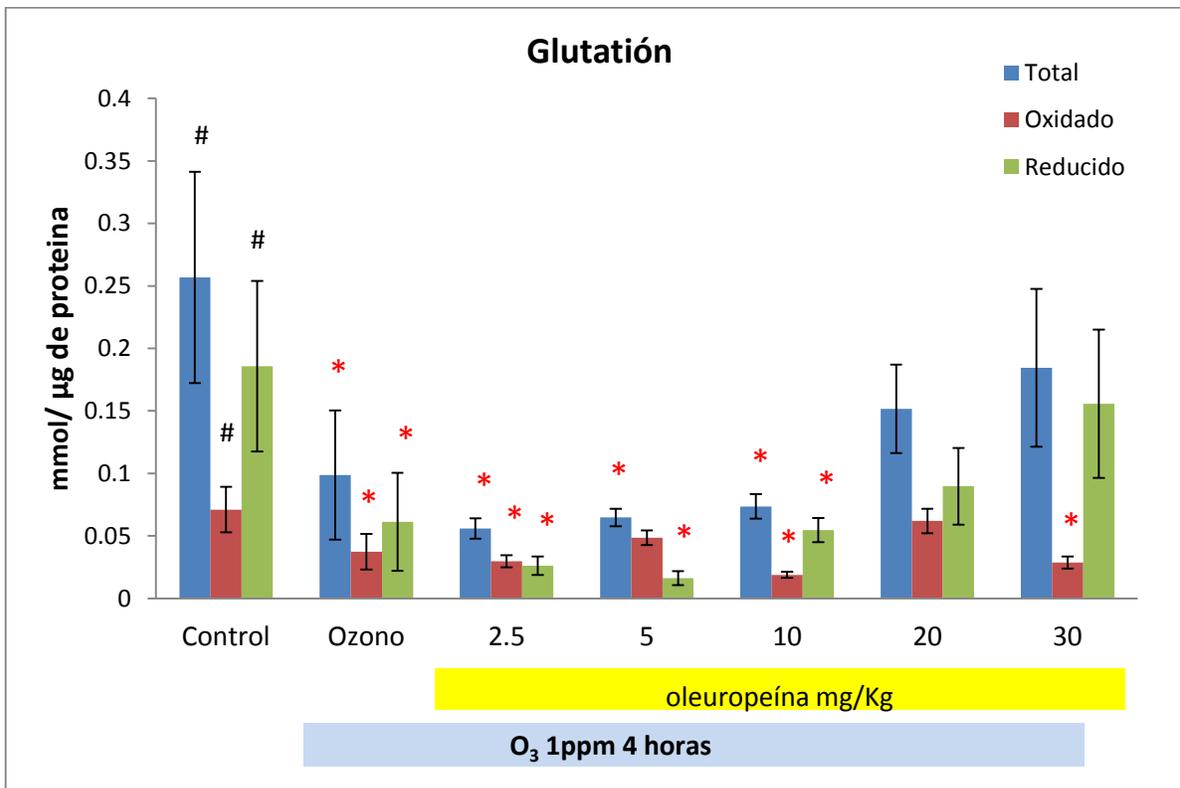


Figura 13. Efecto antioxidante de la oleuropeína sobre la disminución en los niveles de glutación disponible causada en hipocampo de ratas por la exposición a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas. ANOVA seguida de una prueba de Tukey (\*p<0.05 vs control #p<0.05 vs Ozono)

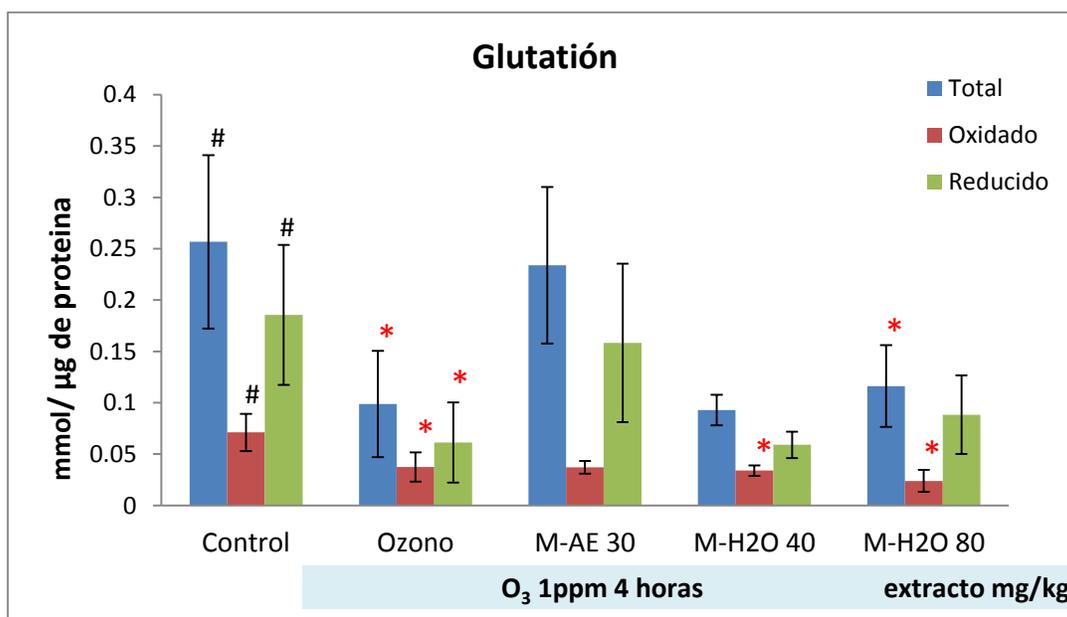


Figura 14. Efecto antioxidante de las fracciones del extracto metanólico de hojas de olivo sobre la disminución en los niveles de glutación disponible ocasionada en hipocampo de ratas por la exposición a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas. ANOVA seguida de una prueba de Tukey (\*p<0.05 vs control #p<0.05 vs Ozono)

En la figura 13 se puede observar la determinación de glutatión total en hipocampo de ratas expuestas a 1ppm de ozono por 4 horas, donde a partir de la dosis de 20 mg/Kg de oleuropeína, no se presenta una diferencia significativa en la concentración de glutatión total con respecto a las ratas del grupo control, lo mismo sucede con respecto a los niveles de glutatión reducido. En el caso del glutatión oxidado se presenta una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) a una dosis de 10 mg/Kg y también a una dosis de 30 mg/Kg .

En la figura 14 se puede observar la determinación de glutatión total en hipocampo de ratas expuestas a 1ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas donde a una dosis de 30 mg/Kg de la fracción de extracto M-AE no se presentó una diferencia significativa en la concentración de glutatión total con respecto a las ratas del grupo control, lo mismo sucede con respecto a los niveles de glutatión reducido; sin embargo, la recuperación en los niveles de glutatión total y reducido no tuvo lugar cuando se administra el extracto M-H<sub>2</sub>O a las dosis de 40 y 80 mg/Kg.

Se obtuvieron resultados del efecto antioxidante de la oleuropeína y las fracciones de extracto M-AE y M-H<sub>2</sub>O (Figura 11 a 14) ante la modificación en las concentraciones de lípidos peroxidados y de glutatión total y oxidado tras la exposición a una dosis alta de O<sub>3</sub> (1 ppm). Sin embargo, está establecido en diversos trabajos de nuestro grupo de investigación; que es la exposición crónica a bajas dosis de O<sub>3</sub> (0.25 ppm) la que permite modelar enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer y Parkinson dependiendo de la región encefálica que se estudie, por tal motivo se procedió a determinar el efecto dosis-respuesta de la oleuropeína ante la exposición aguda (por 4 horas) a 0.25 ppm de O<sub>3</sub>, cuantificando lípidos peroxidados y niveles de glutatión (Figura 15).

Al analizar las concentraciones de lípidos peroxidados en hipocampo de ratas expuestas a 0.25 ppm ozono de forma aguda (por 4 horas), estas no presentaron diferencias significativas en los tratamientos.

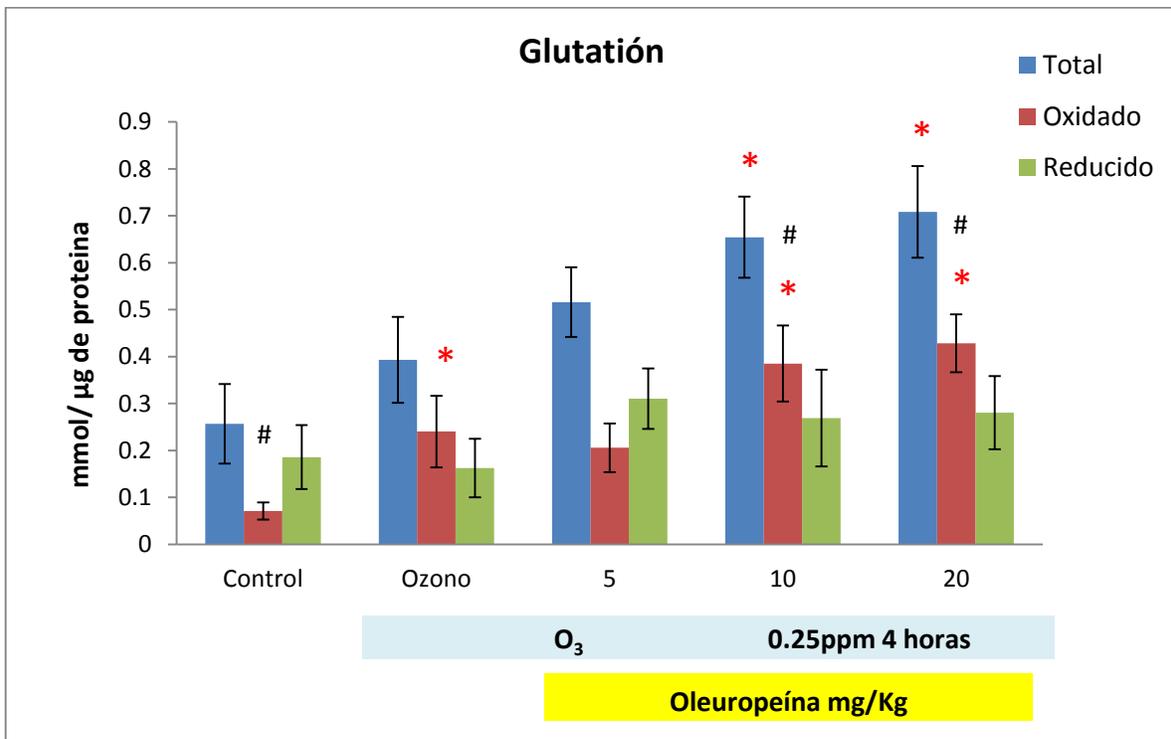


Figura 15. Efecto antioxidante de la oleuropeína ante la modificación de los niveles de glutatión disponible ocasionada en hipocampo de ratas por la exposición a 0.25 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas. ANOVA seguida de una prueba de Tukey (\*p<0.05 vs control #p<0.05 vs Ozono).

En la determinación de glutatión total en hipocampo de ratas expuestas a 0.25 ppm ozono por 4 horas, se puede observar que la exposición a ésta concentración de ozono produce un incremento significativo ( $p<0.05$ ) en la concentración de glutatión oxidado. Este incremento se ve atenuado con la administración de 5 mg/Kg de oleuropeína; sin embargo dosis mayores de oleuropeína muestran concentraciones superiores incluso a las de las ratas expuestas a ozono sin la administración de oleuropeína. Además a partir de la dosis de 10 mg/Kg de oleuropeína se presenta un incremento significativo ( $p<0.05$ ) en los niveles de glutatión total con respecto al grupo control; sin embargo las concentraciones de glutatión reducido no se vieron modificadas de manera significativa en ningún tratamiento (figura 15).

La evaluación de los niveles de glutatión en el hipocampo de ratas expuestas a 0.25 ppm de O<sub>3</sub> permiten establecer que la dosis de oleuropeína de 10 mg/Kg es la mínima necesaria para lograr un incremento significativo en los niveles de glutatión disponible; por tal motivo se eligió dicha dosis para evaluarla en un periodo de exposición de 30 días; periodo

en el cual el daño generado por la exposición a ozono (0.25 ppm 4 horas por día) presenta un proceso de neurodegeneración producida en el hipocampo de ratas expuestas a este gas.

En los ensayos de exposición crónica a ozono (0.25 ppm 4 horas por 30 días) las ratas tratadas con 10 mg/ Kg de oleuropeína no presentaron un incremento notable en la peroxidación lipídica. (Figura 16)

La exposición crónica a ozono (0.25 ppm 4 horas por 30 días) no causó una disminución significativa en las concentraciones de glutatión total, glutatión oxidado y glutatión reducido en las ratas tratadas con 10 mg/ Kg de oleuropeína. (Figura 17)

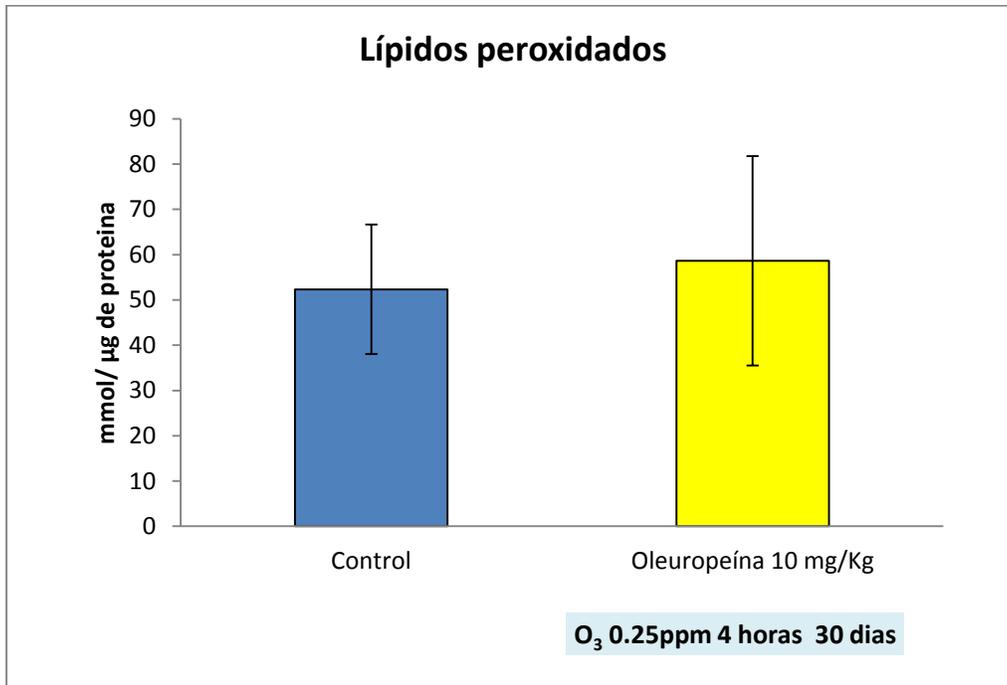


Fig 16. Efecto antioxidante de la oleuropeína ante la peroxidación lipídica ocasionada en hipocampo de ratas por la exposición a 0.25 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas durante 30 días.

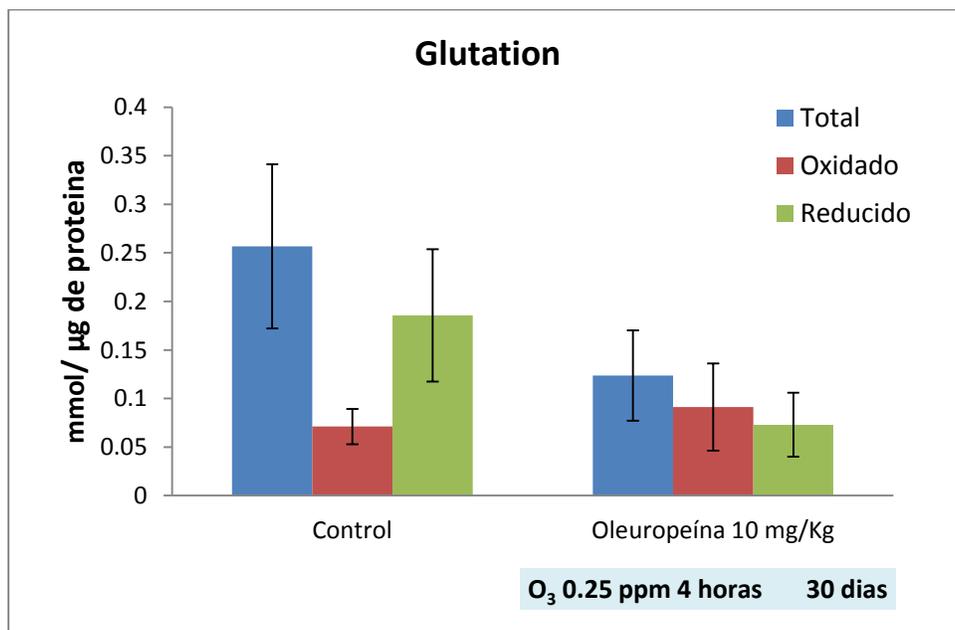


Fig 17. Efecto antioxidante de la oleuropeína ante la modificación de los niveles de glutatión disponible ocasionada en hipocampo de ratas por la exposición a 0.25 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas durante 30 días.

Una vez evaluado el efecto de la oleuropeína (10 mg/Kg) ante la peroxidación lipídica y la modificación en los niveles de glutatión ante una exposición a 0.25 ppm de O<sub>3</sub> por 30 días, una de las cuestiones que generan interés es la de identificar el posible mecanismo de acción que nos permita explicar los efectos observados. Uno de los puntos clave a resolver en este sentido es establecer las regiones dentro de la estructura de la oleuropeína a la cual se le puedan atribuir los efectos medidos, se hipotetizó que la región fenólica era la responsable de la actividad antioxidante, por tal motivo se evaluó el efecto antioxidante del catecol y ácido cafeico determinando las concentraciones de lípidos peroxidados (Figura 18) y niveles de glutatión (Figura 19) en hipocampo de ratas expuestas a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas.

En la figura 18 se puede apreciar que 4 mg/Kg de catecol así como 4.5 mg/Kg de ácido cafeico presentan una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la concentración de lípidos peroxidados con respecto a las ratas a las que no se les administró el fármaco.

En la figura 19 podemos apreciar que 4 mg/Kg de catecol así como 4.5 mg/Kg de ácido cafeico no presentan una diferencia significativa en la concentración de glutatión total, y glutatión reducido con respecto a las ratas del grupo control, sin embargo si presentan una concentración significativamente ( $p < 0.05$ ) más baja de glutatión oxidado.

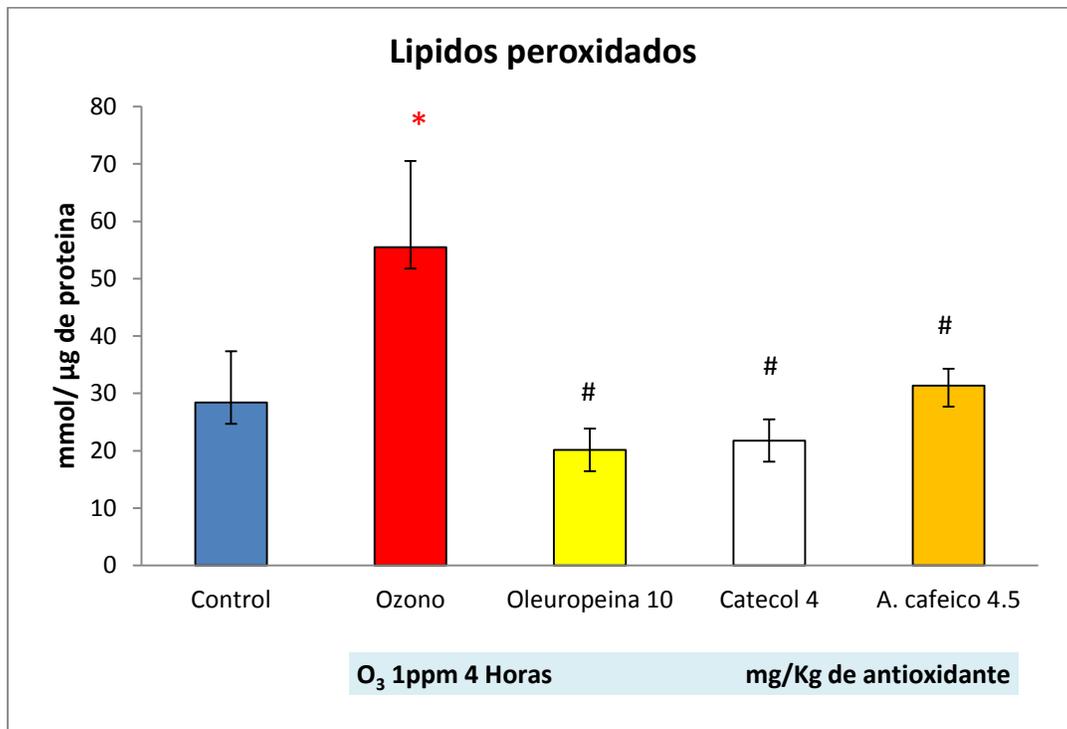


Figura 18. Efecto antioxidante del catecol y ácido cafeico sobre el aumento en peroxidación de lípidos causado en hipocampo de ratas por la exposición a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas. ANOVA seguida de una prueba de Tukey (\*p<0.05 vs control #p<0.05 vs Ozono)

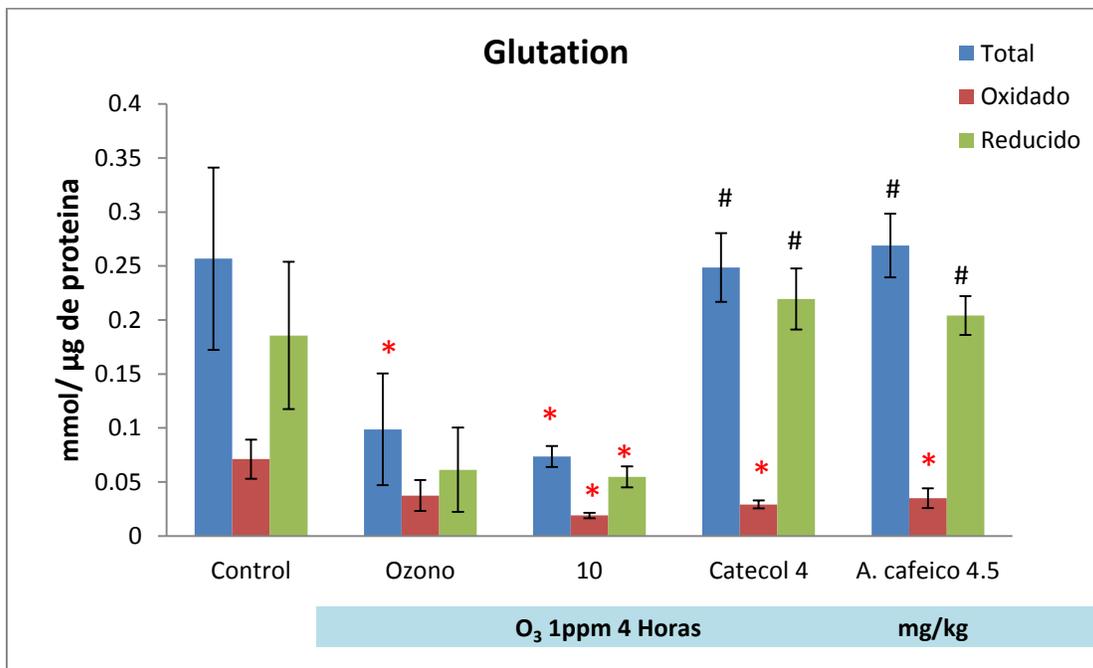


Figura 19. Efecto antioxidante de catecol y ácido cafeico ante la modificación de los niveles de glutatión disponible ocasionada en hipocampo de ratas por la exposición a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas. ANOVA seguida de una prueba de Tukey (\*p<0.05 vs control #p<0.05 vs Ozono)

## DISCUSIÓN

La investigación farmacológica puede servirse de referentes etnobotánicos que resultan de enorme valor pues presentan las siguientes virtudes:

1. La etnofarmacología realiza investigación pura, (trata con individuos enfermos, no con modelos animales) de este modo se da información directa del efecto terapéutico frente a la enfermedad misma que se trata de remediar, nos puede dar indicios de la seguridad, efectos secundarios, adversos y contraindicaciones.
2. Indica qué plantas se utilizan para tratar determinado padecimiento y qué características debe presentar la planta (crecimiento, madurez, época del año en el que se debe coleccionar, etc.)
3. Indica las estructuras de interés lo cual puede ahorrarle al grupo de investigación mucho trabajo, tiempo y recursos
4. El modo de preparación del tratamiento puede dar indicio de la forma idónea para realizar extractos abundantes en los principios activos de interés para el tratamiento del padecimiento referido

En este sentido, el olivo forma parte de la etnofarmacología principalmente de Marruecos [57] donde se le dan diversos usos terapéuticos, de entre ellos los usos que se dan con mayor frecuencia y consenso son para el tratamiento de la hipertensión y la diabetes[58, 59].

Por otra parte el aceite de olivo es un producto que ha formado parte de la alimentación humana desde hace miles de años, diversos estudios epidemiológicos y experimentales hacen evidente que el consumo de aceite de olivo está asociado a una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares [60, 61], trastornos metabólicos [52, 62], cáncer [33] y enfermedades neurodegenerativas [63]. En principio se puede pensar que la naturaleza misma de los ácidos grasos que componen al aceite de oliva pueden ser los responsables de los beneficios que aporta a la salud; sin embargo diversos estudios moleculares han mostrado que los efectos farmacológicos atribuibles al aceite de oliva tienen una relación

directa con el contenido de compuestos fenólicos [64, 65]; lo mismo sucede en el caso de las hojas de olivo ya que los principales compuestos fenólicos del aceite de oliva y de las hojas son la oleuropeína, el tirosol y el hidroxitirosol; estos compuestos y otros minoritarios comparten en primer lugar la estructura del tirosol y por consecuencia la del catecol [37].

Debido a la variabilidad reportada en las concentraciones de compuestos fenólicos en las hojas y frutos de olivo [66]; la atención de este trabajo se centró en la obtención de oleuropeína en hojas de olivo, considerando además que la mayoría de las publicaciones en las que se obtuvo oleuropeína fue a partir de un extracto etanólico o metanólico [67-69]. Sin embargo después de una revisión mas detenida y después de ver diversos problemas que se presentan con el extracto metanólico al tratar de purificar la oleuropeína el mejor proceso es el que utilizó Andreadou y colaboradores en 2007 [46] al cual se le hicieron leves modificaciones; para así obtener oleuropeína pura en menos pasos; por lo cual se sugiere tomar este procedimiento para obtener oleuropeína en trabajos posteriores.

Obtenida una suficiente cantidad y pureza de oleuropeína se procedió a evaluar su capacidad antioxidante en el modelo de neurodegeneración por estrés oxidativo inducido con ozono. Este modelo tiene la virtud de generar diversos rasgos conductuales, alteraciones funcionales, modificaciones estructurales y cambios celulares y moleculares que coinciden enormemente con aquellos que se pueden encontrar en la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer; dependiendo de la región del tejido que se esté analizando (substancia nigra o hipocampo) [26-28]. Algunos de los cambios moleculares que se pueden apreciar en la enfermedad de Alzheimer y el modelo inducido por exposición a ozono son la pérdida de neuronas en las regiones del hipocampo, la localización de microglia fagocitaria, una alta cantidad de lípidos peroxidados, deficiencia en la funcionalidad de diversas proteínas entre las que están incluidas algunas de los sistemas antioxidantes endógenos como el sistema glutatión. Están por esclarecerse aun modificaciones en el ADN, ARN, proteínas y péptidos que pueden estar sucediendo en el modelo y que bien podrían tener correspondencia en la evidencia patológica. [26-28, 70]

Uno de los objetivos implícitos en este trabajo es el de relacionar el efecto antioxidante de extractos y fracciones purificadas con la concentración de una o un grupo de sustancias. Unos de los primeros datos es que el comportamiento del efecto antioxidante es directamente proporcional a la dosis, un hecho aun más revelador es que el efecto de las fracciones del extracto metanólico sobre la peroxidación de lípidos (Figura 12) ante la exposición a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas está dado directamente por la cantidad de oleuropeína cuantificada en ellos. Haciendo un simple análisis (despeje o regla de tres) podemos saber que la cantidad de oleuropeína en la dosis de 30 mg/Kg de la fracción M-AE es de 5.76 mg, en la dosis de 40 mg/Kg de la fracción M-H<sub>2</sub>O es de 3.68 mg, y en la dosis de 80 mg/Kg de la fracción M-AE de 7.36 mg de modo que la cantidad de oleuropeína en el extracto o en la fracción purificada es la responsable del efecto antioxidante, sin embargo esta afirmación no se cumple en la cuantificación de glutatión oxidado y total ante la exposición a 1 ppm de O<sub>3</sub> (Figura 13 y 14). En el caso del glutatión parece que algunos de los componentes del extracto M-AE le añaden potencia al efecto de la oleuropeína. Particularmente podrían tener importancia moléculas de bajo peso molecular como el catecol, ácido cafeico, tirosol e hidroxitirosol, ya que una misma masa representa un número mayor de moléculas.

Si comparamos los resultados de lípidos peroxidados y niveles de glutatión que se obtuvieron en la exposición aguda a 0.25 ppm de ozono, contra las que se obtuvieron después de 30 días, podemos ver en primer lugar que a pesar de la exposición prolongada a estas dosis bajas de ozono, las ratas tratadas con oleuropeína tiene niveles de lípidos peroxidados similares a los de las ratas control, además de que los niveles de glutatión total y en forma reducida no se vieron modificados significativamente, contrario a lo que pasa en el experimento agudo, donde los niveles de glutatión no solo no se ven disminuidos por la exposición a ozono si no que se ven incrementados. Para hacer un análisis completo de estos experimentos falta obtener datos del análisis de los niveles de lípidos peroxidados y de glutatión a ratas expuestas a 0.25 ppm por 30 días sin tratamiento de oleuropeína. Sin embargo, por lo que podemos observar en el artículo de Santiago-López y colaboradores [27] los niveles de lípidos peroxidados de las ratas tratadas con 0.25 ppm ozono por 30 días se ven aumentados por más del triple de los que se encuentran en el grupo control.

Al hablar de actividad antioxidante de fenoles, las evidencias encontradas en la literatura sugieren en numerosas ocasiones que la posición orto de los hidroxilos en el anillo aromático, es la que presenta la mayor actividad antioxidante en modelos *in vivo* e *in vitro* con respecto a otras posiciones y grupos sustituyentes [29, 45, 71]. Estos hechos nos llevaron a pensar en la utilización del ácido cafeico y posteriormente del catecol como objeto de comparación y referencia, ambos compuestos pueden ser productos naturales; el ácido cafeico se encuentra todas las plantas, mientras que el catecol se encuentra en concentración traza. En principio el uso del ácido cafeico presentó algunas dificultades en la solubilidad para la administración de dosis cercanas a 5 mg/Kg. Sin embargo, se trató de usar una dosis cercana a estos límites para comparar el efecto antioxidante de la oleuropeína. Durante el desarrollo de trabajos anteriormente desarrollados en el laboratorio se midió el efecto de vitamina C y vitamina E sobre la peroxidación de lípidos se descartó su uso por haberlos considerado poco relevantes, motivo por el cual no utilizamos esta clase de moléculas como control positivo.

Si nos basamos en el efecto antioxidante molécula a molécula la forma de calcular dosis equivalentes es considerar el peso molecular de cada sustancia. De modo que si el peso molecular de la oleuropeína es 3 veces el del ácido cafeico usando 4.5 mg/Kg de catecol obtendríamos un efecto antioxidante similar al de 13.5 mg/Kg de oleuropeína. En este estudio los resultados de peroxidación de lípidos en el hipocampo de ratas expuestas a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas administrando ácido cafeico tiene un efecto que se situaría en el rango del efecto de 5 a 10 mg/Kg de oleuropeína. En el caso de la determinación de los niveles de glutatión se obtuvieron cantidades mayores de glutatión reducido y total mayores a las que se pudieron obtener incluso con una dosis de 30 mg/Kg de oleuropeína.

Dados los problemas de solubilidad del ácido cafeico se buscó otra molécula para comparar estos efectos, la elegida fue el catecol, sin embargo, bien pudo haberse trabajado con la sal de sodio del ácido cafeico para lograr que esta fuera soluble. En el caso del catecol el peso molecular de la oleuropeína es 4.9 superior; por lo tanto, usando 4 mg/Kg de catecol obtendríamos un efecto antioxidante similar al de 19.6 mg/Kg de oleuropeína. Los resultados obtenidos con el catecol fueron cercanos a los estimados en el caso de peroxidación de lípidos en el hipocampo de ratas expuestas a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas, y nuevamente mayores a los que se obtuvieron con una dosis de 30 mg/Kg de oleuropeína.

Es importante resaltar que los efectos del ácido cafeico y del catecol sobre los niveles de glutatión en el hipocampo de ratas ante la exposición a 1 ppm y 0.25 ppm de ozono, son notablemente superiores a los de la oleuropeína, podrían tener diversas respuestas; una de ellas es que el efecto de la oleuropeína en el hipocampo de las rata es dado por un fragmento de esta que se ha generado posterior a su hidrólisis, este fragmento podría ser el tirosol o el hidroxitirosol y dependería de la velocidad de hidrólisis de la oleuropeína y la secuencia de eventos del metabolismo de primer paso [72, 73]. Otra respuesta es que la barrera hematoencefálica dificulta el tránsito de moléculas grandes; en el caso de la oleuropeína es muy probable que su ingreso al encéfalo requiera de transportadores pero que el catecol y ácido cafeico podrían tener libre tránsito. Es por ello que podría ser interesante en investigaciones posteriores analizar el ingreso de oleuropeína o sus metabolitos o fragmentos al encéfalo; evaluando los transportadores que permiten su migración, por el momento se especula que la oleuropeína podría transitar por proteínas transportadoras GLUT [43].

Un antecedente clave que se tomó previamente en esta investigación ha sido que en numerosas ocasiones se asume que la oleuropeína es una sustancia no tóxica, una de las razones por las que se asume este hecho es que no se ha podido llegar a una dosis letal, usando dosis mayores a 1000 mg/ml [74], tampoco se han encontrado efectos teratogénicos en embriones de pollo en dosis superiores a 2000 mg/Kg [75]. Por otra parte el catecol presenta evidencias de carcinogenicidad [76] en ensayos agudos y crónicos y una LD<sub>50</sub> intraperitoneal de 1048 mg/Kg y oral de 10g/Kg [77]. Sin embargo la diferencia en la dosis

letal podría también considerarse como resultado de la interpretación de la acción directa de una masa de compuesto en relación a la biomasa del animal; la consideración de la acción mol a mol nos podría llevar a la hipótesis de que si la LD<sub>50</sub> intraperitoneal del catecol es de 1048 mg/Kg, la dosis letal intraperitoneal de la oleuropeína podría encontrarse en torno a los 5135 mg/Kg y la LD<sub>50</sub> oral en 49 g/Kg, y de acuerdo a las dosis terapéuticas más altas empleadas en este trabajo (20 mg/Kg de oleuropeína y de 4 mg/Kg de catecol) el margen de seguridad de ambas sustancias sería idéntico (256 dosis). Para poner en contexto; una dosis de paracetamol recomendada para un adulto, para obtener un efecto analgésico; es de 15 mg/Kg siendo que la LD<sub>50</sub> para rata es de 1944 mg/Kg [78] el margen de seguridad de este fármaco esta aproximadamente en 129.6 dosis

Estos análisis comparativos nos hacen ver que muy probablemente los datos de carcinogenicidad asociados al ácido cafeico y catecol así como a otras sustancias que en muchos casos muestran resultados contradictorios como anti o pro cancerígenos podrían deberse a las dosis empleadas en estos estudios. Los efectos benéficos de un antioxidante deberán limitarse a una ventana terapéutica que deberá determinarse en cada caso, tanto para las dosificaciones agudas como para las terapias crónicas y bien podrían estar apoyados en el estudio del estado oxido-reducción de los tejidos del organismo, pudiendo analizarse lipoperoxidación y los sistemas antioxidantes endógenos. [71]

## CONCLUSIONES

- La dosis de 5 mg/Kg de oleuropeína es la mínima necesaria para evitar la peroxidación de lípidos provocada en el hipocampo de ratas expuestas a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas.
- La dosis de 20 mg/Kg de oleuropeína es la mínima necesaria para evitar la depleción en los niveles de glutatión provocados en el hipocampo de ratas por la exposición a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas.
- La cantidad de oleuropeína cuantificada en los extractos es directamente proporcional al efecto antioxidante para evitar la peroxidación de lípidos provocada en el hipocampo de ratas expuestas a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas.
- La dosis de oleuropeína de 10 mg/Kg es la mínima necesaria para lograr un incremento significativo en los niveles de glutatión disponible en hipocampo de ratas expuestas a 0.25 ppm de O<sub>3</sub>.
- El efecto antioxidante obtenido en el hipocampo de ratas expuestas a 1 ppm de O<sub>3</sub> por 4 horas por la oleuropeína, ácido cafeico y catecol es proporcional a la cantidad de moléculas de fármaco administradas.

## LITERATURA CITADA

- [1] Eduardo, F., Mitos y fraudes en la ecología. 2012.
- [2] Aisbett, E. K., Tuan Pham, Q., Natural replacements for ozone-depleting refrigerants in eastern and southern Asia. *International Journal of Refrigeration* 1998, 21, 18-28.
- [3] Molina, M. J., Heterogeneous chemistry on polar stratospheric clouds. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics* 1991, 25, 2535-2537.
- [4] Blaustein, A. R., Searle, C., in: Levin, S. A. (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)*, Academic Press, Waltham 2013, pp. 296-303.
- [5] Block, B. P., Status of the ozone depletion theory. *International Journal of Refrigeration* 1981, 4, 175-178.
- [6] Mustafa, M. G., Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radical Biology and Medicine* 1990, 9, 245-265.
- [7] Acerboni, G., Beukes, J. A., Jensen, N. R., Hjorth, J., *et al.*, Atmospheric degradation and global warming potentials of three perfluoroalkenes. *Atmospheric Environment* 2001, 35, 4113-4123.
- [8] Delgado Saborit, J. M., Validación e implementación de técnicas de captación pasiva para el estudio de los niveles y efectos de ozono troposférico y dióxido de nitrógeno en un área costera mediterránea. 2005.
- [9] Chen, P., Zhang, Q., Quan, J., Gao, Y., *et al.*, Ground-high altitude joint detection of ozone and nitrogen oxides in urban areas of Beijing. *Journal of Environmental Sciences* 2013, 25, 758-769.
- [10] Bocci, V., Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006, 216, 493-504.
- [11] Lippmann, M., Health effects of ozone. A critical review. *Air Pollut. Control Assoc* 1989, 39, 672-695.
- [12] Devlin, R. B., McDonnell, W. F., Mann, R., Becker, S., *et al.*, Exposure of humans to ambient levels of ozone for 6.6 hours causes cellular and biochemical changes in the lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1991, 4, 72-81.
- [13] Aris, R. M., Christian, D., Hearne, P. Q., Kerr, K., *et al.*, Ozone-induced airway inflammation in human subjects as determined by airway lavage and biopsy. *The American review of respiratory disease* 1993, 148, 1363-1372.
- [14] Krishna, M. T., Madden J Fau - Teran, L. M., Teran Lm Fau - Biscione, G. L., Biscione Gl Fau - Lau, L. C., *et al.*, Effects of 0.2 ppm ozone on biomarkers of inflammation in bronchoalveolar lavage fluid and bronchial mucosa of healthy subjects. 1998.
- [15] Broeckaert, F., Aرسالane, K., Hermans, C., Bergamaschi, E., *et al.*, Lung epithelial damage at low concentrations of ambient ozone. *Lancet* 1999, 353, 900-901.
- [16] Bhalla, D. K., Gupta, S. K., Lung injury, inflammation, and inflammatory stimuli in rats exposed to ozone. 2000.
- [17] Cho, H. Y., Zhang, L. Y., Kleeberger, S. R., Ozone-induced lung inflammation and hyperreactivity are mediated via tumor necrosis factor-alpha receptors. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2001, 280, L537-546.

- [18] Bell, M. L., McDermott A Fau - Zeger, S. L., Zeger SI Fau - Samet, J. M., Samet Jm Fau - Dominici, F., Dominici, F., Ozone and short-term mortality in 95 US urban communities, 1987-2000. 2004.
- [19] Bell, M. L., Dominici F Fau - Samet, J. M., Samet, J. M., A meta-analysis of time-series studies of ozone and mortality with comparison to the national morbidity, mortality, and air pollution study. 2005.
- [20] Rivas-Arancibia Selva, G.-R. o. C., Gomez-Crisostomo Nancy, Ferreira-Garcidueñas Ever, Flores Briseño Dulce, Navarro Luz, Rodríguez-Martínez Erika in: Chang, D. R. C.-C. (Ed.), *Neurodegenerative Diseases - Processes, Prevention, Protection and Monitoring*, InTech, <http://www.intechopen.com/books/neurodegenerative-diseases-processes-prevention-protection-and-monitoring/oxidative-stress-and-neurodegenerative-disease> 2011.
- [21] Ito, K., De Leon Sf Fau - Lippmann, M., Lippmann, M., Associations between ozone and daily mortality: analysis and meta-analysis. 2005.
- [22] Levy, J. I., Chemerynski, S. M., Sarnat, J. A., Ozone exposure and mortality: an empiric bayes metaregression analysis. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 2005, *16*, 458-468.
- [23] Goodman, S. N., The methodologic ozone effect. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 2005, *16*, 430-435.
- [24] Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006, *160*, 1-40.
- [25] Rivas-Arancibia, S., Guevara-Guzman, R., Lopez-Vidal, Y., Rodriguez-Martinez, E., *et al.*, Oxidative stress caused by ozone exposure induces loss of brain repair in the hippocampus of adult rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2010, *113*, 187-197.
- [26] Pereyra-Muñoz, N., Rugerio-Vargas, C., Angoa-Pérez, M., Borgonio-Pérez, G., Rivas-Arancibia, S., Oxidative damage in substantia nigra and striatum of rats chronically exposed to ozone. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2006, *31*, 114-123.
- [27] Santiago-López, D., Bautista-Martínez, J. A., Reyes-Hernandez, C. I., Aguilar-Martínez, M., Rivas-Arancibia, S., Oxidative stress, progressive damage in the substantia nigra and plasma dopamine oxidation, in rats chronically exposed to ozone. *Toxicology Letters* 2010, *197*, 193-200.
- [28] Rodríguez-Martínez, E., Martínez, F., Espinosa-García, M. T., Maldonado, P., Rivas-Arancibia, S., Mitochondrial dysfunction in the hippocampus of rats caused by chronic oxidative stress. *Neuroscience* 2013, *252*, 384-395.
- [29] Bendary, E., Francis, R. R., Ali, H. M. G., Sarwat, M. I., El Hady, S., Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences* 2013, *58*, 173-181.
- [30] Beatriz, R.-R., Propiedades antioxidantes de los productos de reacción de Maillar y su influencia en la absorción de hierro y cobre. Relación con la capacidad quelante de metales. *Tesis Universida de Granada* 2009.
- [31] Bendich, A., Physiological Role of Antioxidants in the Immune System. *Journal of Dairy Science* 1993, *76*, 2789-2794.
- [32] Stanley, L. L., Patricia Mazier, M. J., Potential explanations for the French paradox. *Nutrition Research* 1999, *19*, 3-15.

- [33] Grosso, G., Buscemi, S., Galvano, F., Mistretta, A., *et al.*, Mediterranean diet and cancer: epidemiological evidence and mechanism of selected aspects. *BMC surgery* 2013, *13 Suppl 2*, S14.
- [34] Serra, A., Rubio, L., Borrás, X., Macià, A., *et al.*, Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Molecular nutrition & food research* 2012, *56*, 486-496.
- [35] Caporaso, N., Savarese, M., Paduano, A., Guidone, G., *et al.*, Nutritional quality assessment of extra virgin olive oil from the Italian retail market: Do natural antioxidants satisfy EFSA health claims? *Journal of Food Composition and Analysis* 2015, *40*, 154-162.
- [36] Bouallagui, Z., Han, J., Isoda, H., Sayadi, S., Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 2011, *49*, 179-184.
- [37] Hayes, J. E., Allen, P., Brunton, N., O'Grady, M. N., Kerry, J. P., Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry* 2011, *126*, 948-955.
- [38] Omar, S. H., Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia pharmaceutica* 2010, *78*, 133-154.
- [39] Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., *et al.*, On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 1999, *51*, 971-974.
- [40] Impellizzeri, D., Esposito, E., Mazzon, E., Paterniti, I., *et al.*, Oleuropein aglycone, an olive oil compound, ameliorates development of arthritis caused by injection of collagen type II in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2011, *339*, 859-869.
- [41] Acquaviva, R., Di Giacomo, C., Sorrenti, V., Galvano, F., *et al.*, Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *International journal of oncology* 2012, *41*, 31-38.
- [42] Han, J., Talorete, T. P., Yamada, P., Isoda, H., Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology* 2009, *59*, 45-53.
- [43] Hamdi, H. K., Castellon, R., Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005, *334*, 769-778.
- [44] Esmaili-Mahani, S., Rezaeezadeh-Roukerd, M., Esmailpour, K., Abbasnejad, M., *et al.*, Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2010, *132*, 200-205.
- [45] Omar, S. H., Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2010, *18*, 111-121.
- [46] Andreadou, I., Sigala, F., Iliodromitis, E. K., Papaefthimiou, M., *et al.*, Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2007, *42*, 549-558.
- [47] Bazoti, F. N., Bergquist, J., Markides, K. E., Tsarbopoulos, A., Noncovalent Interaction Between Amyloid- $\beta$ -Peptide (1-40) and Oleuropein Studied by Electrospray

Ionization Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2006, 17, 568-575.

[48] Daccache, A., Lion, C., Sibille, N., Gerard, M., *et al.*, Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochemistry International* 2011, 58, 700-707.

[49] Mekinić, I. G., Gotovac, M., Skroza, D., Ljubenkovic, I., *et al.*, Effect of the extraction solvent on the oleuropein content and antioxidant properties of olive leaf (cv. Oblica, Lastovka and Levantinka) extracts. *Croat. J. Food Sci. Technol* 2014, 6, 7-14.

[50] Khalatbary, A., Ahmadvand, H., Neuroprotective effect of oleuropein following spinal cord injury in rats. *Neurol Res* 2012, 34, 44 - 51.

[51] Cabrerizo, S., De La Cruz, J., Lopez-Villodres, J., Munoz-Marin, J., *et al.*, Role of the inhibition of oxidative stress and inflammatory mediators in the neuroprotective effects of hydroxytyrosol in rat brain slices subjected to hypoxia reoxygenation. *J Nutr Biochem* 2013, 24, 2152 - 2157.

[52] Naska, A., Trichopoulou, A., Back to the future: The Mediterranean diet paradigm. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2014, 24, 216-219.

[53] Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979, 95, 351-358.

[54] Griffith, O. W., Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* 1980, 106, 207-212.

[55] Damtoft, S., Franzyk, H., Jensen, S. R., Excelsioside, a secoiridoid glucoside from *Fraxinus excelsior*. *Phytochemistry* 1992, 31, 4197-4201.

[56] Inoue, K., Nishioka, T., Tanahashi, T., Inouye, H., Three secoiridoid glucosides from *Ligustrum japonicum*. *Phytochemistry* 1982, 21, 2305-2311.

[57] Long, H. S., Tilney, P. M., Van Wyk, B. E., The ethnobotany and pharmacognosy of *Olea europaea* subsp. *africana* (Oleaceae). *South African Journal of Botany* 2010, 76, 324-331.

[58] Tahraoui, A., El-Hilaly, J., Israili, Z. H., Lyoussi, B., Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). *J Ethnopharmacol* 2007, 110, 105-117.

[59] Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., *et al.*, Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J Ethnopharmacol* 1997, 58, 45-54.

[60] Ruiz-Canela, M., Estruch, R., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Martínez-González, M. A., Association of mediterranean diet with peripheral artery disease: The predimed randomized trial. *JAMA* 2014, 311, 415-417.

[61] Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.-I., *et al.*, Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *New England Journal of Medicine* 2013, 368, 1279-1290.

[62] Salas-Salvadó, J., Bulló, M., Estruch, R., Ros, E., *et al.*, Prevention of Diabetes With Mediterranean Diets A Subgroup Analysis of a Randomized Trial. *Annals of Internal Medicine* 2014, 160, 1-10.

[63] Scarmeas, N., Stern, Y., Tang, M. X., Mayeux, R., Luchsinger, J. A., Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2006, 59, 912-921.

[64] Elamin, M. H., Daghestani, M. H., Omer, S. A., Elobeid, M. A., *et al.*, Olive oil oleuropein has anti-breast cancer properties with higher efficiency on ER-negative cells. *Food and Chemical Toxicology* 2013, 53, 310-316.

[65] Oi-Kano, Y., Kawada, T., Watanabe, T., Koyama, F., *et al.*, Oleuropein, a phenolic compound in extra virgin olive oil, increases uncoupling protein 1 content in brown adipose

tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2008, 54, 363-370.

[66] Xynos, N., Papaefstathiou, G., Psychis, M., Argyropoulou, A., *et al.*, Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. *The Journal of Supercritical Fluids* 2012, 67, 89-93.

[67] Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentão, P. c., *et al.*, Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry* 2005, 89, 561-568.

[68] Lee, O.-H., Lee, B.-Y., Lee, J., Lee, H.-B., *et al.*, Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresource Technology* 2009, 100, 6107-6113.

[69] Malik, N. S. A., Bradford, J. M., Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. *Scientia Horticulturae* 2006, 110, 274-278.

[70] Avila-Costa, M. a. R., Colín-Barenque, L., Fortoul, T. I., Machado-Salas, J. P., *et al.*, Memory deterioration in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat hippocampus CA1. *Neuroscience Letters* 1999, 270, 107-109.

[71] Odiatou, E. M., Skaltsounis, A. L., Constantinou, A. I., Identification of the factors responsible for the in vitro pro-oxidant and cytotoxic activities of the olive polyphenols oleuropein and hydroxytyrosol. *Cancer Letters* 2013, 330, 113-121.

[72] Gutierrez-Rosales, F., Romero, M. P., Casanovas, M., Motilva, M. J., Minguez-Mosquera, M. I., Metabolites involved in oleuropein accumulation and degradation in fruits of *Olea europaea* L.: Hojiblanca and Arbequina varieties. *Journal of agricultural and food chemistry* 2010, 58, 12924-12933.

[73] Markopoulos, C., Vertzoni, M., Agalias, A., Magiatis, P., Reppas, C., Stability of oleuropein in the human proximal gut. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 2009, 61, 143-149.

[74] Petkov, V., Manolov, P., Pharmacological analysis of the iridoid oleuropein. *Arzneimittel-Forschung* 1972, 22, 1476-1486.

[75] Hamdi K. Hamdi, J. H. T., Raquel Castellon, Antigen Biologicals Corporation US 2003, pp. <http://patents.justia.com/assignee/antigen-biologicals-corporation>.

[76] Hirose, M., Takesada, Y., Tanaka, H., Tamano, S., *et al.*, Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis* 1998, 19, 207-212.

[77] Index, S. M., <http://www.hazard.com/msds/tox/f/q29/q628.html> 1998.

[78] DrugBank, <http://www.drugbank.ca/drugs/db00316> 2013.