

Propiedades antioxidantes del hidroxitirosol procedente de la hoja de olivo (*Olea europaea* L.)



FIGURA 1. Hoja y flor de olivo. Foto: Bernat Vanaclocha.

P. de la Fuente
P. Chamorro
M. Moreno
M.A. Poza

Abstract

Hydroxytyrosol (2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol) is a phenolic compound present in the olive leaf, both in free and esterified form, and it stands out the rest of polyphenols because of its biological activities, as antimicrobial, inhibitor of the B4 leukotrien formation by the 5-lipoxygenase and inductor of apoptosis. Specially, the hydroxytyrosol antioxidant activity is one of the highest compared to other polyphenols, even higher than vitamin E.

It has been developed, from olive leaf extract with high content in polyphenols, a new hydrolysis process in mild conditions, with the object of obtaining solid free and stable hydroxytyrosol.

Key words

Olive, leaf, hydroxytyrosol, antioxidant, oleuropein.

Resumen

El hidroxitirosol (2-(3,4-dihidroxifenil)etanol) es un compuesto fenólico presente en la hoja del olivo en forma libre y esterificada y que destaca del resto de polifenoles por sus múltiples actividades biológicas, como antimicrobiano, inhibidor de la formación del leucotrieno B4 a nivel de la 5-lipoxygenasa e inductor de apoptosis. Más especialmente, la actividad antioxidante del hidroxitirosol es una de las más elevadas entre los polifenoles, siendo incluso superior a la de la vitamina E.

A partir del extracto de hoja de olivo con alto contenido en polifenoles se ha desarrollado un proceso de hidrólisis en condiciones suaves para obtener hidroxitirosol libre en estado sólido y estable.

Palabras clave

Olivo, hoja, hidroxitirosol, antioxidante, oleuropeína.

Introducción

El olivo, *Olea europaea* L., pertenece a la familia botánica *Oleaceae*, la cual comprende especies distribuidas por las regiones templadas del planeta, localizándose esencialmente en la cuenca del mediterráneo. Estudios epidemiológicos demuestran que el aceite de oliva contribuye, junto con frutas y vegetales, al conocido efecto beneficioso de la dieta mediterránea, que se traduce en una disminución de la incidencia de varias patologías degenerativas, atribuida a su contenido en polifenoles y, entre ellos, concretamente al hidroxitirosol.

Al igual que en el aceite de oliva, en las hojas de olivo se encuentran de forma abundante los polifenoles: hidroxitirosol o 3,4-dihidroxifeniletanol, oleuropeína (oleuropeósido) y oleurósido^(1, 2).

El hidroxitirosol ha sido objeto de numerosos estudios debido a su potente actividad neutralizadora de radicales libres. Este sencillo compuesto fenólico se encuentra en gran cantidad tanto en la hoja de olivo como en sus preparados (extractos), en forma libre o esterificado como oleuropeína. Además, la composición cuantitativa de compuestos fenólicos en el olivo es el resultado de una compleja interacción entre diversos factores, incluyendo el clima, grado de maduración, cultivo, secado de la planta, etc.⁽²⁾

El hidroxitirosol es conocido por su elevada capacidad para frenar el estrés oxidativo y neutralizar los radicales libres⁽³⁾. Diversos estudios han demostrado otras actividades biológicas, tales



FIGURA 2. Hoja y fruto de olivo. Foto: Bernat Vanaclocha.

como antiagregante plaquetario⁽⁴⁾, antioxidante de las lipoproteínas LDL⁽⁵⁻⁸⁾ e inhibidor de las lipoxigenasas (implicadas en el proceso inflamatorio)⁽⁹⁾, así como capacidad para inducir apoptosis en células HL-60 (10) y actividad in vitro contra bacterias Gram-negativo y Gram-positivo⁽¹¹⁾.

El hidroxitirosol resulta, por lo tanto, un interesante componente susceptible de ser incluido dentro de una dieta saludable con el fin de prevenir diversas patologías con alto impacto, actualmente, en la población. No obstante, debido a su baja concentración en el aceite de oliva, es conveniente emplear productos con una mayor riqueza y estabilidad.

Metabolismo y degradación en hojas de olivo

Los compuestos fenólicos aparecen como metabolitos secundarios en todas las plantas. Algunos fenoles pueden estar involucrados en metabolismo primario mientras que otros tienen efecto en el crecimiento de la planta, protegen a las células más vulnerables contra la foto-oxidación por la luz ultravioleta o son responsables de la resistencia a enfermedades. Como se ha propuesto recientemente⁽²⁾, en el caso del olivo los fenoles inician las señales químicas que desde las hojas modulan las etapas de floración y maduración de los frutos.

Hay muchos estudios sobre el fruto del olivo debido a su importancia desde el punto de vista industrial y, en particular sobre los polifenoles como la oleuropeína y sus productos de catabolismo debido a su alta concentración en la pulpa de los frutos y en el aceite procedentes de estos⁽²⁾. La hoja de olivo se ha estudiado menos en cuanto a las propiedades y metabolismo de los polifenoles. La biosíntesis y transporte de los polifenoles de los diferentes tejidos del olivo no está muy bien estudiada todavía⁽²⁾.

Las hojas tienen mayor cantidad y variedad de polifenoles que la pulpa del fruto. Los fenoles que son comunes en todos los tejidos del olivo son: tirosol, hidroxitirosol, 2-(3,4-dihidroxifenil) éster del etil (3S,4E)-4-formil-3-(2-oxoetil)hex-4-enoato (3,4-DHPEA-DEDA) y oleuropeína.

En la FIGURA 3 aparece un esquema sobre la interconversión entre los polifenoles del olivo, donde se muestra el papel central del hidroxitirosol en la formación de los otros polifenoles.

Al parecer, en las hojas del olivo se producen señales químicas iniciales que modifican las vías metabólicas de la planta. El ácido clorogénico tiene un papel central en la formación y maduración del fruto del olivo^(12, 13), su concentración puede ser 3-4 veces más elevada en hojas maduras⁽¹²⁾ y además su concentración varía durante los periodos de floración y formación del fruto⁽¹³⁾.

El tirosol muestra pocos cambios en las hojas nuevas o viejas, pero el contenido en hidroxitirosol aumenta en las hojas nuevas en la época de

maduración de los frutos⁽²⁾. La oleuropeína es el fenol predominante en las hojas nuevas y viejas tras la floración. Ryan et al.⁽²⁾ proponen que el precursor de la oleuropeína es el 3,4-DHPEA-DEDA y consideran que se necesita elucidar bien el metabolismo y las variaciones temporales de los diferentes fenoles para comprender mejor el papel de cada uno de ellos.

Las enzimas endógenas hidrolíticas, principalmente las glicosidasas, pueden activarse durante procesos de molienda de las hojas o maceración en

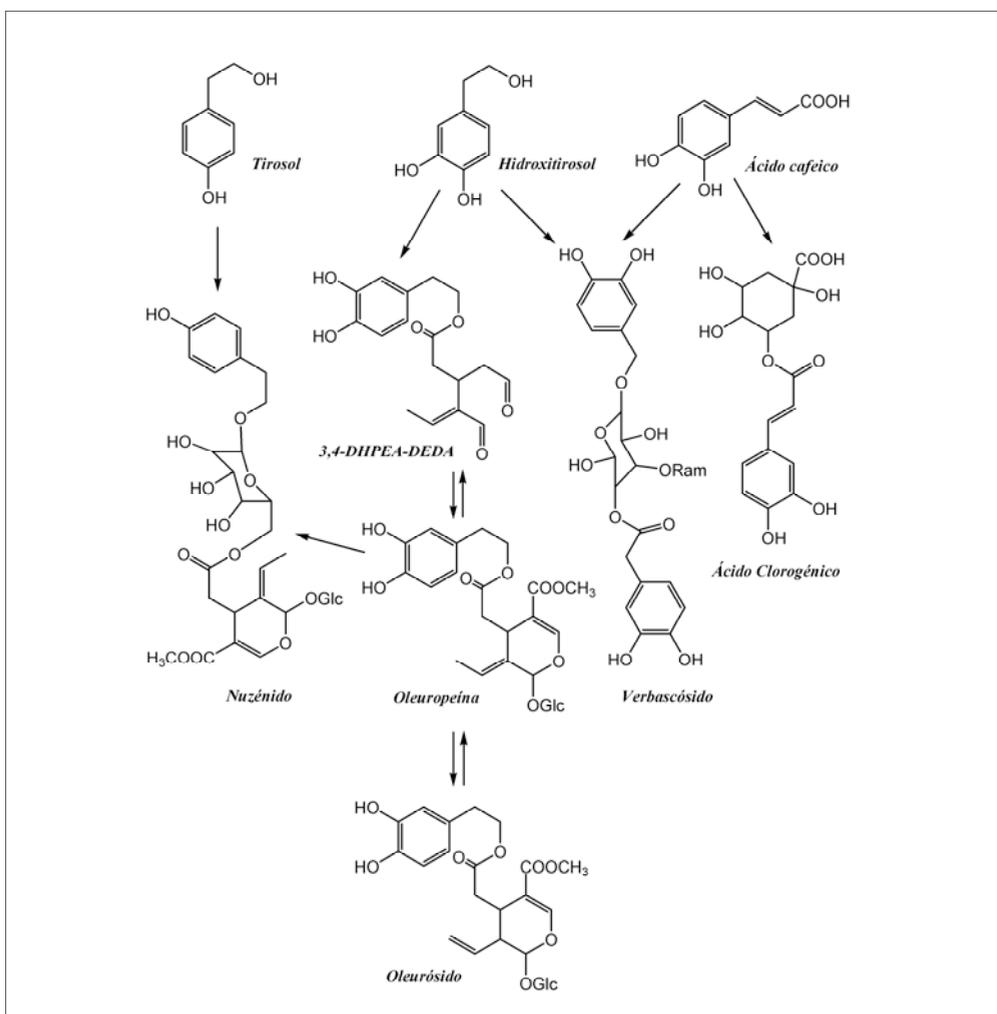


FIGURA 3. Interrelaciones metabólicas de los componentes fenólicos del olivo.

extractos acuosos y catalizar la hidrólisis de los fenoles como la oleuropeína ^(2, 14) con la consiguiente producción del aglicón, que se isomeriza rápidamente a través de la forma enólica a un dialdéhido (FIGURA 4).

En Exxentia hemos demostrado experimentalmente que la oleuropeína disminuye de forma importante en hojas secas tratadas con agua a temperatura ambiente. Se toman hojas frescas recién cortadas y hojas desecadas a temperatura ambiente de la misma cosecha y árbol y se extraen con metanol. Otra muestra de las mismas hojas desecadas se extrae primero con agua a temperatura ambiente durante 12-16 horas y después de escurridas y secas se extraen con metanol. Las dos muestras iniciales de hojas frescas y secas extraídas con metanol tienen un contenido del 5% en oleuropeína referido a materia seca, mientras que las hojas secas extraídas primero

con agua y después con metanol pierden el 99% de su contenido en oleuropeína hasta un 0,07% (TABLA 1).

El contenido de hidroxitirosol en forma libre y combinada es superior en las hojas que en los frutos del olivo ⁽²⁾, por lo que puede ser extraído con mejores rendimientos a partir de extractos metanólicos de la hoja.

	TRATAMIENTO CON AGUA A 22°C	EXTRACCIÓN CON METANOL A 50°C
HOJAS SECAS	-	5,03%
HOJAS FRESCAS	-	5,09%
HOJAS SECAS	0,026%	0,07%

TABLA 1. Contenido de oleuropeína en hoja de olivo tras distintos tratamientos, expresado en porcentaje sobre materia seca.

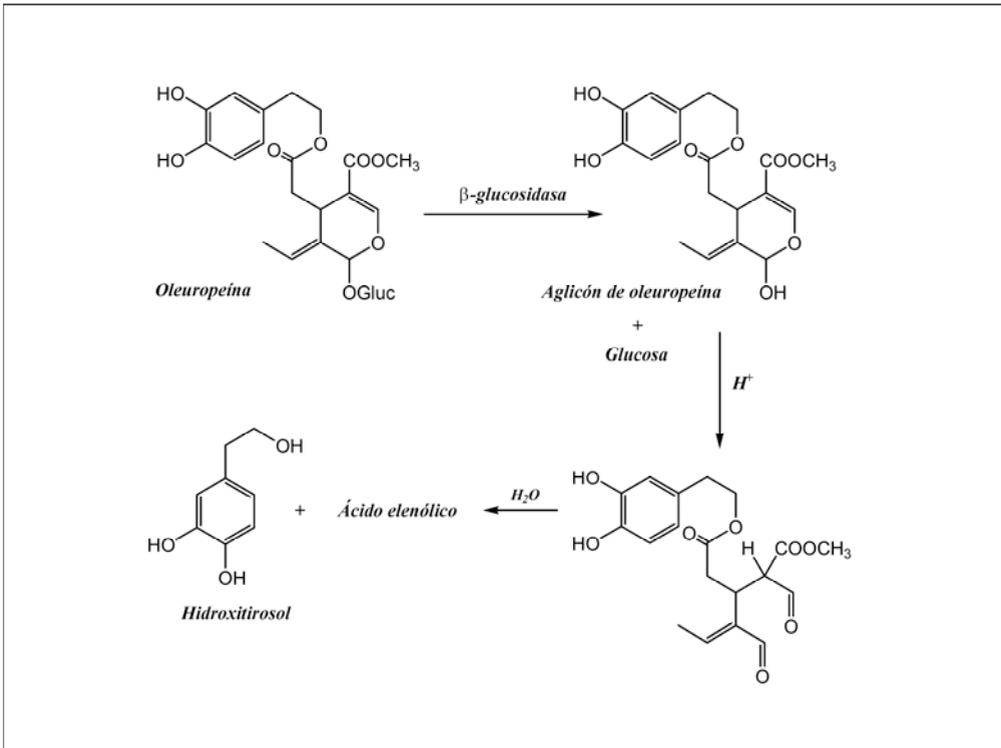


FIGURA 4. Hidrólisis y degradación parcial de la oleuropeína en hojas de olivo.



Obtención del hidroxitirosol

El hidroxitirosol se ha obtenido por síntesis química o enzimática y por extracción y purificación a partir de subproductos de la industria del aceite (15).

Una serie de patentes (ES 2 145 701 (16), ES 2 186 467 (17), ES 2 170 006 (18), ES 2 172 429 (19), ES 2 177 457 (20)) desarrolladas por grupos de investigadores del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) han puesto a punto procedimientos de obtención de hidroxitirosol a partir de subproductos de la fabricación de aceitunas de mesa o del aceite, utilizando las aguas de lavado o bien los huesos de las aceitunas o el alpechín y alperujo, que son mezclas de agua y sólidos residuales de la obtención del aceite de oliva. En estos residuos hay fenoles y, entre ellos, el hidroxitirosol libre y derivados, que por tratamiento con vapor de agua a 200-240°C durante 5-10 min se hidrolizan y liberan hidroxitirosol. Estas patentes utilizan principalmente métodos cromatográficos para purificar y concentrar las soluciones de hidroxitirosol, pero tienen el inconveniente de que no producen hidroxitirosol en forma de producto seco.

En la patente ES 2-170-006 se realiza una síntesis enzimática a partir del tirosol por acción de la enzima tirosinasa. Este procedimiento es más lento y necesita la presencia de vitamina C para evitar la oxidación del producto final.

Capasso *et al.* (21) han utilizado una síntesis química partiendo del ácido 3,4-dihidroxifenilacético como precursor, reduciendo el grupo ácido carboxílico con hidruro de aluminio y litio disuelto en tetrahidrofurano. El hidroxitirosol obtenido así es caro debido al alto precio de los productos de partida.

Fabricación de un extracto valorado en hidroxitirosol

Exxentia fabrica un extracto valorado en hidroxitirosol, que denomina Olixol®. El método de producción parte de un extracto de hoja de olivo con alto contenido en hidroxitirosol libre, en oleuropeína y en otros compuestos que contienen el hidroxitirosol combinado. Se realiza una hidrólisis en condiciones de temperatura y acidez muy suaves, a tiempos cortos para que no haya pérdidas del hidroxitirosol formado. Se realiza un ligero ajuste del pH hasta la zona de 4-6 y después de con-

centrado bajo vacío se realiza una pulverización y secado en condiciones de temperatura inferiores a 60°C para minimizar pérdidas. El producto seco final es un extracto de la hoja del olivo que contiene casi los mismos productos de partida, ya que, debido a las condiciones suaves de pH, temperatura y tiempos cortos, solamente se han hidrolizado la oleuropeína y compuestos afines que contienen hidroxitirosol en forma de éster en la molécula. Además, se obtiene un extracto de concentración entre 4 y 6% de hidroxitirosol en forma sólida y estable, lo que es muy importante ya que en ningún trabajo publicado se ha indicado que se ha obtenido hidroxitirosol en forma seca, salvo en la síntesis química (21).

El extracto se presenta en forma de polvo de color ocre, sin un sabor u olor característicos. Al disolver parcialmente en agua, el pH de la disolución está entre 4 y 7. El polvo tiene un bajo contenido de humedad, inferior al 5,5%, y una densidad mayor de 0,4 g/ml. El residuo de cenizas después de calcinación es inferior al 12%. El 95% de las partículas tiene un diámetro inferior a 180 µm. Olixol® cumple, además, con las especificaciones de las Farmacopeas europea y española para el contenido en metales pesados (<20 ppm), disolventes residuales y contaminación microbiológica. Su formulación y la naturaleza liposoluble e hidrosoluble del hidroxitirosol, facilita la correcta dosificación y aplicación del extracto en formulaciones orales, cosméticas, o como conservante en aceites u otros productos alimenticios.

Propiedades químicas y biológicas del hidroxitirosol

El hidroxitirosol es un polvo blanquecino bastante soluble en agua y en disolventes orgánicos como los alcoholes de bajo peso molecular y sus mezclas. Es fácilmente oxidable en soluciones acuosas a menos que se tomen precauciones adecuadas de pH ácido y ausencia de oxidantes.

Capacidad antioxidante

Los principios activos con propiedades antioxidantes han despertado en los últimos años un creciente interés en la población. Los productos de mayor demanda, hasta el momento, han sido las vitaminas C y E, polifenoles del extracto de té verde, de uva y otros extractos de origen vegetal. La capacidad de estos agentes antioxidantes para

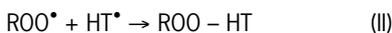
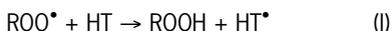


disminuir el daño oxidativo causado por la presencia de radicales libres puede ser de gran utilidad en diferentes sectores como el alimentario, cosmético y farmacéutico.

Los compuestos fenólicos predominantes en el aceite de oliva virgen son tirosol e hidroxitirosol, seguidos de ácido caféico y oleuropeína. La influencia de la estructura química sobre la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos ha sido descrita en la literatura ⁽²²⁻²⁴⁾; Chimi et al. ⁽²⁴⁾ mostraron que en oscuridad y a 50°C la capacidad antioxidante de dichos compuestos seguía el orden decreciente: hidroxitirosol > ácido caféico > oleuropeína > tirosol.

Los radicales libres son moléculas que presentan una gran capacidad oxidante y que generalmente dan lugar a reacciones en cadena oxidativa en las que, a su vez, se van formando otros radicales con gran capacidad oxidante. La actividad antioxidante determina la capacidad que tiene una molécula para introducirse en una cadena oxidativa y eliminar de la misma dichos radicales, poniendo fin a dicha cadena.

Refiriéndonos al hidroxitirosol (HT), su participación en una cadena oxidativa respondería a la siguiente cadena de reacciones del grupo peróxido ROO• ^(2,25,26):



y también:



Para el hidroxitirosol, la velocidad de las reacciones (III) y (V) es inferior en gran medida a la de las reacciones (II) y (IV), en las que se produce la eliminación de los radicales, rompiéndose así la cadena oxidativa.

Estos resultados se demuestran al observar la formación de dienos en la autooxidación de micelas de ácido linoléico *in vitro*. Tras 14 días de oxidación, los niveles de dienos eran: 25,7% control, 14,0% con tirosol, 3,0% con oleuropeína y 1,9% con hidroxitirosol ⁽¹³⁾. Por otra parte, en ausencia de compuestos fenólicos, la concentración de ácido linoleico desciende dramáticamente (-90%

tras 16 días) debido a la oxidación. Sin embargo, la presencia de hidroxitirosol redujo el descenso de dicha concentración hasta tan sólo el 20%.

Estos resultados fueron corroborados al observar la reducción en la concentración de compuestos fenólicos (en medio acuoso) en presencia de micelas de ácido linoleico; de todos ellos, el que demostró ser más oxidable (reducción del 50% tras 12 días) fue el hidroxitirosol ⁽³⁾.

La reducción del radical estable DPPH por antioxidantes puede ser medida por seguimiento de la disminución de la absorbancia a 515 nm. A este respecto, el hidroxitirosol mostró una EC50 de $2,6 \times 10^{-7}$, menor que otros compuestos fenólicos como la oleuropeína ($3,63 \times 10^{-5}$), e incluso menor que las vitaminas E ($5,04 \times 10^{-6}$) y C ($1,31 \times 10^{-5}$) ⁽²⁷⁾.

Los tests *in vitro* realizados sobre la eliminación de anión superóxido mostraron una elevada capacidad para hidroxitirosol y oleuropeína. Es importante destacar en este punto la ineficacia de antioxidantes como la vitamina E frente a la producción de radical superóxido. ⁽²⁷⁾

Cuando se evaluó la protección antioxidante frente a daño por hipoclorito, tanto el hidroxitirosol como la oleuropeína mostraron una actividad protectora comparable, o incluso superior, a la de compuestos antioxidantes de referencia, como son las vitaminas C y E. ⁽²⁷⁾

Otro método por el que se ha determinado la actividad antioxidante de los polifenoles procedentes del fruto de olivo, es el ataque por radicales hidroxilo sobre el ácido salicílico. En este ensayo, la IC₅₀ más baja resultó ser la del hidroxitirosol (1,34 mM), lo que indicó mayor potencia antioxidante que la vitamina E como Trolox (12,24 mM) e incluso que el DMSO (2,30 mM). ⁽²⁸⁾

Todos estos datos *in vitro* se ven confirmados *in vivo* (en humanos y ratas) al estudiar la excreción urinaria de la 8-iso-PGF_{2α}, un biomarcador del estrés oxidativo. Dichos estudios mostraron una correlación inversa dosis-dependiente entre la excreción urinaria de la prostaglandina y la cantidad administrada de compuestos fenólicos provenientes de aceite de oliva. ⁽²⁹⁾

En resumen, numerosos estudios han demostrado *in vitro* la enorme capacidad antioxidante del hidroxitirosol, superior incluso a la de las vitami-



nas C y E. Esta capacidad puede ser beneficiosa en patologías relacionadas con el estrés oxidativo.

Actividad antiesclerótica

En la patogénesis de la aterosclerosis, existen evidencias del papel desempeñado por la peroxidación de lipoproteínas. Cuando las LDL son modificadas por peroxidación, pueden actuar sobre receptores de superficie de macrófagos y monocitos, lo que conduce a la formación de depósitos grasos que a su vez conducirán a la formación de ateromas.⁽³⁰⁻³³⁾

Estudios realizados en rata mostraron que aquellas tratadas con una dieta rica en aceite de oliva presentaban una mayor resistencia a la peroxidación lipídica in vivo. Más aún, la fracción lipoproteica (VLDL+LDL) plasmática de este grupo de ratas mostró una mayor resistencia a la oxidación in vitro que aquellas sometidas a otras dietas.⁽³⁴⁾

Igualmente existen evidencias procedentes de estudios en humanos y en animales de que los leucocitos polimorfonucleares, están involucrados en el desarrollo de enfermedades coronarias, anginas y otras secuelas de la aterosclerosis.⁽³⁵⁻³⁷⁾ La localización y la activación de estas células están controladas localmente por mediadores tales como el leucotrieno B4, generado por la 5-lipooxigenasa. Se ha probado que esta enzima es inhibida por los compuestos fenólicos del aceite de oliva, con una efectividad del 35-100% para concentraciones de 200 µM, y con valores de EC₅₀ de 15, 20, 80, y 500 µM para hidroxitirosol, ácido cafeico, oleuropeína y tirosol, respectivamente.⁽⁹⁾

Capacidad antimicrobiana⁽¹¹⁾

Se ha demostrado que el hidroxitirosol se presenta como un buen candidato para ser empleado como agente antimicrobiano contra bacterias patógenas en seres humanos, obteniéndose concentraciones mínimas inhibitorias que van de 0,97 a 31,25 µg/ml para cepas aisladas clínicamente, siendo en ocasiones efectivo a menor concentración que la eritromicina y la ampicilina (TABLA 2).

Capacidad inductora de apoptosis

Dentro del tratamiento del cáncer, la quimioprevención (administración de agentes químicos, tanto sintéticos como naturales, con el objeto de prevenir la carcinogénesis) está cobrando especial importancia últimamente. Entre los agentes capaces de disminuir la tasa de transformación celular maligna, los antioxidantes parecen ser especialmente prometedores.

Estudios epidemiológicos indican que el aceite de oliva ejerce un remarkable efecto preventivo del desarrollo de cáncer de mama y colon⁽³⁸⁻³⁹⁾. Diversos descubrimientos sugieren que la fracción polifenólica y más concretamente el 2-(3,4-dihidroxifenil)-etanol, es responsable de algunos de estos efectos beneficiosos^(4, 8, 9, 40, 41). Se han obtenido datos según los cuales el hidroxitirosol inhibe el 100% de la proliferación celular de células HL60 a concentraciones de 100 µM e induce la apoptosis en más de un 65% de las células estudiadas en 24 h⁽⁴²⁾. Estos resultados contrastan con la débil actividad inductora de apoptosis observada en el tirosol, análogo del hidroxitirosol que carece del grupo hidroxilo en posición orto.

	HIDROXITIROSOL	AMPICILINA	ERITROMICINA
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,90 - 15,60	>500	0,50 - 15,60
<i>Salmonella spp.</i>	1,90 - 7,80	0,97 - 31,25	n.a.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0,97	1,95	n.a.
<i>Staphylococcus aureus</i> ^a	3,9 - 31,25	>500	0,97 - 125

^a Resistente a la penicilina

n.a.: no activo

TABLA 2. Rango de concentración mínima inhibitoria (µg/ml).



Autores

P. de la Fuente, P. Chamorro, M. Moreno, M.A. Poza
 Exxentia Consulting
 González Dávila, 18, 6º Dcha
 E-28031 Madrid
 Tel.: +34 913802973
 Fax: +34 913802279
 www.exxentia.com

Dirección de contacto

Pedro J. de la Fuente
 e-mail: pjfuente@exxentia.com

Referencias bibliográficas

- Pio Font Quer. Plantas medicinales el Dioscórides renovado. 10ª Edición. Barcelona: Ed Labor, 1987.
- Ryan D, Prenzler PD, Lavee S, Antolovich M, Robards K. Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *J Agr Food Chem* 2003; 51: 2532-2538.
- Chimi H, Cillard J, Cillard P, Rahmani M. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *JAOCS* 1991; 68, 307-312.
- Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res* 1995; 78(2): 151-160.
- Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247, 60-64.
- Grignaffini P, Roma P, Galli C, Catapano AL. Protection of low-density lipoprotein from oxidation by 3,4-dihydroxyphenylethanol. *Lancet* 1994; 343(8908):1296-7
- Visioli F, Bellomo G, Montedoro GF, Galli C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 1995; 117: 25-32.
- Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, Leone A, Zappia V. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *J Nutr* 1997; 127: 286-292.
- De la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Robin J, Hoult S. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 445-449.
- Della Ragione F, Cucciolla V, Borriello A, Della Pietra V, Pontoni G, Racioppi L, Manna C, Galletti P, Zappia V. Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 733-739.
- Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharmacol* 1999; 51: 971-974.
- Lavee S. Involvement of plant regulators and endogenous growth substances in the control of alternate bearing. *Acta Hort* 1989; 239:311-322
- Lavee S, Harshemesh H, Avidan N. Phenolic acids-possible involvement in regulating growth and alternate fruiting in olive trees. *Acta Hort* 1986; 179: 317-328.
- Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Ryan D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst* 2000; 125: 989-1009.
- Fernández-Bolaños J, Rodríguez G, Rodríguez R, Heredia A, Guillen R, Jimenez A. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "alperujo". *J Agric Food Chem* 2002; 50: 6804-6811.
- Fernandez-Bolaños Guzmán J, Heredia Moreno A, Felizón Becerra B, Brenes Balbuena M, Guillén Bejarano R, Rodríguez Arcos R. Procedimiento de obtención de hidroxitirosol a partir de hueso de aceituna. Patente ES 2145701 (2000).
- Brenes Balbuena M, Castro A. Obtención de sustancias antioxidantes a partir de soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa. Patente ES 2186467 (2003).
- Espin de Gea JC, Soler Rivas C, Wichers HJ, Tomás Barberán FA, García Viguera C, Ferreres de Arce F. Síntesis enzimática del antioxidante hidroxitirosol. Patente ES 2170006 (2002).
- Fernandez-Bolaños J, Heredia Moreno A, Rodríguez Gutierrez G, Rodríguez Arcos R, Jimenez Araujo A, Guillen Bejarano R. Procedimiento de obtención de hidroxitirosol purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo Patente ES 2172429 (2002).
- Fernandez-Bolaños J, Heredia Moreno A, Rodríguez Gutierrez G, Rodríguez Arcos R, Jimenez Araujo A, Guillen Bejarano R. Mejoras introducidas en la patente principal N° 200002422 relativa a un Procedimiento de obtención de hidroxitirosol purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo. Patente ES 2177457 (2002).
- Capasso R, Evidente A, Avolio S, Solla F. A highly convenient synthesis of hydroxytyrosol and its recovery from agricultural waste waters. *J Agr. Food Chem.* (1999) 47:1745-1748.
- Mahoney LR,. Antioxidants. *Angew Chem Internat Edit* 1969; 8: 547.
- Denisov ET, Khudyakov IV. Mechanism of action and reactivities of the free radicals of inhibitors. *Chem. Rev* 1987; 87: 1313.
- Chimi H, Sadik A, Letoutour B, Rahmani M, Contribution à l'étude comparative des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olive du tyrosol de l'hydroxytyrosol, de l'acide caféique de l'oleuropeine et de BHT. *Rev Fran Corps Gras* 1988; 35: 339.



25. Howard JA. Absolute rate constants for reactions of oxyl radicals. *Adv Free-radical Chem* 1972; 4: 49-173.
26. Porter NA. Radicals and lipids. *Acc Chem Res.* 1986;19: 262.
27. Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols, *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 60-64.
28. Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chem Toxicol.* 2000, 38:647-659.
29. Visioli F, Caruso D, Galli C, Viappiani S, Galli G, Sala A. Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 797-799.
30. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New Engl J Med* 1989; 320: 915-924.
31. Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2995-2998.
32. Steinbrecher UP, Zhang H, Loughheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Rad Biol Med* 1990; 9: 155-168.
33. Heinecke JW. Free radical modification of low-density lipoprotein: mechanisms and biochemical consequences. *Free Rad Biol Med* 1987; 3: 65-73.
34. Scaccini C, Nardini M, D'Aquino M, Gentili V, Di Felice M, Tomassi G. Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasma and lipoprotein fractions. *J Lipid Res* 1992; 33: 627-633.
35. Mehta J, Dinerman J, Mehta P, Saldeen TG, Lawson D, Donnelly WH, Wallin R. Neutrophil function in ischaemic heart disease. *Circulation* 1989; 79: 549-556.
36. Ricevuti G, de Servi S, Mazzone A, Angoli L, Ghio S, Specchia G. Increased neutrophil aggregability in coronary artery disease. *Eur Heart J* 1990; 11: 814-818.
37. Ricevuti G, Mazzone A, Mazzucchelli I, Fossati G, Pasotti D, Cavigliano P, Rolandi L, Viarengo G, Rossi M, Notario A. Phagocyte activation in coronary artery disease. *FEMS Microbiol Immunol* 1992; 5: 271-278.
38. Boyle P, Zaridze DG, Smans M. 1985. Descriptive epidemiology of colorectal cancer. *Int J Cancer* 36, 9-18.
39. GreenWald P. 1999. Perspectives of prevention. *Adv Exp Med Biol* 472, 1-19.
40. Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, Zappia V. Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J Nutr Biochem* 1999; 10: 159-165.
41. Manna C, Della ragione F, Cucciolla V, Borriello A, D'Angelo S, Galletti P, Zappia V. Biological effects of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil endowed with antioxidant activity. *Adv Exp Med Biol* 1999; 472: 115-130.
42. Della Ragione F, Cucciolla V, Borriello A, Della Pietra V, Racioppi L, Soldati G, Manna C, Galletti P, Zappia V. Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem Biophys Res Com* 1998; 250, 53-58.

Fe de erratas:

En las páginas 71-72 del número 1, volumen 4, mayo de 2004, en el anexo que incluye el listado de plantas tóxicas establecido por el Ministerio de Sanidad y Consumo, las especies relacionadas desde *Cynanchum vincetoxicum* Pers. y hasta *Diploclisia* sp. ambas inclusive, aparecen numeradas de forma errónea desde el 50 al 59 siendo su numeración correcta del 60 al 69.

En la página 76 del mismo número donde dice: "Especies que aparecen repetidas: ...18, 50 y 192; ...53 y 157; 70 y 135; ...157 y 185.", debe decir: "Especies que aparecen repetidas: ...18, 60 y 192; ...63 y 167; 70 y 136; ...157 y 186."

En www.fitoterapia.net tienen a su disposición un documento PDF debidamente corregido.