

Tesina de Grado presentada para la obtención
del Título de Licenciada en Bioquímica

Efecto de polifenoles del aceite de oliva sobre la formación de ácidos grasos nitrados

Mellany Gisella Santos Amaro

Tutora: Dra. Beatriz Sánchez Calvo
Co tutor: Dr. Mauricio Mastrogiovanni

Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO)
Facultad de Medicina, Universidad de la República.
Diciembre 2024, Montevideo, Uruguay

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento al CEINBIO por haberme brindado las instalaciones y los diferentes espacios necesarios para desarrollar esta tesis. También agradezco al INIA de “Las Brujas” por proporcionarnos el aceite de oliva, materia prima fundamental para este proyecto.

De manera especial, quiero dedicar un agradecimiento sincero a Bea, mi tutora y mentora. Fuiste quien me guió en mis primeros pasos en la ciencia y me ofreció la oportunidad de trabajar en un tema que realmente me apasionaba. Pero, sobre todo, gracias por tu paciencia inquebrantable a lo largo de estos años, que no siempre fueron fáciles. Siempre respetaste mis tiempos y entendiste cuando mi carrera quedaba en segundo plano, incluso anticipándote a mis propias necesidades y emociones. Gracias por recibirme de nuevo con los brazos abiertos cada vez que regresaba, siempre con nuevas oportunidades para crecer. Por los congresos, las reuniones, los cafés compartidos y por estar siempre pensando en el bienestar y desarrollo de tus estudiantes, gracias Bea.

A Mauri, quien se ganó el lugar de co-tutor. Gracias por tu apoyo constante, por estar siempre dispuesto a ayudar y a escuchar cuando necesitábamos pensar en voz alta para organizar nuestras ideas. Tu capacidad para contribuir con soluciones, junto con ese toque de humor que aliviaba las situaciones más complicadas, fue invaluable.

A Sofi, mi compañera de laboratorio, gracias por tu compañía en este camino. Aunque cada una trabajó en su proyecto, siempre nos apoyamos mutuamente, y eso hizo la diferencia.

A los integrantes del grupo de investigación, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme cuando lo necesité. Principalmente a Ire, Lu y Sofi, gracias por su apoyo.

Quiero agradecer profundamente a mis padres, quienes desde el principio han sido mi mayor sostén. Gracias por guiarme, acompañarme y siempre creer en mí. A mi hermana, mi motor, mi ejemplo de fortaleza y superación, mi mayor

orgullo. Sos quien me enseñó a nunca rendirme y a enfrentar los desafíos con valentía.

A Iván, mi esposo y compañero de vida, gracias por estar a mi lado desde el día en que elegí este camino. Por darme fuerzas en cada examen, por prepararme el mate y por leer mi tesis, incluso sin entender mucho de lo que trataba. Tu apoyo ha sido invaluable.

A mis amigos de siempre, Brai y Nati, gracias por estar presentes en cada momento importante de mi vida.

A mis amigos de FCien, Santi, Andrés, Manu, Vicky, Caro, Mateo, Tincho, Flo y Magui, gracias por los años compartidos, por las clases interminables, las reuniones y los festejos.

A todos ustedes, gracias por formar parte de este camino y por ser una pieza esencial en la culminación de este proyecto.



Índice

Abreviaturas.....	1
Resumen	2
.....	4
1.Introducción	4
.....	4
1.1 Aspectos generales del aceite de oliva	5
1.1.1 Breve reseña histórica sobre el cultivo de olivo	5
1.1.2 Producción nacional y variedades de olivo	6
1.1.3 Aceite de oliva y clasificación	7
1.1.4 Proceso de elaboración del aceite de oliva	11
1.2 Composición del aceite de oliva virgen	13
1.2.1 Ácidos grasos	14
1.2.2 Compuestos fenólicos	17
1.3 Aceite de oliva y salud humana.....	20
1.3.1 Bioactividad de los polifenoles.	22
1.4 Ácidos grasos nitrados.	25
1.4.1 Formación de ácidos grasos nitrados	26
1.4.2 Formación de las especies nitradas NO ₂ -OA y NO ₂ -cLA	29
1.4.3 Efectos beneficiosos de los ácidos grasos nitrados.	31
2.1 Objetivo general	34
2.2 Objetivos específicos	35
3. Materiales y métodos	36
3.1 Materiales	37
3.1.1 Aceite de oliva virgen	37
3.1.2 Reactivos	37
3.2 Métodos	37
3.2.1 Determinación del perfil de ácidos grasos.....	37
3.2.2 Detección y cuantificación de ácido linoleico conjugado	37
3.2.3 Extracción de polifenoles	38
3.2.4 Cuantificación de polifenoles totales	39
3.2.5 Determinación de perfil de polifenoles mediante HPLC.....	39
3.2.6 Aceite sintético	40
3.2.7 Nitración gástrica	41
3.2.8 Determinación y cuantificación de ácidos grasos nitrados	41
3.2.9 Determinación y Cuantificación de la oxidación de ácidos grasos	42
3.2.10 Análisis de los datos	42
.....	43
4.Resultados y discusión	43
4.1 Determinación del perfil de ácidos grasos en el AOVE.....	44
4.2 Detección y cuantificación de ácido linoleico conjugado	44
4.3 Cuantificación de polifenoles	46
4.2 Determinación del perfil de polifenoles mediante HPLC.....	48
4.3 Nitración y oxidación de ácidos grasos	54

5. Conclusiones	60
6. Referencias.....	63

Abreviaturas

AOL: Aceite de oliva lampante
AOV: Aceite de oliva virgen
AOVE: Aceite de oliva virgen extra
ASOLUR: Asociación Olivícola Uruguaya
AVC: Aceite virgen corriente
BHT: Butilhidroxitolueno
COI: Consejo Oleícola Internacional
DIEA: Oficina de Estadísticas Agropecuarias
HT: Hidroxitirosol
HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento
IL-6: Interleucina proinflamatoria
MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados
NO₂-cLA: Ácido nitro-linoleico conjugado
NO₂-FA: Ácidos grasos nitrados
NO₂-LA: Ácido nitro-linoleico
NO₂-Ln: Ácido nitro-linolénico
NO₂-OA: Ácido nitro-oleico
NO₂⁻ :Nitrito
NO₃⁻ :Nitrato
NO₂• :Radical dióxido de nitrógeno
NO• :Radical óxido nítrico
OL :Oleuropeína
PUFA: Ácidos grasos polinsaturados
SPE: Extracción de fase sólida
TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TNF- α: Factor de necrosis tumoral alfa

Resumen

El aceite de oliva es considerado un alimento funcional debido a que, además de brindar los nutrientes necesarios para satisfacer los requerimientos metabólicos, posee compuestos bioactivos que tienen beneficios para la salud. Los polifenoles forman parte de la fracción minoritaria del aceite de oliva virgen y se caracterizan por su acción biológica como compuestos antioxidantes, antiinflamatorios y antiproliferativos, por lo tanto pueden ser considerados agentes protectores importantes frente a la prevención de muchas de las enfermedades crónicas no transmisibles. Estos compuestos fenólicos son metabolitos secundarios caracterizados químicamente por la presencia de uno o más sustituyentes -OH unidos a un anillo aromático. Se generan tanto por reacciones enzimáticas como no-enzimáticas durante la maduración del fruto y se van modificando mediante el proceso de elaboración del aceite. Además de contribuir en lo antes mencionado, son responsables de parte de las características organolépticas del aceite y darle su característico sabor amargo. La concentración de los mismos varía según factores intrínsecos y extrínsecos del cultivo, como la etapa de maduración del fruto, el método de extracción, clima, prácticas agronómicas, tipo de suelo, entre otros. En comparación con otros aceites vegetales, el aceite de oliva virgen tiene mayor estabilidad oxidativa debido a que presenta una mayor relación MUFA/PUFA y a la presencia de estos componentes minoritarios que protegen frente a algunos agentes oxidantes.

Otros de los componentes minoritarios de relevancia en los aceites de oliva son los ácidos grasos nitrados. Éstos son derivados de ácidos grasos insaturados que tienen una función nitroalqueno y que han demostrado tener propiedades benéficas para la salud con actividad citoprotectora y anti-inflamatoria en diferentes líneas celulares y condiciones fisiopatológicas, además son precursores de numerosas moléculas señalizadoras. Se ha demostrado que los aceites contienen ácidos grasos nitrados de forma endógena pero también se ha visto que los ácidos

grasos del aceite son susceptibles de nitración durante la digestión gástrica post ingesta. Cuando son ingeridos junto con alimentos ricos en nitratos y nitritos, el pH bajo del estómago propicia un ambiente ideal para la nitración. Resultados previos muestran que distintas variedades de aceites, que presentan un perfil de ácidos grasos similar pero se distinguen por sus componentes minoritarios, generan distintas cantidades de ácidos grasos nitrados cuando son sometidas a simulación de digestión gástrica. Esto sugiere que compuestos minoritarios, como los polifenoles, podrían intervenir en el proceso de nitración.

En este trabajo se estudió el efecto de los polifenoles obtenidos a partir de dos variedades contrastantes de aceite de oliva, como lo son Arbequina y Coratina, sobre la formación de ácidos grasos nitrados en condiciones gástricas simuladas.

Los resultados indican que en ausencia de polifenoles se favorece la oxidación de los ácidos grasos mientras que a medida que se va aumentando la concentración de estos componentes se favorece la formación de las especies nitradas. Además, tras estudiar el perfil de polifenoles de las dos variedades contrastantes de aceite se observa un comportamiento diferencial en la formación de ácidos grasos nitrados, lo que indica una posible relación entre el tipo de polifenoles presentes en el aceite y la nitración.

En este trabajo se logró determinar la concentración y analizar el perfil de polifenoles de Arbequina y Coratina. A su vez, se obtuvo el perfil de ácidos grasos para estas dos variedades de aceite incluyendo la cuantificación del ácido linoleico conjugado, cuya determinación no se analiza de forma rutinaria. Finalmente se evidenció una correlación diferencial entre los polifenoles procedentes del aceite de oliva de las dos variedades y la nitración del cLA presente en un aceite sintético sometido a condiciones gástricas.



1.Introducción

1.1 Aspectos generales del aceite de oliva

1.1.1 Breve reseña histórica sobre el cultivo de olivo

El olivo, *Olea europaea* L., es la única especie con fruto comestible perteneciente a la familia botánica *Oleaceae*, dentro de la cual se encuentran otras especies de interés como el fresno, el ligustro y el jazmín. Las referencias históricas o religiosas más antiguas de los orígenes del cultivo y aprovechamiento del olivo proceden del Oriente Próximo entre el 9000 y 8000 a.C. Posteriormente, el olivo fue domesticado propagándose desde su zona de origen a Egipto y Creta. En Egipto hace más de 6000 años se creía que su origen se debía a la diosa Isis, esposa de Osiris. A su vez, hace más de 4000 años se situaba en las costas de Siria, Líbano e Israel (1–4).

Si nos centramos en Uruguay, se estima que los primeros olivos llegaron desde Buenos Aires aproximadamente en 1780. Dichas plantaciones se situaban sobre las costas del arroyo Miguelete, departamento de Montevideo. Los árboles tenían origen fundamentalmente español, eran de la variedad Arbequina, Picual, Manzanilla y Hojiblanca. En 1937 se instalan las dos primeras plantas de extracción de aceite. La primera ubicada en el departamento de Paysandú y la segunda instalada en Río Negro en el establecimiento “Los Ranchos”. Esta última sigue en pie y fue la primera marca que realizó exportaciones de aceite a Europa. Hoy en día existen plantaciones de olivos para la producción de aceite de oliva en los 19 departamentos del país (5,6).

Actualmente es producido al menos en 32 países, pero es consumido mundialmente. Diez de los mayores productores están situados en la cercanía del mediterráneo, siendo España el mayor productor a nivel mundial, seguido de Italia, Grecia y Turquía. España cultiva más de 215 millones de árboles de los 1000 millones de olivos sembrados en todo el planeta; los cuales se ubican un 95% de ellos en el área mediterránea (7).

1.1.2 Producción nacional y variedades de olivo

La Asociación Olivícola Uruguaya (ASOLUR), fue fundada en el año 2004, debido a la creciente producción de área olivícola a partir del año 2003; cuenta con más de 100 socios que integran toda la cadena productiva, viveristas, productores, almazarero, técnicos, proveedores, así como otras personas y empresas vinculadas al sector. ASOLUR organiza regularmente, en conjunto con organizaciones públicas y privadas, cursos y charlas de actualización a los socios, con expertos nacionales e internacionales, en temas agrícolas y comerciales.

En Uruguay existen más de 30 marcas destinadas a la producción del aceite de oliva, en el último censo realizado en el 2023 por la Oficina de Estadísticas Agropecuarias (DIEA) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca se reportó que la superficie afectada con olivos en el país es de 7.044 hectáreas, distribuidas en 208 explotaciones. De éstas, la superficie de montes con fines productivos alcanzó las 5.927 hectáreas distribuidas en 161 explotaciones. El principal empleo de la producción fue la elaboración de aceite, para la que se destinaron 17.125.735 de kilos de fruta, mientras que 13.000 kilos (menos del 1% del total) tuvieron como destino la elaboración de aceitunas de mesa. La producción total de aceite fue de 2.229.531 litros, equivalente a 2.047 toneladas, resultando en un rendimiento promedio de 11,9 % en base fresca (8). El consumo interno de aceites de oliva y orujo de oliva en Uruguay ha promediado alrededor de 1.700 toneladas en los últimos años, lo que genera unos 500 gramos per cápita al año. Los aceites de oliva representan solo un 2% del total de aceites consumidos en el país, dado que la población que adquiere este tipo de aceites suele restringir su uso para aliño de ensaladas u otros platos.

En Uruguay se cultivan más de veinte variedades de olivo, aunque son cuatro las que acumulan el 90 % de la superficie cultivada, siendo la variedad Arbequina la que presenta la mayor proporción con un 47% de la superficie con un total de 2543 ha, seguida por Coratina, Picual y Frantoio con 21%, 11% y 10%, respectivamente (9). Cada una de estas variedades de olivo posee características particulares que le otorgan sabor único al aceite producido. La variedad Arbequina

se trata de un cultivar de origen español, de la localidad de Arbeca, de donde deriva su nombre. Se caracteriza por ser resistente a las heladas, por tener fruto de pequeño tamaño y alta productividad. Su aceituna presenta forma ovalada, tiene proporción baja de pulpa y carozo pero su rendimiento en aceite es alto (7,10). Los aceites procedentes de esta variedad son descritos por los productores de aceite como: “muy frutado, de excelente calidad sensorial, se caracteriza por su suavidad, fluidez y extraordinaria fragancia, con característicos aromas a frutas blancas, generalmente muy poco amargo y picante”. En el frutado se perciben notas a tomate, banana, nueces, almendras y melaza. Tiene muy buena aceptación en los mercados poco habituados al consumo de aceite de oliva virgen debido a su suavidad característica (9).

Por su parte, el aceite del cultivar Coratina es considerado como: “aceite potente e intenso de amargos y picantes. Los aromas vegetales y especiados son característicos de esta variedad que tarda en madurar y permite excelentes resultados sensoriales aún en recolecciones lentas o tardías.” En el frutado se reconoce sabores mayoritariamente verdes como hierba, hoja de olivo, acompañado de notas a cáscara de banana y almendra verde. Coratina es un cultivar de origen italiano, de fácil adaptación a las distintas zonas de cultivo y productividad elevada. El fruto con un rendimiento graso en base seca de 41% y un contenido de ácido oleico de un 70% (11), es reconocido por ser rico en fenoles, lo cual se ve reflejado en elevados amargor y picante. Es muy común encontrar esta variedad en *blends* con Arbequina, ayuda a mitigar el picor y amargor que a los consumidores nuevos no suele gustarles.

1.1.3 Aceite de oliva y clasificación

El Consejo Oleícola Internacional (COI) es la única organización internacional intergubernamental dedicada al aceite de oliva y las aceitunas de mesa. Tiene sede en Madrid, España, fue creado en 1959, contribuye al desarrollo sostenible y responsable de la oleicultura y constituye un foro mundial donde se debaten las políticas a adoptar y se abordan los desafíos presentes y futuros del área. Tras

varios años como país “observador”, a partir de julio de 2013, Uruguay ha pasado a ser miembro de pleno derecho del COI, junto con otros 20 países (12). Dicha organización establece que el aceite de oliva virgen es aquel que se obtiene únicamente por procedimientos mecánicos o por otros medios físicos en condiciones, especialmente térmicas, que no produzcan la alteración del aceite, que no haya tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado (11). Siguiendo la normativa que establece el COI, las denominaciones de las categorías de aceite de oliva correspondientes a características físico-químicas y organolépticas son las siguientes: aceite de oliva virgen y aceite de orujo como muestra en la **Figura 1**. La primera categoría corresponde a los aceites obtenidos únicamente por medios mecánicos; a partir de éste se obtiene el aceite de oliva virgen extra (AOVE), el aceite de oliva virgen (AOV) y el aceite de oliva lampante (AOL). El AOVE y el AOV marcados con color verde en la figura son aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo en la forma en que se obtienen. Por otro lado, el aceite de orujo crudo es generado a partir del aceite de orujo mediante empleo de disolventes. Tras el tratamiento de refinación del AOL y el aceite de orujo crudo, se obtienen el aceite de oliva refinado y el aceite de orujo refinado.



Figura 1. Clasificación de los diferentes tipos de aceite que surgen del tratamiento de las aceitunas.

Los aceites se van a diferenciar unos de otros por las propiedades intrínsecas que poseen. Estas van a definir su calidad y la clase a la que pertenecen. Existen diferentes categorías en donde se evalúan aspectos del aceite desde distintas perspectivas. Para definirla tiene en cuenta la calidad nutricional, culinaria, comercial y reglamentaria. La calidad nutricional está relacionada con la composición que va a presentar el aceite, sus componentes mayoritarios y minoritarios. La culinaria, se basa en la caracterización sensorial, es decir en sus características organolépticas, sobre todo para la utilización en crudo o en frituras. En cuanto a la calidad comercial, se analiza la resistencia a la oxidación o vida útil. Por último, para la calidad reglamentaria se determinan una serie de parámetros incluidos en la reglamentación de la Comisión de las Comunidades Europeas (n° 2568/91 y 1989/2003), entre ellos la valoración sensorial, índices fisicoquímicos de calidad, como son la acidez libre, el índice de peróxidos y la absorbancia ultravioleta (13–15).

- Nivel de acidez libre: es uno de los parámetros químicos más relevantes a la hora de definir la calidad del aceite, se expresa en gramos de ácido oleico por 100 gramos de aceite, midiendo la cantidad de ácidos grasos libres presentes en la muestra. El aumento de la acidez libre se debe principalmente a la actividad enzimática, causada por daño tisular en la aceituna. Este daño puede ser ocasionado por un mal tratamiento del fruto durante la cosecha, por demoras en el procesamiento o por plagas y enfermedades (16,17).
- Índice de peróxidos: se expresa en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo que generan la oxidación del yoduro de potasio. Durante su conservación o exposición a la venta de los aceites se pueden formar hidroperóxidos, por lo tanto, permite estimar el grado de oxidación inicial (18).
- Absorción espectrofotométrica en el ultravioleta: Se analiza la absorción a 232 y 270 nm para detectar la presencia de sistemas dienos y trienos

conjugados. Se expresa como coeficiente de extinción K232/K270 y proporciona información sobre la calidad y estado de conservación (19,20).

- Mediana de frutado (Mf) y Mediana de defectos (Md): Se clasifican en función de la intensidad de los defectos detectados y del atributo frutado, determinada por un grupo de catadores seleccionados, entrenados, examinados y constituidos en panel. Algunos de los atributos positivos son, frutado, amargo, picante, por otro lado, los atributos negativos pueden ser, atrojado, moho, avinagrado, metálico, rancio, quemado, madera, basto, lubricante, alpechín, salmuera, esparto, tierra, gusano, pepino. La clasificación del aceite se realiza comparando el valor de la mediana de los defectos y de la mediana del atributo frutado.
 - Aceite de oliva virgen extra: la mediana de los defectos es igual a 0,0 y la mediana del frutado es superior a 0,0.
 - Aceite de oliva virgen: la mediana de los defectos es superior a 0,0 e inferior o igual a 3,5 y la mediana del frutado es superior a 0,0.
 - Aceite de oliva virgen corriente: la mediana de los defectos es superior a 3,5 e inferior o igual a 6,0, o bien la mediana de los defectos es inferior o igual a 3,5 y la mediana del frutado es igual a 0,0.
 - Aceite de oliva virgen lampante: la mediana de los defectos es superior a 6 (21,22).

Los principales parámetros de calidad de las diferentes categorías de aceites se detallan en la **Tabla 1**. Se incluyen los aceites de oliva vírgenes y no vírgenes.

Tabla 1. Valores de referencia de los parámetros de calidad de los aceites de oliva. Fuente: COI (11)

	Acidez libre (% m/m mg/oleico)	Índice de peróxidos (meq de O ₂ /kg aceite)	Absorbancia en UV (ΔK)	Md/Mf
Aceite de oliva virgen extra	≤ 0,8	≤ 20	≤ 0,01	Mf = 0,0 Mf > 0,0
Aceite de oliva virgen	≤ 2,0	≤ 20	≤ 0,01	0,0 < Md < 3,5 Mf > 0,0
Aceite de oliva lampante	> 3	No limitado	-	Md > 6,0

Aceite de oliva refinado	$\leq 0,3$	≤ 5	$\leq 0,16$	-
Aceite de oliva	$\leq 1,0$	≤ 15	$\leq 0,15$	-
Aceite de orujo de oliva crudo	No limitado	No limitado	-	-
Aceite de orujo de oliva refinado	$\leq 0,3$	≤ 5	$\leq 0,20$	-
Aceite de orujo de oliva	$\leq 1,0$	≤ 15	$\leq 0,18$	-

Al analizar los parámetros establecidos para el AOVE y el AOV, se puede observar que presentan características fisicoquímicas muy similares, específicamente en el índice de peróxidos y en la absorbancia UV. Con la diferencia de que los AOVE deben presentar una acidez $\leq 0,8$ y el AOV $\leq 2,0$. A nivel organoléptico, las diferencias son mayores. El AOVE no tiene defecto alguno, el resultado obtenido a través de panel de cata debe ser cero y su mediana de frutado debe ser mayor que cero. Por el contrario, en el AOV, la mediana de defecto apreciada en cata debe ser $\leq 3,5$, siendo la mediana de frutado mayor que cero. Vemos que, mientras el AOVE tiene que ser perfecto a nivel organoléptico, el AOV puede llegar a tener una mediana de defecto mayor a cero.

1.1.4 Proceso de elaboración del aceite de oliva

El proceso de elaboración del aceite varía según la región de producción y el tipo de aceite que se quiere obtener, pero a nivel general el proceso consta de tres pasos principales: el primero es la molienda de la fruta en donde las aceitunas son machacadas con el objetivo de producir la rotura de los tejidos de ésta donde se aloja la materia oleosa. El segundo paso consta en el batido o amasado de la pasta obtenida con el objetivo de agrupar las pequeñas gotas de aceite que están dispersas en la pasta obtenida y así formar una fase oleosa continua; y por último se realiza la separación del aceite del resto de los constituyentes del fruto. En esta última etapa, la extracción del aceite del resto de los componentes se puede subdividir en dos categorías: la separación sólido-líquido y la separación líquido-líquido. La primera separación es una etapa fundamental en el proceso de obtención del aceite, se procede a separar la fase líquida contenida en la pasta de las

aceitunas, este proceso es realizado mayoritariamente mediante centrifugación. Se pueden utilizar sistemas de separación de dos o de tres fases. Dependiendo de cual se utilice son los productos que se pueden obtener: alpechín, que es la fracción líquida; aceite, que es la fracción oleosa; orujo, que son los restos sólidos que se obtienen o alperujo, que es orujo más alpechín. El sistema de tres fases fue el primero en utilizarse, se inicia el proceso mezclando la pasta batida con una cantidad de agua a 30-35°C, con el objetivo de establecer una mayor separación entre la fracción sólida y oleosa en el interior del decantador, en este sistema se generan tres componentes, la fase oleosa, orujo y la fase acuosa (alpechín). En el sistema de dos fases no se adiciona agua al producto del proceso del batido y se obtienen dos fracciones, aceite y alperujo. En cuanto a la separación líquido-líquido se realiza para eliminar las impurezas y la humedad que contiene el aceite. Se puede realizar por decantación o mediante el uso de centrifugas. El aceite obtenido contiene aún impurezas sólidas, por lo que luego pasa a un sistema de filtrado (14,23).

A estos tres pasos generales hay que sumarle una etapa preliminar que consiste en la preparación del fruto para ser procesado, donde se incluye la recolección, transporte, almacenamiento y lavado del fruto. La recolección es un paso fundamental para asegurarse la calidad del futuro aceite. Cuando el fruto está entero, en un estado de maduración y con el color adecuado se da la máxima acumulación de aceite en el interior de la aceituna generando un mejor rendimiento en la producción (14,23).



Figura 2. Esquema de elaboración del aceite de oliva.

1.2 Composición del aceite de oliva virgen

La composición del AOV varía en función de diversos factores, como pueden ser el grado de maduración, la variedad del olivo y las condiciones climatológicas. A nivel químico se establece que el AOV está formado por dos grandes grupos según su abundancia en la misma (**figura 3**). El primer grupo recibe el nombre de compuestos mayoritarios, se corresponde a la fracción saponificable del aceite, equivalente al 97-99% del peso total. Está formado por triacilglicéridos que son el

componente principal del aceite de oliva, y en menor medida los ácidos grasos libres junto con mono y diglicéridos. Por otro lado, la segunda categoría corresponde a la fracción minoritaria que forma parte del 2% del peso total del aceite, a la que se llama fracción no saponificable formada por más de 230 compuestos, en los cuales se encuentran las vitaminas, pigmentos, polifenoles y esteroides (5,6,14,24).

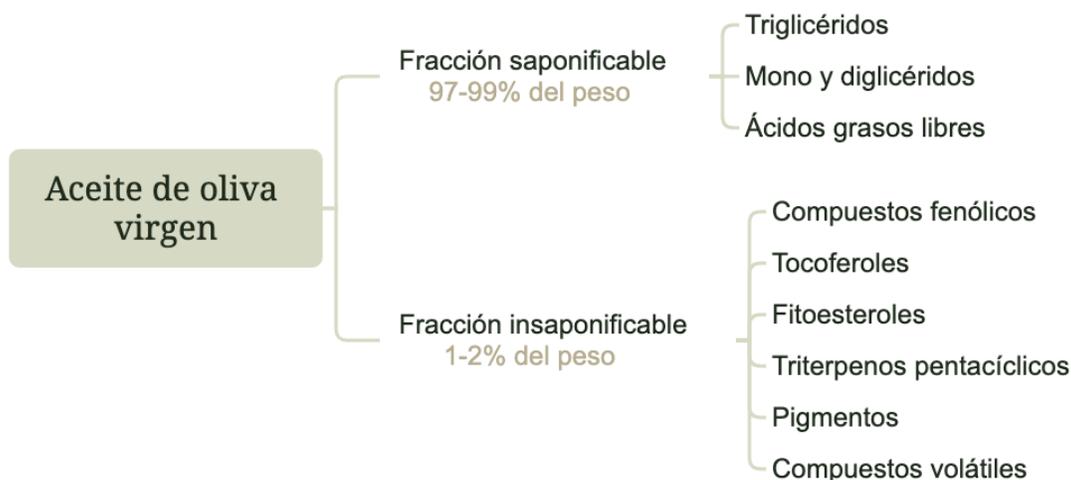


Figura 3. Componentes principales del aceite de oliva a partir de la división en fracción saponificable e insaponificable.

1.2.1 Ácidos grasos

Los ácidos grasos son compuestos orgánicos formados por una larga cadena hidrocarbonada y un grupo terminal carboxilo (-COOH). Debido a su estructura, presentan un carácter anfipático, una cola hidrofóbica y una cabeza hidrofílica. Se pueden clasificar según el grado de saturación. Por un lado, se encuentran los ácidos grasos saturados, que no presentan ningún doble enlace en su cadena, y por otro los ácidos grasos insaturados, que contienen al menos un doble enlace en su estructura. Según el número de insaturaciones que contiene, se clasifican en monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA). En función a la posición del doble enlace, los ácidos grasos pueden clasificarse en tres series y se nombran según la posición de la insaturación, contabilizando desde el grupo metilo hacia el carboxilo; ácidos grasos omega-9 (primer doble enlace en el carbono 9),

ácidos grasos omega-6 (primer doble enlace en el carbono 6) y ácidos grasos omega-3 (primer doble enlace en el carbono 3).

En el AO los ácidos grasos son mayoritariamente de número par de átomos de carbono. Se diferencian entre sí en la longitud de la cadena y las posiciones de los dobles enlaces en el caso de tener. Los ácidos grasos que se encuentran presentes en el aceite de oliva son: el ácido mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), heptadecanoico (C17:0), heptadecenoico (C17:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (18:2), linolénico (C18:3), araquídico (C20:0), behénico (C22:0) y lignocérico (C24:0) (25). El perfil de ácidos grasos determina la calidad nutricional del aceite y su estabilidad en el tiempo. El patrón de ácidos grasos que tiene el aceite es típico de la especie además de ser una característica varietal (26,27).

Tabla 2. Valores de referencia de ácidos grasos Fuente: COI (11).

Ácido graso	% m/m de ésteres metílicos
Ácido mirístico	≤ 0,03
Ácido palmítico	7,00-20,00
Ácido palmitoleico	0,30 – 3,50
Ácido heptadecanoico	≤ 0,40
Ácido heptadecenoico	0,60
Ácido esteárico	0,50- 5,00
Ácido oleico	55,00 – 85,00
Ácido linoleico	2,50 – 21,00
Ácido α - linolénico	1,00
Ácido araquidónico	≤0,60
Ácido gadoleico	≤0,50
Ácido behénico	≤0,20
Ácido lignocérico	0,2

El principal ácido graso del AOVE es el ácido oleico, representando un 55-83% del peso total de los ácidos grasos. Es un ácido graso de 18 carbonos con una única instauración, presente en el carbono 9. Es un ácido graso no esencial, el organismo tiene la capacidad de sintetizarlo a partir de otros precursores. Otros dos ácidos grasos monoinsaturados que se encuentran presentes en el AOV son el ácido graso palmitoleico y el heptadecenoico en una proporción de 0,30 – 3,50 y 0,60% respectivamente. Por otro lado, se encuentra el ácido graso linoleico (2,50-21%) y el ácido graso α-linolénico (1,0%), ambos son polinsaturados designados omega-6

El principal ácido graso del AOVE es el ácido oleico, representando un 55-83% del peso total de los ácidos grasos. Es un ácido graso de 18 carbonos con una única instauración, presente en el carbono 9. Es un ácido graso no esencial, el organismo tiene la capacidad de sintetizarlo a partir de otros precursores. Otros dos ácidos grasos monoinsaturados que se encuentran presentes en el AOV son el ácido graso palmitoleico y el heptadecenoico en una proporción de 0,30 – 3,50 y 0,60% respectivamente. Por otro lado, se encuentra el ácido graso linoleico (2,50-21%) y el ácido graso α-linolénico (1,0%), ambos son polinsaturados designados omega-6

y omega-3 respectivamente. Son considerados ácidos grasos esenciales, es decir deben ser incorporados a través de la dieta ya que el organismo no tiene la capacidad de sintetizarlos. Son de gran importancia para el bienestar del organismo, a partir de ellos se sintetizan una serie de mediadores de amplia importancia fisiológica. Por ejemplo, a partir del ácido graso α -linolénico se sintetizan otros compuestos de la serie ω -3 como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). A partir del ácido linoleico se sintetiza el ácido araquidónico (ARA), a su vez este da lugar a la serie 2 de prostaglandinas (PGE_2), prostaciclina (PGI_2), tromboxanos (TXA_2) y la serie 4 de leucotrienos (LTB_4). Por otra parte, a partir del EPA, se produce la serie 3 de los prostanoides (prostaglandina I_3 (PGI_3) y la serie 5 de leucotrienos (LTB_5), estos últimos productos son relevantes para distintos procesos fisiológicos relacionados con el sistema inmune y señalización en procesos inflamatorios (28–30).

El AO es líquido a temperatura ambiente debido a su perfil de ácidos grasos. Los puntos de fusión de sus principales ácidos grasos son: 13°C (ácido oleico), 65°C (ácido palmítico), -5°C (ácido linoleico) y -11°C (ácido α -linolénico). El AOV presenta mayor concentración de MUFA con respecto a los polinsaturados. Esta relación MUFA/PUFA le confiere ciertos beneficios en comparación con los aceites de semillas en donde la concentración de PUFAs es mucho mayor. El ácido oleico siendo monoinsaturado y el palmítico siendo saturado proporcionan estabilidad oxidativa al aceite, mientras que el linoleico y linolénico son polinsaturados y por lo tanto susceptibles a la oxidación (31,32).



Figura 4. Principales ácidos grasos insaturados presentes en el AOVE.

1.1.2 Compuestos fenólicos

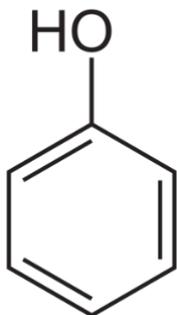


Figura 5 Estructura del fenol

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios caracterizados químicamente por la presencia de uno o más anillos aromáticos y sustituyentes hidroxilos con algún elemento común, como los grupos funcionales de ésteres, ésteres de metilo, glicósidos, etc. En la **Figura 5** se muestra la estructura química del grupo fenol (33–35). Existe una gran variedad de compuestos

fenólicos, que se pueden clasificar en diferentes grupos, dependiendo del número de anillos que contengan dentro de su estructura molecular, grupos sustituyentes y/o el tipo de enlace entre unidades de fenol.

Estos compuestos se encuentran en una gran variedad de plantas comestibles, frutos, hortalizas, bebidas como té, café, cerveza y vino tinto, en cereales y en algunas semillas como las de leguminosas. El aporte de polifenoles

en la dieta varía dependiendo del país y del consumo de productos determinados pero se estima un rango de 584-1786 mg/día siendo las principales fuentes las bebidas no alcohólicas, como café, té, jugos de frutas, frutas y verduras, además de las bebidas alcohólicas como el vino (36). Son responsables de propiedades sensoriales, de los compuestos en los que se encuentran, por ejemplo, las antocianinas son pigmentos responsables de colores rojos, azules y violetas de muchas frutas como las fresas, uva, ciruelas, etc. Los flavonoles aportan el color amarillo característico de algunas partes externas de frutas o vegetales y los taninos que confieren astringencia a algunas frutas (37). Otros polifenoles pueden ser oxidados por enzimas presentes en los tejidos vegetales, dando lugar a productos de color pardo, que conducen a una disminución de la calidad del producto, esto es especialmente importante en frutas y verduras recién cortadas como en la lechuga, papa, manzana, pera, etc. (38).

Los compuestos fenólicos pertenecen a la fracción minoritaria del aceite de oliva representando (menos del 2%) del peso total del aceite, este pequeño porcentaje está formado por más de 230 compuestos dentro de los que se encuentran los polifenoles. Son generados tanto por reacciones enzimáticas como no-enzimáticas durante la maduración del fruto. La concentración de polifenoles totales varía entre 50 y 200 mg/kg de aceite, pero se pueden encontrar aceites con concentraciones de hasta 1000 mg/kg de aceite. Estas diferencias pueden deberse a la variedad y grado de maduración de la aceituna, o el sistema de elaboración. Por ejemplo, el aceite de oliva refinado está desprovisto de vitaminas, polifenoles, fitoesteroles y otros ingredientes naturales de bajo peso molecular, por otra parte el AOVE contiene el nivel más alto de polifenoles (39). Los compuestos fenólicos más abundantes en el AOVE comprenden las categorías de polifenoles hidrofílicos (**Tabla 3**). Se puede subdividir en diferentes categorías como: los alcoholes fenólicos, flavonoides, secoiridoides, fenoles ácidos y lignanos. Por su parte la segunda categoría contiene a los tocoferoles y tocotrienos. El AOVE es el único aceite vegetal dotado de cantidades apreciables de compuestos fenólicos de forma natural. Estas moléculas influyen en las propiedades sensoriales tanto de las aceitunas como del aceite, propiedades organolépticas, como el amargor y la

astringencia característicos de este aceite. La intensidad del amargor está relacionada con la presencia de compuestos fenólicos derivados de la hidrólisis de la oleuropeína. Junto con el hidroxitirosol son considerados polifenoles amargos y astringentes que se encuentran en las aceitunas y se transfieren al aceite durante el proceso de extracción (40). Además, funcionan como un sistema de defensa del aceite frente a la oxidación de los ácidos grasos insaturados, convirtiéndose en uno de los factores más importantes en cuanto a la estabilidad oxidativa, debido a que ésta disminuye considerablemente después de eliminar estos compuestos minoritarios (41).

Tabla 3. Polifenoles principales según su clasificación en el AOVE.

Hidrofílicos	Alcoholes fenólicos	Hidroxitirosol Tirosol
	Flavonoides	Apigenina Luteoína
	Secoiridoides	Oleuropeína Oleocantal Ligstrósido
	Fenoles ácidos	Ácido gálico Ácido vanílico Ácido benzoico Ácido cinámico Ácido cafeico Ácido cumárico
	Lignanos	Pinoresinol 1-acetoxipinoresinol

Los polifenoles son compuestos bioactivos que han alcanzado gran popularidad debido al creciente número de publicaciones científicas que ponen de manifiesto sus efectos saludables en los diferentes ámbitos de la medicina.

1.3 Aceite de oliva y salud humana

Desde la antigüedad, los productos derivados del olivo se han utilizado con fines medicinales. Por ejemplo, en la Antigua Grecia era costumbre utilizar un preparado similar al aceite de oliva, éste se aplicaba en el cuerpo después del baño para calentar y suavizar la piel, previniendo la deshidratación provocada por el agua calcárea. Por otro lado, los gimnastas solían masajearse con aceites de oliva para preparar los músculos antes de la actividad y prevenir daños en la piel causados por las altas temperaturas. Paralelamente, en el año 776 a.C., se llevaron a cabo los primeros Juegos Olímpicos, donde los ganadores eran ungidos con aceite en honor a la diosa Atenea y como signo de hermandad y paz. Además, el aceite de oliva se ha utilizado para tratar infecciones y úlceras gastrointestinales y del tracto urinario (42–44). A pesar del conocimiento limitado sobre enfermedades y dolencias, al aceite de oliva ya se le habían atribuido propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antibacterianas.

A finales del siglo XX, Ancel Keys dilucidó por primera vez el efecto cardioprotector del aceite de oliva en el “Estudio de los siete países (1978)”. En el cual se comparó la dieta tradicional de Estados Unidos, Finlandia, Italia, Grecia, Países Bajos, Japón y Yugoslavia para relacionarla con la salud de sus habitantes. Se posicionó como el primer estudio que examinó sistemáticamente la relación entre dieta, estilo de vida y salud, en particular la enfermedad coronaria, regulación del colesterol y accidente cerebrovascular. Se reveló una menor prevalencia de enfermedades cardiovasculares, al igual que una menor incidencia en enfermedades alimenticias en los países de la cuenca mediterránea en comparación con los países occidentales. A raíz de esto, surge el concepto de “dieta mediterránea”, caracterizada principalmente por un alto consumo de cereales, verduras, legumbres y fruta. Poca ingesta de carne roja, ya que es sustituida por un alto consumo de pescado, acompañado de aceite de oliva como grasa culinaria principal. La menor prevalencia de enfermedades cardiovasculares en los países mediterráneos en comparación con los países occidentales fue correlacionada con un mayor consumo de grasas monoinsaturadas, siendo la principal fuente el aceite

de oliva y por lo tanto se le atribuye al aceite el poder cardioprotector. En los años siguientes, la evidencia científica de la relación entre una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados y enfermedades cardiovasculares se hizo cada vez más fuerte, relacionando el alto consumo de aceite de oliva correspondiente con una dieta mediterránea con una menor probabilidad de sufrir infarto de miocardio (45,46). Es importante destacar que a su vez se vincula la adherencia a la dieta mediterránea con una disminución de mortalidad por cáncer y la prevención de un 25% de cáncer colorrectal, 15-20% de cáncer de mama y un 10-15 % de próstata y tumores pancreáticos (47–49). También fue reportado el efecto de esta dieta con la prevención de enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer y Parkinson. En este tipo de enfermedades se da un incremento de estrés oxidativo, inflamación, agregación anormal de proteínas, alteración de la homeostasis de calcio, excitotoxicidad y apoptosis, y se observó que el consumo de AOVE juega un rol importante en el control de estos procesos (50,51). La dieta mediterránea ha demostrado ser beneficiosa para el control glucémico y la diabetes mellitus tipo 2. Se obtuvo una reducción significativa del 40% en la incidencia de contraer diabetes tipo 2 en grupos de personas consumidores de dieta mediterránea, suplementados con AOVE y frutos secos mixtos, en comparación con el control (52–54). El AOVE puede prevenir inflamaciones crónicas asociadas con patologías, como obesidad o la aterosclerosis que es considerada una patología inflamatoria. Su consumo disminuye la expresión de genes relacionados con la inflamación y el estrés oxidativo. La interleucina 6 (IL-6), es una citocina proinflamatoria, promueve los procesos inflamatorios en el cuerpo como parte de la respuesta del sistema inmunológico a diversas situaciones, con dietas suplementadas con aceite de oliva logra disminuir los valores en la circulación sanguínea (32,55).

En la **Figura 6** se muestra un diagrama con las principales vías de acción propuestas para el aceite de oliva virgen en la prevención de diferentes enfermedades o patologías.

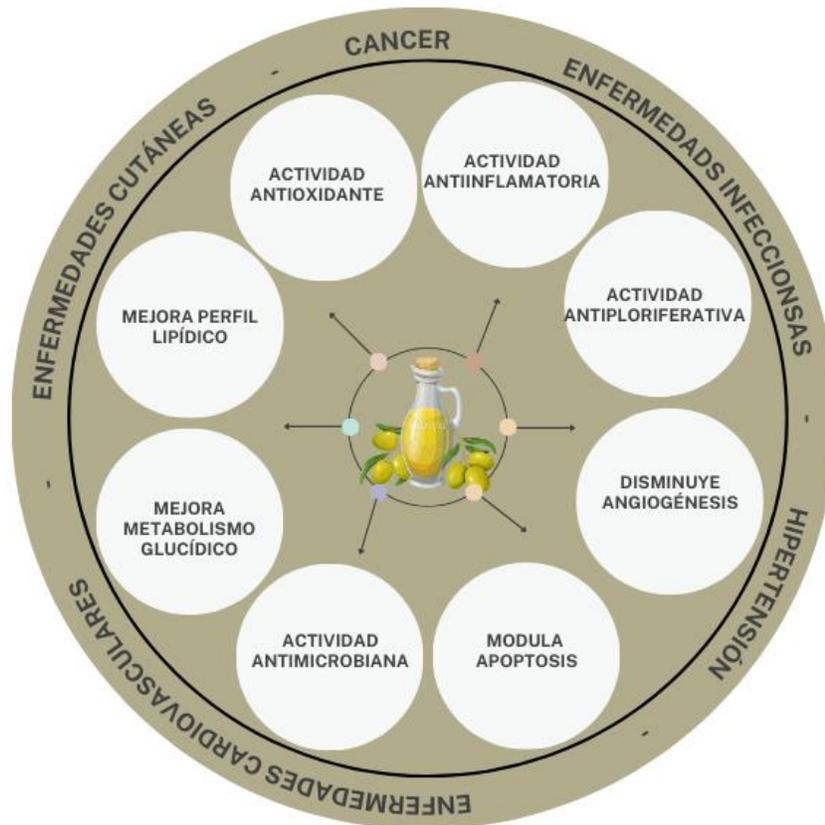


Figura 6. Principales vías de acción propuestas para el aceite de oliva virgen y sus componentes minoritarios en la prevención de enfermedades.

1.3.1 Bioactividad de los polifenoles

Desde un principio, los efectos beneficiosos del consumo de AOVE en la dieta mediterránea fueron atribuidos al alto contenido de MUFAs, específicamente al ácido oleico. Numerosos estudios se realizaron a lo largo de los años para comprender la relación entre el consumo de AOVE y la salud cardiovascular. En un ensayo realizado en 1996 se compararon los efectos de dos dietas similares ricas en MUFAs a partir de aceite de oliva virgen o aceite de girasol alto oleico en mujeres hipertensas. Estos autores reportaron que solo la dieta rica en aceite de oliva virgen indujo una reducción significativa tanto en la presión sistólica como en la presión arterial diastólica (56). El AOVE y el aceite de girasol alto oleico tienen un perfil de ácidos grasos muy similar, pero el aceite de girasol no presenta polifenoles dentro de sus componentes. Esto lleva a pensar que el efecto beneficioso que genera el AOVE no es debido al ácido oleico simplemente. A su vez, en el ensayo de

EUROLIVE se le suministró a diferentes candidatos 3 tipos de AOVE con un perfil similar de ácidos grasos, pero con niveles diferentes de polifenoles: alto, medio o bajo. Todos los candidatos que culminaron el ensayo aumentaron la relación de colesterol HDL y los niveles de triglicéridos. Además, los que consumieron AOVE con concentraciones altas o medias de polifenoles disminuyeron los niveles de colesterol LDL y presentaron disminución en el daño oxidativo de los lípidos (57). Se puede inferir entonces que estos compuestos minoritarios juegan un rol importante en las propiedades beneficiosas que tiene el AOVE para la salud.

La actividad antioxidante *in vivo* de la fracción fenólica del aceite de oliva fue propuesta por primera vez a principios de los años 90 en donde se estudió la suplementación alimentaria mediante una dieta rica en aceite de oliva, aceite de soja y una mezcla de triglicéridos rica en oleato en el modelo animal de ratas (58). A pesar de que en los ratones tratados con aceite de oliva y los de la mezcla presentaban un perfil de ácidos grasos con altas concentraciones de ácido oleico en la misma proporción para ambos tratamientos, se observó un menor contenido de productos de peroxidación lipídica en las ratas que tenían una suplementación de aceite de oliva en comparación con las ratas control. El grupo de investigadores concluyen el artículo comentando que el aceite de oliva debe contener algunos componentes naturales, además de los conocidos tocoferoles y carotenoides, con acción antioxidantes *in vivo* (58).

Determinados compuestos fenólicos del AOVE son considerados moléculas claves para la salud a partir de múltiples modelos de estudios; estos son el hidroxitirosol (HT), el oleocantal y la oleuropeína (OL). Son muy estudiados por sus propiedades biológicas y farmacéuticas, al igual que por sus propiedades antioxidantes. El HT y la OL son capaces de reaccionar con los radicales peroxilo y romper las reacciones de propagación radicalar, produciendo estructuras de resonancia muy estables. Además, son capaces de activar sistemas antioxidantes endógenos en el organismo (59). Esto último fue propuesto tras inducir diabetes en ratas mediante una inyección intraperitoneal de Alloxan, una droga utilizada para producir diabetes en animales de experimentación destruyendo células secretoras de insulina de los islotes de Langerhans del páncreas. Observaron una disminución

de las actividades de las enzimas antioxidantes hepáticas SOD y CAT y un aumento del nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) del inglés *Thiobarbituric acid reactive substances* en el hígado de las ratas diabéticas. Además, el potencial antioxidante sérico presentó una disminución significativa en las ratas diabéticas en comparación con el de los controles normales. Todas estas perturbaciones encontradas en el sistema antioxidante fueron restauradas mediante la administración de OL e HT. La acción hipoglucemiante de estos en animales diabéticos puede explicarse por el aumento de la expresión y/o actividad de enzimas antioxidantes. De hecho, varios estudios muestran que los polifenoles logran aumentar la expresión de las enzimas SOD y CAT a nivel transcripcional (60). A la vez, se estudió el rol del HT en la *diabetes mellitus* en el modelo de ratas en la línea celular de adipocitos 3T3-L1, demostrado que la HT estimula la biosíntesis mitocondrial, que se reduce en el curso de la *diabetes mellitus* (61). Proponen que lo más probable es que la HT aumente la vía de biosíntesis mitocondrial a través de la regulación positiva de PGC-1 α , un regulador clave del metabolismo energético. Concentraciones relativamente bajas de HT en los adipocitos aumentan la expresión de todos los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, incluida la ATP sintasa, mayor consumo de oxígeno; y una disminución del contenido de ácidos grasos libres en los adipocitos (62). En otro estudio se exploró el potencial de la OL preparada a partir de hojas de olivo para inhibir las enzimas digestivas (α -amilasa, maltasa, sacarasa) y reducir la captación de glucosa en ovocitos de *Xenopus* que expresan GLUT2 humano, el cual es un transportador transmembrana, presente en hígado y páncreas, que posibilita el movimiento pasivo de glucosa a través de la membrana plasmática. Dicho estudio demuestra que la OL puede mejorar la respuesta glucémica posprandial en individuos sanos (63).

El compuesto fenólico oleocantal es reconocido como un potente antiinflamatorio, al comparar su efecto con el ibuprofeno, se encontró que el oleocantal exhibió una mayor inhibición de las enzimas inflamatorias COX-1 y COX-2 que el ibuprofeno en concentraciones equimolares (64,65).

En base a los diferentes estudios, los polifenoles se consideran actualmente unas de las principales moléculas, dentro de la composición química del AOVE, a las que se le atribuye la mayoría de los efectos beneficiosos para la salud, disminuyendo el riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles como las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cancerosas.

1.4 Ácidos grasos nitrados

Los nitroalquenos derivados de ácidos grasos ($\text{NO}_2\text{-FA}$) son importantes moléculas señalizadoras, generadas por la interacción de especies reactivas de nitrógeno con ácidos grasos insaturados. Los nitroalquenos son un grupo de ácidos grasos que presentan un grupo nitro adyacente a una insaturación en la cadena hidrocarbonada (**Figura 7**). La presencia del grupo nitro le confiere un alto carácter electrofílico a la molécula, el grupo nitro es atrayente de electrones por lo tanto los átomos de carbono contiguos al grupo nitro se vuelvan deficientes de electrones y susceptibles a posibles ataques nucleofílicos, esto convierte a los nitroalqueno en moléculas reactivas (66,67). El ácido graso nitrado formado va a depender de qué ácido graso reaccione en un principio, por ejemplo, si se trata del ácido linoleico conjugado o el ácido oléico, se formará ácido nitro linoleico conjugado ($\text{NO}_2\text{-cLA}$) y ácido nitro oleico ($\text{NO}_2\text{-OA}$) respectivamente (68).

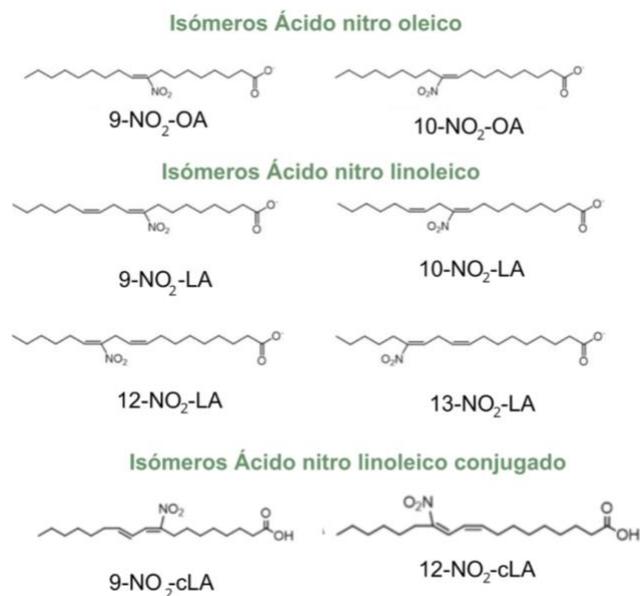


Figura 7. Estructura de ácidos grasos nitrados. Se presentan los distintos isómeros de los nitro alquenos derivados del ácido graso oleico (NO₂-OA), ácido linoleico (NO₂-LA) y ácido linoleico conjugado (NO₂-cLA).

Los primeros estudios sobre la presencia de ácidos grasos nitrados en AOVE se realizaron en aceites provenientes de las variedades de cultivo Arbequina, Picual y Frantoio, detectando concentraciones de NO₂-cLA de síntesis endógena en las aceitunas, también detectaron la formación de NO₂-FA de AOVE bajo condiciones gástricas (69). Por otro lado, el ácido graso nitrado derivado del ácido linolénico fue cuantificado y detectado en el modelo de planta de *Arabidopsis Thaliana*, al igual que en la hoja y en la raíz de la planta *Oryza Sativa*. El nitro linolénico (NO₂-Ln) participa de diferentes funciones fisiológicas en la propia planta y es generado en diferentes condiciones de estrés biótico y abiótico (70,71). Por otro lado, se estudió en células humanas y murinas que los ácidos grasos nitrados se pueden generar también de forma endógena en respuesta a infecciones virales o mediante otros orígenes lo que nos habla de su formación en condiciones de inflamación (72).

1.4.1 Formación de ácidos grasos nitrados

Los diferentes isómeros de NO₂-FA pueden ser sintetizados *in vitro*, con regioselectividad y estereoselectividad a partir de diferentes precursores (66,73,74). Los precursores de la formación de nitrolípidos de mayor relevancia bioquímica son

los ácidos grasos insaturados, el agente nitrante radical dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$) y sus precursores; nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) y radical óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) (75). Por un lado, el $\bullet\text{NO}_2$ es generado por diversas reacciones, entre las que se encuentra la descomposición del peroxinitrito y la formación a partir de la oxidación monoelectrónica de NO_2^- , catalizada por diversas hemoperoxidasas en presencia de H_2O_2 . También en condiciones ácidas el NO_2^- se puede protonar dando lugar a la formación de HNO_2 , este forma N_2O_3 que es inestable, produciendo $\bullet\text{NO}_2$ y $\bullet\text{NO}$ (75–78).

Una de las posibles reacciones de nitración suele implicar la adición directa de $\bullet\text{NO}_2$ al doble enlace (**Figura 8**). Esta reacción de adición es reversible y ocurre con todos los dobles enlaces produciendo un radical β -nitroalquilo. En baja tensión de O_2 , éste reacciona con otro $\bullet\text{NO}_2$ produciendo un derivado nitro-nitrito de ácido graso. A partir de este punto pueden ocurrir dos eventos, dependiendo de los niveles de O_2 ; a bajas concentraciones predomina la formación de nitro alquenos mientras que en altas regirán los proceso de oxidación que convergen la formación de hidroperóxidos lipídicos. Los nitroalquenos que se producen a partir del derivado nitro-nitrito de ácido graso mediante la pérdida de ácido nitroso (HNO_2), mientras que la hidrólisis de este grupo produce derivados nitro hidroxilados (77,79–81) .

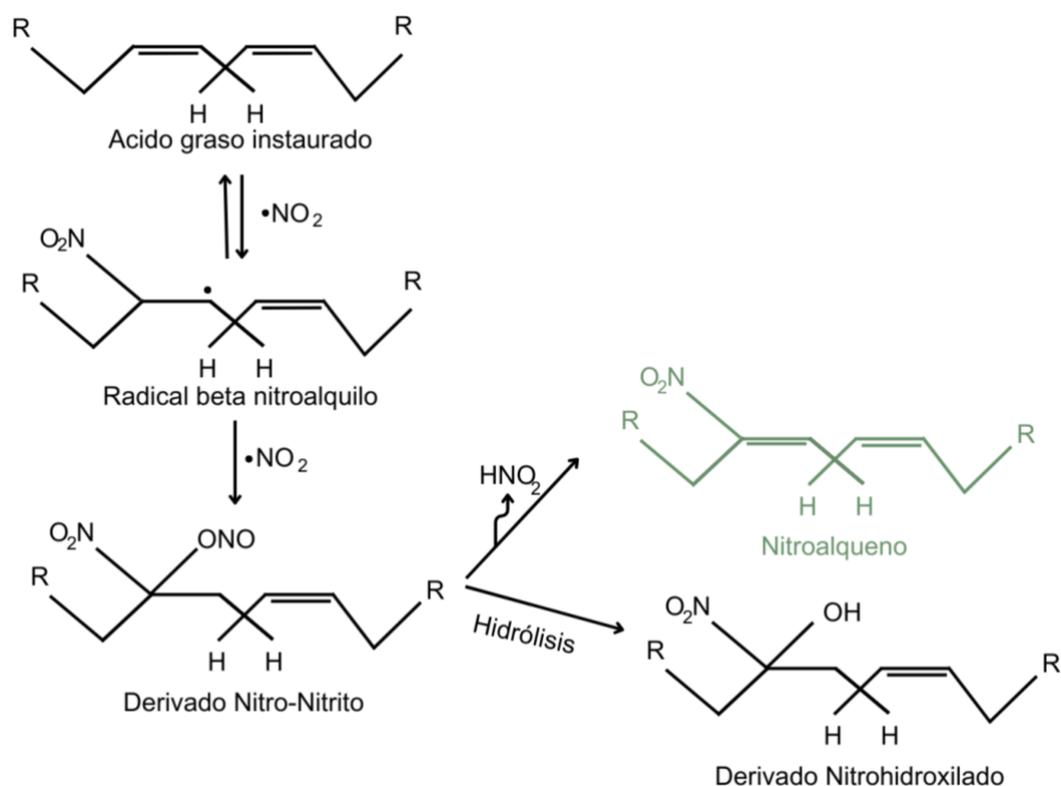


Figura 8. Mecanismo general de formación de ácidos grasos nitrados.

La nitración es un proceso muy frecuente durante la digestión gástrica, dada la combinación de NO_2^- derivado de la saliva tras el consumo de NO_3^- , junto al medio ácido y los ácidos grasos conjugados provenientes de la dieta. Las principales fuentes dietéticas de NO_3^- son las verduras de hojas verdes y la remolacha. En la boca, gran parte del NO_3^- se reduce a NO_2^- gracias a las bacterias comensales que residen en la cavidad bucal, estas utilizan NO_3^- como aceptor final de electrones en la respiración anaerobia. El NO_2^- que se encuentra en alta concentración en la saliva, puede protonarse a pH ácido en el estómago dando ácido nitroso (HNO_2) que luego se puede descomponer en $\bullet\text{NO}_2$, el principal agente nitrante ya antes mencionado (82–84). En la **Figura 9** se muestra la formación de los precursores para la síntesis de especies nitradas.

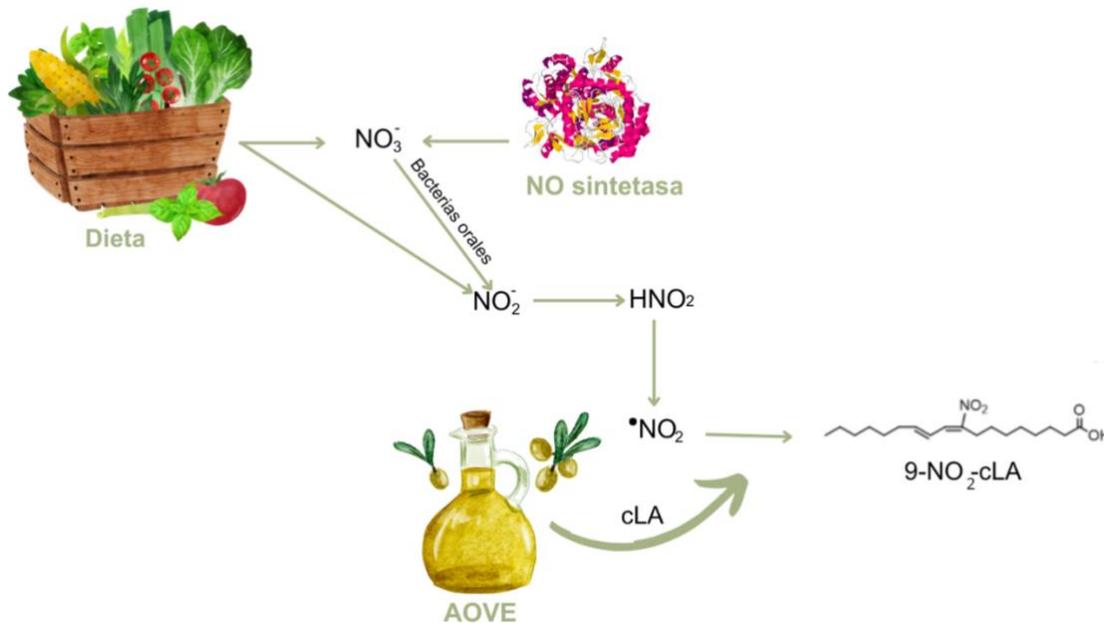


Figura 9. Formación de intermediarios para la síntesis de NO_2 -FA. La microbiota de la cavidad oral y gastrointestinal reduce NO_3^- de la dieta a NO_2^- , que se protona a pH ácido generando HNO_2 , precursor del $\bullet\text{NO}_2$. Formación de NO_3^- de manera endógena mediante el óxido nítrico.

1.4.2 Formación de las especies nitradas NO_2 -OA y NO_2 -cLA

Las especies nitradas NO_2 -OA y NO_2 -cLA fueron detectadas en muestras biológicas de personas sanas, aumentando su cantidad durante los procesos inflamatorios y en situaciones de estrés metabólico, convirtiéndolo en un blanco interesante para estudiar (85). El NO_2 -cLA generado a partir de la nitración del cLA presenta dos isómeros posicionales predominantes, denominados colectivamente NO_2 -cLA (Ácido linoleico conjugado nitrado 9 y 12) (86). Fue identificado como el principal sustrato endógeno para la nitración de ácidos grasos *in vitro* e *in vivo*, produciendo una cantidad hasta 10^5 veces mayor de productos de nitración en comparación con otros ácidos grasos (68). Nuestro grupo de trabajo detectó la formación en condiciones gástricas de NO_2 -OA y NO_2 -cLA en el AOEV, siendo el NO_2 -cLA el más prevalente **Figura 10**.

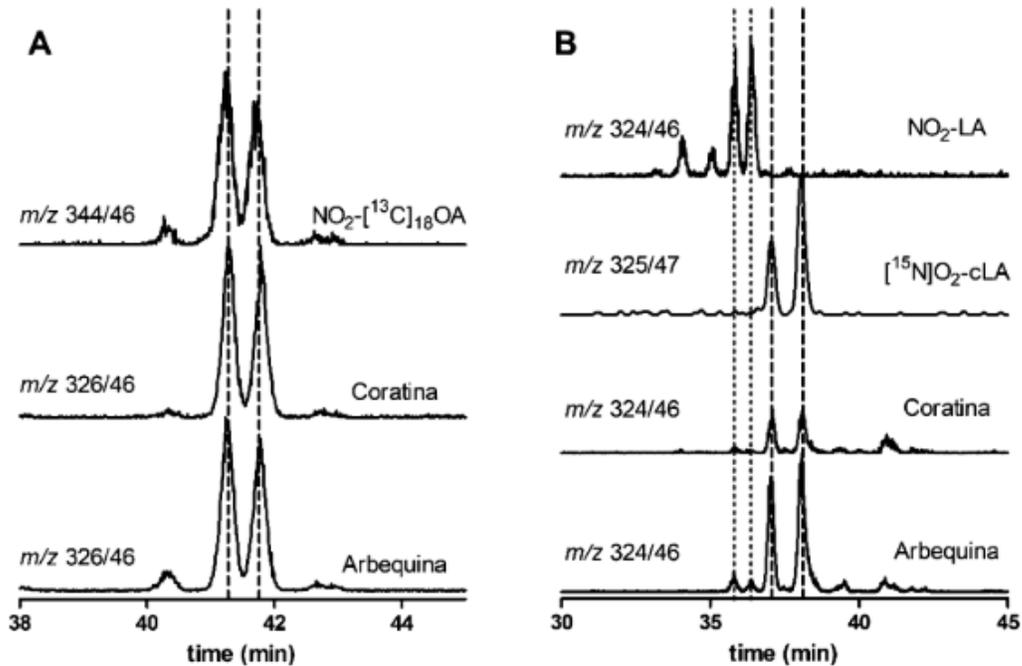


Figura 10. Formación de NO₂-FA en AOEV mediante digestión *in vitro*. (A) Formación de NO₂-OA en Arbequina y Coratina AOVE fue determinada siguiendo la transición MRM m/z 326/46, comparada con el control interno NO₂-[¹³C]₁₈OA (m/z 344/46). (B) La presencia NO₂-LA y NO₂-cLA en AOEV fue determinada siguiendo la transición MRM m/z 326/46, comparada con el control interno [¹⁵N]O₂-cLA (m/z 325/47) y control externo NO₂-LA (m/z 324/46). Extraído de (87).

Estudios previos de nuestro grupo de investigación evaluaron la formación de NO₂-OA y NO₂-cLA en ausencia o presencia de polifenoles en las etapas de maduración verde y envero (etapa de maduración intermedia) para Arbequina y Coratina. Cuando se hace referencia al aceite en ausencia de polifenoles se refiere a que mediante el método de extracción se generó un aceite sin polifenoles. Como se muestra en la **Figura 11**, en las condiciones sin polifenoles (Pph) disminuye considerablemente la formación de NO₂-OA y NO₂-cLA para la variedad Arbequina, pero no se observa el mismo comportamiento para Coratina. Se observa diferencia significativa entre la formación de NO₂-cLA en la etapa verde y envero de coratina. Esto acompaña a los resultados presentados en la **Tabla 8**, en donde se muestra un contenido mayor de polifenoles en la etapa envero que en la verde para esta variedad. Estos experimentos fueron realizados en aceite de oliva eliminando los polifenoles pero no los otros componentes minoritarios, como carotenoides, los

cuales son difíciles de separar de la fracción lipídica. En base a estos resultados nos planteamos la hipótesis de que los polifenoles podrían modular la formación de ácidos grasos nitrados, y para ello es importante un modelo sencillo para evaluar el efecto de estos compuestos.

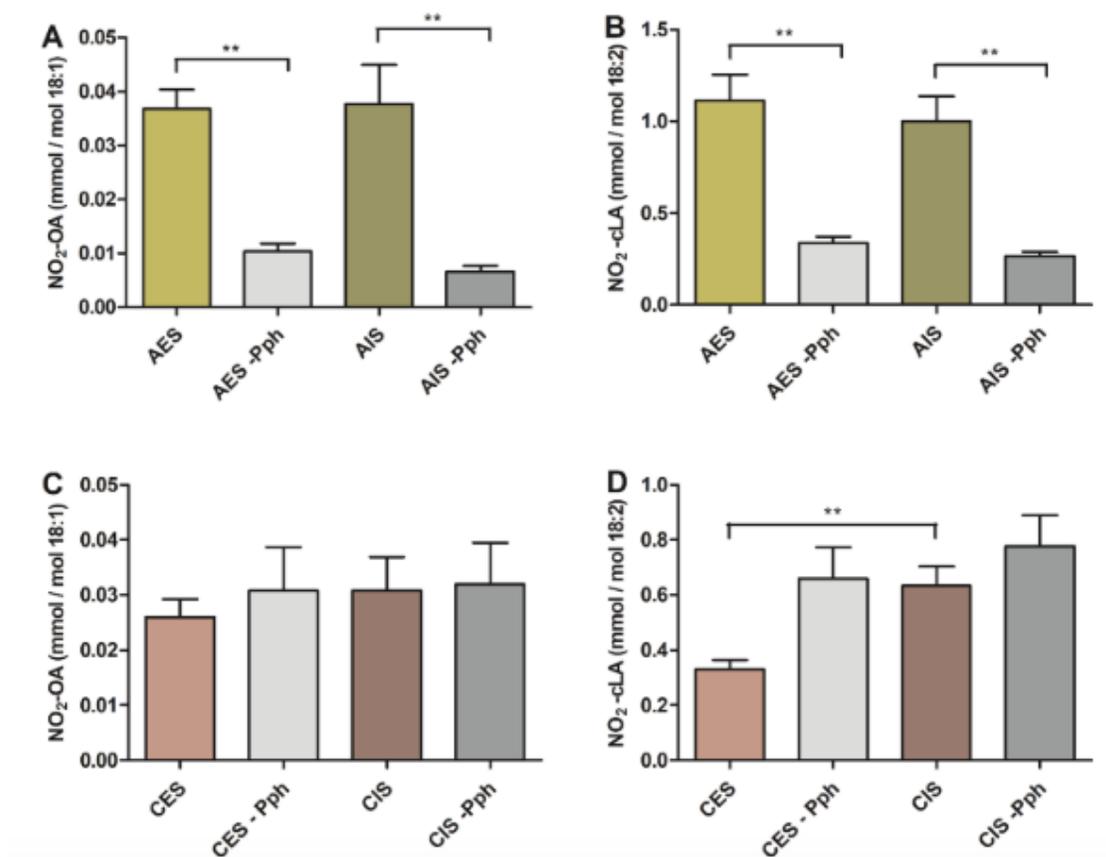


Figura 11. Efecto de la etapa de maduración del cultivo y contenido de polifenoles en el aceite de oliva en la formación de ácidos grasos nitrados. (A) NO₂-OA y (B) NO₂-cLA de arbequina y (C) NO₂-OA y (D) NO₂-cLA de aceite durante la etapa temprana de maduración (ES) y la etapa intermedia denominada envero (IS) y la presencia o ausencia de polifenoles (Pph). Las diferencias son significativas cuando $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**). Extraído de (87).

1.4.3 Efectos beneficiosos de los ácidos grasos nitrados

Los ácidos grasos insaturados no son meramente una fuente de energía o constituyentes de las membranas biológicas, al ser consumidos a través de la dieta se pueden convertir en precursores importantes de moléculas señaladoras. Como se mencionó previamente los ácidos grasos insaturados en determinadas

condiciones son capaces de nitrarse formando NO₂-FA, estos presentan actividad citoprotectora y anti-inflamatoria en diferentes líneas celulares y condiciones fisiopatológicas (88).

Como fue mencionado anteriormente el grupo nitro alqueno de los NO₂-FA es electrófilo, por lo tanto, participa activamente en reacciones reversibles de adición de Michael lo que le confiere la posibilidad de modificar residuos nucleofílicos en proteínas diana (S-nitro alquilación) (89). Muchas de las funciones antiinflamatorias del NO₂-OA se han explicado, principalmente, por su capacidad de formar aductos con NF-κB, Keap1 y HSF-1.

Además el NO₂-OA y NO₂-LA que presentan la capacidad de unirse covalentemente a la sub unidad p65 de NF-κB, inhibiendo la unión al ADN de este modo reprimiendo NF-κB e inhibiendo la secreción de la interleucina proinflamatoria (IL)-6, el factor de necrosis tumoral (TNFα), la proteína de quimioatracción de monocitos y molécula de adhesión de células (90). Específicamente, en modelos de ratón con cardiopatía isquémica, en donde se produce la obstrucción de una arteria del corazón, se detectó preservación del músculo dañado, función ventricular y reducción significativa del tamaño del infarto luego de administrar exógenamente a los ratones NO₂-OA, lo que evidencia un rol protector de este ácido graso nitrado cuando es administrado exógenamente (91). Por otro lado, hay fuerte evidencia que los NO₂-FA pueden regular el tono vascular mediante la fosforilación endotelial de la óxido nítrico sintasa, aumentando la expresión de la misma con el concomitante aumento de biodisponibilidad de •NO. También se ve un aumento en la expresión de la hemo oxigenasa 1. El aumento en la expresión de ambas enzimas es traducido en los efectos protectores vasculares asociados con una mayor producción de •NO (92) .

En cuanto a patologías asociadas a las vías urinarias, se investigó el rol del NO₂-OA en modelo de ratón con enfermedad renal, principalmente la nefropatía diabética, la cual es una de las principales causas de enfermedad renal terminal. La administración conjunta de NO₂-OA junto con Losartán revierte eficazmente la lesión renal en la enfermedad anteriormente mencionada (93). Siguiendo esta

misma línea de investigación se indagó el efecto que produce la administración de este mismo NO₂-FA en la esclerosis glomerular focal, otra importante patología renal. Tras la administración de NO₂-OA se sugiere que éste ejerce en los ratones una acción renoprotectora contra la nefropatía, probablemente a través de sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (94).

Con respecto a las enfermedades hepáticas, los NO₂-FA juegan un rol importante, por ejemplo, en la enfermedad del hígado graso no alcohólico, patología que se caracteriza por un depósito excesivo de grasa en el hígado en ausencia de una ingesta significativa de alcohol, la misma está relacionada con la obesidad y la resistencia a la insulina. Mediante el suministro de NO₂-OA a ratones con hígado graso no alcohólico se logra normalizar los niveles de triglicéridos hepáticos y revertir significativamente la acumulación de grasa hepática (95). El grupo de investigación, evidenció una correlación positiva entre la formación de NO₂-OA a partir del AOVE que fue suministrado a ratones con la patología y la mejora observada de la función mitocondrial (96).

A nivel mundial el cáncer es la segunda causa de muerte, según el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer, alrededor de 1 de cada 5 personas desarrollará cáncer a lo largo de su vida; aproximadamente 1 de cada 9 hombres y 1 de cada 12 mujeres mueren a causa de la enfermedad. En los últimos años se realizaron diferentes ensayos con NO₂-FA para evaluar su incidencia en diferentes tipos de cáncer por sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes anteriormente desarrollados (97). Basándose en que los procesos inflamatorios juegan un rol crucial en todas las etapas de desarrollo de los tumores, desde el inicio, la promoción, la transformación maligna, la invasión del tumor y la metástasis de este. Por un lado, el cáncer de mama triple negativo comprende el 20% de todos los cánceres de mama y es el subtipo de cáncer de mama más agresivo debido a su alta tasa de metástasis y que hasta el momento hay tratamiento efectivo. Para este tipo de cáncer se ha probado en diferentes ensayos preclínicos el tratamiento con el derivado electrófilo del NO₂-OA, el ácido 10-nitro-octadec-9-enoico.

Observándose reducción en el crecimiento y la viabilidad de las células cancerígenas in vitro, atenuación de la migración e invasión de las células (98).

En el presente trabajo se espera que al aumentar la concentración de polifenoles en el AOV sintético disminuya la oxidación lipídica debido a que los polifenoles reaccionarían con los radicales libres y las ERO favoreciendo la formación de la nitración de los ácidos grasos, tras someter al AOV a condiciones gástricas. Se espera que el ácido graso que se nitre en mayor medida sea el cLA a pesar de encontrarse en menos concentración en el aceite que el OA. También es esperable un comportamiento diferencial entre ambas variedades de aceites debido a que provienen de variedad contrastante en cuanto a sus componentes minoritarios.

2. Objetivo

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de los polifenoles del aceite de oliva de dos variedades contrastantes sobre la formación de ácidos grasos nitrados durante la digestión gástrica.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la composición química de dos variedades contrastantes de AOVE cultivados en Uruguay, Arbequina y Coratina.
- Evaluar el efecto de los polifenoles de Arbequina y Coratina sobre la nitración y la oxidación de un aceite sintético sin polifenoles.



3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Aceite de oliva virgen

Los aceites se obtuvieron en colaboración con la *Estación Experimental "Wilson Ferreira Aldunate"*, INIA de "Las Brujas". Se trabajó con dos variedades contrastantes con respecto a niveles de polifenoles, Arbequina una variedad de olivo española y Coratina un cultivar italiano. Para cada variedad se analizaron tres muestras biológicas, procedentes del Departamento de Maldonado, de diferentes árboles, por lo tanto, se generó un aceite para la variedad Coratina y otro para la variedad Arbequina, elaborado con las tres muestras biológicas. A su vez, todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.1.2 Reactivos

Todos los productos químicos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EE. UU.). Los ácidos grasos fueron obtenidos de NuCheck. En cuanto a los estándares internos $\text{NO}_2\text{-FA}$, $\text{NO}_2\text{-}[^{13}\text{C}_{18}]\text{OA}$, $\text{NO}_2\text{-}[^{13}\text{C}_{18}]\text{LA}$, y $[^{15}\text{N}]\text{O}_2\text{-cLA}$ fueron amablemente cedidos por los Dres. Bruce Freeman y Francisco Schopfer de la Universidad de Pittsburgh, PA, EE. UU. (86) .

3.2 Métodos

3.2.1 Determinación del perfil de ácidos grasos

La determinación se llevó a cabo en el INIA de "Las Brujas" mediante análisis por cromatografía de gases. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se prepararon a partir de una reacción de transesterificación con una solución metanólica fría de hidróxido de potasio y se analizaron mediante un cromatógrafo de gases (Norma IOC/T.20/Doc. n° 24 2001) en un equipo Shimadzu GC (modelo 14 B) (99).

3.2.2 Detección y cuantificación de ácido linoleico conjugado

El ácido linoleico conjugado (cLA) se detectó mediante la formación de aductos de Diels-Alder con 4-fenil-1,2,4-triazolina-3,5-diona (PTAD). En primer lugar

la fracción lipídica del AOV se extrajo con hexano que se secó al vacío. Después se realiza una digestión enzimática con lipasa pancreática (5 mg de proteína/ml) y fosfolipasa A2 (PLA2, 40 U) en tampón de fosfato 50 mM, pH 7,4. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 1 h con agitación continua. Alternativamente, los lípidos se extrajeron mediante Bligh y Dyer, se secaron al vacío y se disolvieron en cloroformo. Las diferentes clases de lípidos se separaron mediante extracción en fase sólida (SPE) utilizando columnas Strata NH2 (100 mg/1 ml). Las columnas se activaron previamente con 1 ml de MeOH, seguido de 1 ml de cloroformo; se añadieron las muestras y la columna se lavó con 1 ml de cloroformo. Los ácidos grasos libres se eluyeron con 1 ml de éter dietílico/ácido acético al 2 %. El disolvente se evaporó al vacío y los ácidos grasos obtenidos se incubaron en cloroformo con PTAD durante 2 min a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó y se lavaron las muestras tres veces con metanol. Posteriormente se analizaron por HPLC-MS/MS empleando un método de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) en el que se monitorean transiciones específicas para diferentes isómeros de cLA derivatizados con PTAD (**Tabla 4**) (69,100).

Tabla 4. Transiciones para diferentes isómeros de cLA derivatizados con PTAD. Cys (C), Trans (T).

cLA-PTAD	438.5/178.2
	438.5/276.0
C9T11	438.0/312.0
T10C12	438.0/298.0
	438.0/319.0
	438.0/261.0
C9T11	438.0/235.0
T10C12	438.0/249.0

3.2.3 Extracción de polifenoles

Se realizó una puesta a punto de dos métodos diferentes de extracción de polifenoles.

1. Los polifenoles fueron extraídos siguiendo el método de Gutfinger T. (87). Se parte de un gramo de aceite disuelto en 5 mL de hexano, se realizan 3 extracciones sucesivas con 2 ml de metanol al 60% con 0,025% m-v de Butilhidroxitolueno (BHT). Intercalando cada extracción con centrifugaciones de 3000 rpm por 2 minutos. Se extrajo la fase orgánica en donde quedan retenidos los polifenoles, correspondiente con la fase inferior. Se evaporó el hexano en un sistema de evaporación a presión reducida de la marca Labconco a 35 °C, con un vacío inicial de 290, bajando progresivamente hasta 70.
2. Se partió de un gramo de aceite disuelto en 1,5 mL metanol al 80%. Se realizaron tres lavados intercalando con centrifugaciones a 5800 rpm.

Una vez definido el método a trabajar según el rendimiento de extracción, se procedió a realizar la extracción de los polifenoles a partir del método escogido por triplicado para cada varietal. Tras evaporar el hexano el volumen resultante se congeló a -20 °C para liofilizarlo. Este procesamiento se repitió las veces necesarias hasta alcanzar una masa de polifenoles que permitiera los análisis posteriores.

3.2.4 Cuantificación de polifenoles totales

La determinación fue realizada mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, según el método adaptado de Mc. Donald *et al.* (101). Los polifenoles extraídos o la curva estándar fueron mezclados con el reactivo de Folin Ciocalteu (5 mL, 1:10 diluido con agua nanopura) y Na₂CO₃ acuoso (4 mL, 1 mol/L). La solución obtenida fue incubada por 15 minutos a 45 °C. Los polifenoles totales fueron determinados colorimétricamente a 765 nm. La curva estándar fue realizada usando concentraciones de 0, 50, 100, 15, 200, 150 mg/L de ácido gálico. Fueron preparadas con metanol:agua (50:50 v/v). La concentración total de polifenoles fue expresada en equivalentes de ácido gálico en mg/kg de aceite.

3.2.5 Determinación del perfil de polifenoles mediante HPLC

La fracción de polifenoles obtenida de cada variedad de olivo se resuspendieron en 100 μ L de metanol para ser identificados mediante RP-HPLC. Se utilizó una columna C18 (250 mm x 5 mm, 4.6 μ m) con un flujo de 1.0 mL/min y una temperatura de la columna de 30 °C. Los cromatogramas se analizaron a una longitud de onda de 280 nm, la fase móvil consistió en metanol (solvente A) y agua con 0.5 % de ácido acético (Solvente B). El gradiente de elución empleado fue: 0-10 min, 83% fase B en elución isocrática. 10-20 min, 85 % fase B. 20-25 min, 70% fase B. 25-45 min, 60% solvente B. 45-60 min, 60% fase B con elución isocrática. Luego se realizó una etapa de re-equilibrado antes de la siguiente inyección.

Se seleccionaron 7 compuestos fenólicos para analizar, con el objetivo de cubrir todas las subcategorías correspondiente a los polifenoles hidrofílicos (**tabla 3**). El hidroxitirosol fue seleccionado como representante del subgrupo alcoholes fenólico; la oleuropeína como secoiridoide; el ácido gálico, ácido vinílico y el ácido cafeico como fenoles ácidos; el pinosresinol como lignanos y por último la apigenina en representación de los flavonoides. Este último no pudo ser disuelto en metanol imposibilitando su análisis. Previamente a analizar las muestras de interés se preparó los estándares mencionados anteriormente, cada uno de ellos a una concentración de 150 μ M en metanol. Estos estándares fueron seleccionados por presentar picos definidos y no superpuestos entre si. Una vez obtenido el cromatograma individual para cada uno de ellos se analizó una mezcla con los estándares de polifenoles utilizados (150 μ M en metanol).

Se analizaron las muestras de extracción de polifenoles correspondientes a los aceites Coratina y Arbequina.

3.2.6 Aceite sintético

Se preparó un aceite sintético con un perfil lipídico equivalente al del aceite de oliva para poder evaluar el efecto de los polifenoles de manera independiente al resto de componentes minoritarios. El perfil de ácidos grasos y sus proporciones fue elaborado usando como referencia los porcentajes para cada uno estipulados por el COI.

Tabla 5. Composición del aceite sintético

Ácido graso	% v/v
Ácido oleico (18:1)	70
Ácido linoleico (18:2)	10
Ácido linoleico conjugado	1
Ácido palmítico (16:0)	16
Ácido esteárico (18:0)	3

Se preparó un volumen total de 100 μL de aceite sintético a partir de ácidos grasos (Cayman). Se mezclan 70 μL de ácido oleico, 10 μL de ácido linoleico, 1 μL de ácido linoleico conjugado, 16 μL de ácido palmítico y 3 μL ácido esteárico. Previamente a tomar el volumen indicado se llevo los estándares a una concentración de 1 mol/L ajustando el

volumen con metanol.

3.2.7 Nitración gástrica

El aceite sintético en presencia de diferentes concentraciones de polifenoles se incubó por 1 h a 37 °C bajo continua agitación con 475 μL de jugo gástrico sintético (HCl 79 mM y NaCl 34 mM), NaNO_3 (5 mL, 100 mM) y 10 μL de estandar $\text{d}_4^{15}\text{NO}_2\text{OA}$. Posteriormente se realiza una extracción con 1 mL hexano, conservando la capa superior donde permanecerán los lípidos nitrados. Lo recogido se evapora en un sistema de evaporación a presión reducida de la marca Labconco y posteriormente se disuelve en metanol de calidad HPLC y *high-resolution mass spectrometry analysis* para su posterior análisis.

3.2.8 Determinación y cuantificación de ácidos grasos nitrados

Para detectar y cuantificar los ácidos grasos nitrados formados en la muestra se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (Infinity 1260, Agilent) acoplada a espectrometría de masas (QTRAP4500, ABSciex), según referencias (102–105)

Los ácidos grasos nitrados fueron separados usando una columna de HPLC en fase reversa (Luna C18(2), 5 μm , 100 \times 2.0 mm; Phenomenex) empleando un gradiente de acetonitrilo en agua, con 0.1%v-v de ácido fórmico. Las condiciones de la fuente de ionización del espectrómetro fueron las siguientes: el voltaje de la

fuelle y el potencial de *declustering* se establecieron en $-4,5$ kV y -30 V, respectivamente, y la temperatura de la fuente fue de 400 °C. El analizador se operó en modo MRM (del inglés, *multiple reaction monitoring*) para la detección de NO_2 -FA. Las transiciones utilizadas fueron m/z 326/46 y m/z 326/279 para NO_2 -OA, m/z 324/46 y m/z 324/277 para NO_2 -LA y NO_2 -cLA, m/z 344/46 para NO_2 - $^{13}\text{C}_{18}$ OA, y m/z 325/47 para ^{15}N O_2 -cLA. Los datos se adquirieron utilizando el software Analyst 1.6.2 (ABSciex) y se analizaron utilizando MultiQuant 2.1 (ABSciex).

3.2.9 Determinación y cuantificación de la oxidación de ácidos grasos

La oxidación lipídica del aceite después de la digestión gástrica *in vitro* se determinó utilizando la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) (106) con modificaciones. Las muestras (50 μl) se incubaron en solución de TBA (0,25mL, 42 mM) y ácido acético (20%) a 90 °C durante 1 h. Luego, las muestras se centrifugaron a $10.000 \times g$ durante 10 min. La formación de aductos de TBA en las muestras (100 μL) se midió mediante fluorescencia (excitación a 515 nm y emisión a 550 nm). Se preparó de manera paralela una curva con soluciones estandar de TEP (1,1,3,3-tetraethoxypropano) con concentraciones (0,61, 1,22, 2,43 y 4,86 $\mu\text{mol/L}$).

3.2.10 Análisis de los datos

Los resultados fueron expresados como media \pm la desviación estándar de las medias con valores de al menos tres experimentos independientes y analizados con GraphPad Prism (versión 5.0). Los análisis estadísticos se realizaron mediante análisis de varianza, seguido de una prueba posterior de Tukey. Las diferencias fueron significativas cuando $p \leq 0,05$.



4. Resultados y discusión

4.1 Determinación del perfil de ácidos grasos en el AOVE

A partir de la colaboración con el INIA de “Las brujas” se determinó el porcentaje de los distintos ácidos grasos que forman parte de la fracción mayoritaria del AOVE de las variedades Arbequina y Coratina, los mismos fueron determinados mediante cromatografía de gases. La concentración de estos fluctúa en base a la variedad de olivo, el clima, la época de recolección, el grado de maduración y otros factores, comportamiento observado en el resto de los componentes que forman parte del aceite. Al estudiar el perfil de ácidos grasos obtenido se observa cómo las diferentes variedades de olivo Arbequina y Coratina presentan una composición diferente de ácidos grasos (**Tabla 6**). Se puede observar que el ácido palmitoleico (16:1) fue detectado en mayor proporción en Arbequina respecto a Coratina $2,7 \pm 0,6$; $0,7 \pm 0,1$ respectivamente, al igual que el ácido linoleico (18:2) $11,9 \pm 0,3$; $6,9 \pm 0,7$. Por otro lado, en Coratina, se detectaron mayores niveles de ácido oleico (18:1) y ácido esteárico (18:0) que en arbequina (107).

Tabla 6. Perfil de ácidos grasos (%) mayoritarios de las variedades Coratina y Arbequina.

Ácido graso					
Variedad	16:01	18:0	18:1	18:2	18:3
Arbequina	$2,7 \pm 0,6$	$1,9 \pm 0,2$	61 ± 1	$11,9 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,4$
Coratina	$0,7 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,3$	73 ± 1	$6,8 \pm 0,7$	$0,7 \pm 0,07$

4.2 Detección y cuantificación de ácido linoleico conjugado

La presencia de cLA en los aceites de Arbequina y Coratina se cuantificó mediante la detección por HPLC-MS/MS de una reacción de Diels Alder de dienos conjugados con PTAD

(m/z 454). Los lípidos vegetales tienen niveles de cLA de hasta 1,0 mg de cLA/g de

Tabla 7. CLA endógeno en AOV envero

Cultivar	cLA (mg/g AOV)
Arbequina	$0,019 \pm 0,001$
Coratina	$0,014 \pm 0,004$

grasa, con niveles reportados de cLA en aceites de oliva de hasta 0,2 mg/g de aceite predominantemente los isómeros cis9-trans11- y trans10-cis12. En este caso, los niveles totales de cLA en AOV fueron de alrededor de 0,02 mg/g de AOV como se muestra en la **Tabla 7.** (86,108). En el cromatograma de la **Figura 11** se muestra la detección de las diferentes transiciones de los isómeros del cLA, siendo la primera vez que se logra cuantificar en AOV.

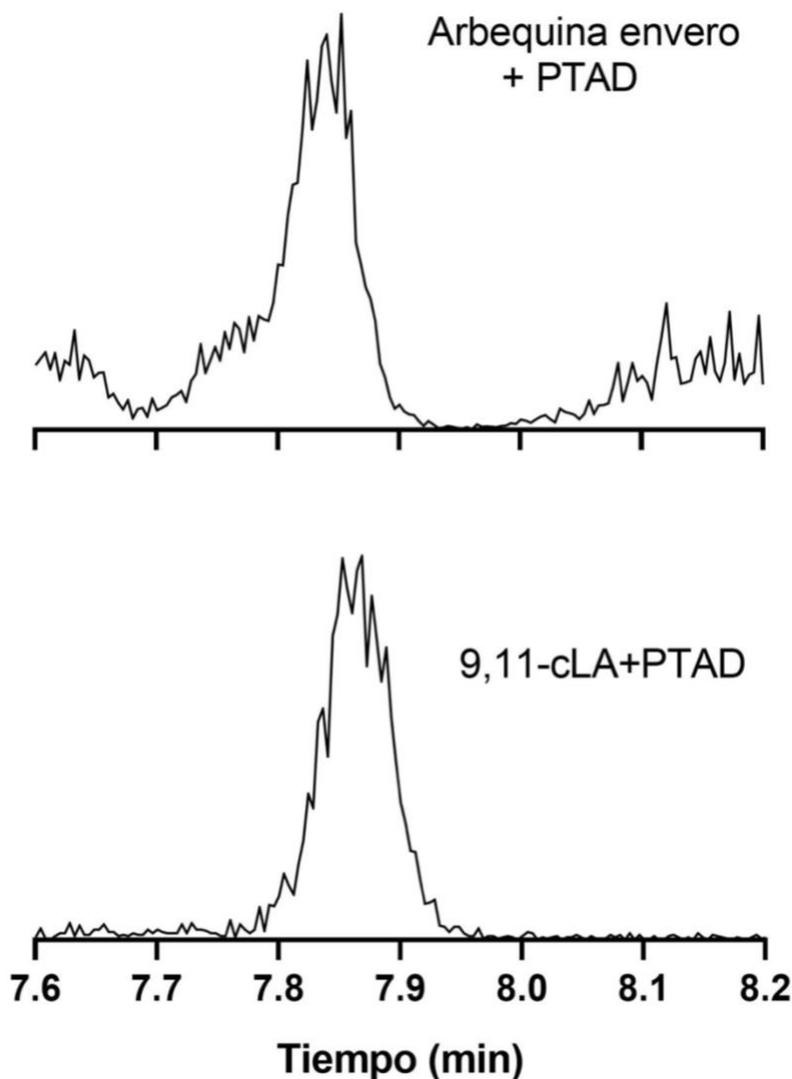


Figura 11. Cromatograma para la detección de cLA en muestras de AOV transición 438.5/178.2.

4.3 Cuantificación de polifenoles

El método de Folin-Ciocalteu es un método colorimétrico que consiste en que los grupos hidroxilos de los grupos fenólicos presentes en la muestra, en condiciones alcalinas, se oxidan al reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual está compuesto por una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato y es inicialmente de color amarillo. Cuando se reduce, el reactivo de Folin-Ciocalteu da como producto un complejo azul, el cual se sigue por espectrofotometría UV-Vis a 750 nm.

La ecuación obtenida de la curva de calibración del ácido gálico en un rango de mg/L fue $y=0,0525x + 0,0293$ con un $R^2=0,9636$ (**figura 12**). La concentración total de polifenoles se expresa en miligramos de equivalente de ácido gálico por gramo de fracción, por lo tanto se tiene que considerar que se parte de un gramo de muestra y la cantidad de solvente utilizado para poder expresar la concentración en las unidades adecuadas.

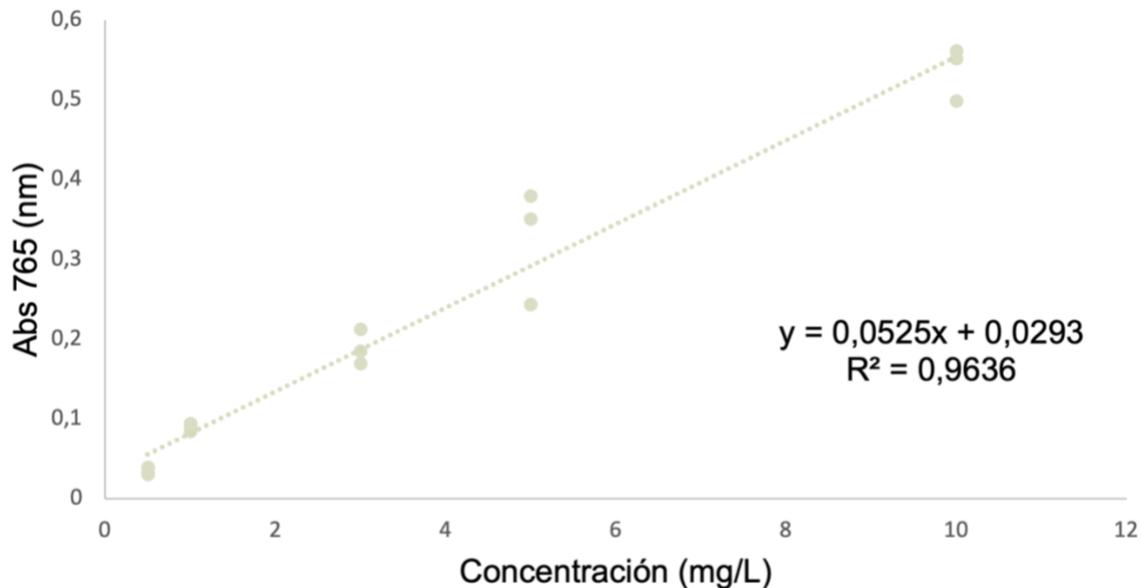


Figura 12. Curva de calibración ácido gálico.

La concentración total de polifenoles obtenida tras interpolar los valores de absorbancia en la ecuación de la recta se muestra en la **Tabla 8**. Cabe destacar que

la cuantificación fue realizada por triplicado y que posteriormente al realizar los cálculos se promedió la concentración de polifenoles totales para cada condición.

Tabla 8. Concentración total de polifenoles

Variedad	Polifenoles totales (mg/kg)
Arbequina verde	59,8 ± 5,3
Arbequina envero	49,7 ± 5,3
Coratina verde	90,4 ± 6,2
Coratina envero	161,3 ± 2,7

La muestra Arbequina verde presenta mayor contenido de polifenoles totales respecto al estadio envero. En cambio Coratina envero alcanza un 50% más de polifenoles en comparación con el estadio verde. Si observamos ambas variedades, Coratina tiene una mayor concentración que Arbequina en ambos estadios, esto coincide con los datos reportados (109). Las diferencias entre las variedades son esperables, debido a que los polifenoles son generados por reacciones químicas durante la maduración del fruto y el proceso de elaboración del aceite, por ejemplo durante la maduración de las aceitunas, OL es casi completamente degradada cuando el fruto se oscurece, pero el HT y el tirosol aumentan (33,110). Cinco categorías se proponen para clasificar el aceite de oliva dependiendo de su contenido de polifenoles, según el método de Folin-Ciocalteu: muy alta (>600 mg/kg), alta (450-600 mg/kg), media (300-450 mg/kg), baja (150-300 mg/kg) y muy baja (<150 mg/kg) (111), acorde con esta clasificación, la variedad Arbequina sería incluida en la categoría muy baja y Coratina en la de baja. La clasificación obtenida para las muestras analizadas difiere con los datos presentados por otros investigadores, se clasifican a la variedad Coratina según su contenido de polifenoles como muy alta y a la variedad Arbequina como baja. Cabe destacar que estos estudios fueron con aceites procedentes de olivos cultivado en Europa. Como se mencionó anteriormente la concentración de polifenoles no solo varía según la variedad de olivo, también cambia según las condiciones climáticas, como temperatura, frecuencia de riego, latitud, humedad del ambiente, etc. En diferentes estudios confirman que la concentración de polifenoles totales depende de las

condiciones de riego, específicamente se observa mayor contenido de polifenoles en épocas de sequía, baja disponibilidad de agua aumenta la producción de compuestos fenólicos (112). Esto puede explicar las diferencias encontradas. Los polifenoles pasan de las aceitunas al aceite en el proceso de molienda y el baidado del aceite de oliva pero se estima que más del 80% del contenido de polifenoles se pierde en el proceso y queda en la pulpa y carozo que forman el alperujo (113).

4.2 Determinación del perfil de polifenoles mediante HPLC

Para identificar algunos de los polifenoles presentes en la muestra de aceite se utilizó la técnica Cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La separación de los componentes que constituyen una muestra mediante esta técnica analítica se basa en la distribución de estos componentes entre dos fases: la fase estacionaria, que está contenida en la columna y la fase móvil, la cual fluye a través de la columna. La función de esta fase móvil no sólo es la de arrastrar al analito sino que también debe interactuar con él. La cromatografía líquida se lleva a cabo en un soporte de acero inoxidable, en la que todas las especies disueltas en la muestra pueden separarse según su afinidad por la fase móvil y la fase estacionaria, y mediante la elección de una combinación adecuada de estas fases. En este proyecto se ha trabajado con una cromatografía en fase reversa (RP-HPLC), en la cual se emplea una fase estacionaria apolar C18 con una cadena anfipática de 18 carbonos y una fase móvil de polaridad moderada. Con estas características se consigue un tiempo de retención mayor para aquellos compuestos de naturaleza apolar, mientras que para las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente y por lo tanto se obtiene un tiempo de retención más corto (109,114). El tiempo de retención para cada uno de los polifenoles es influenciado por variedad de factores, algunos de ellos son:

- Estructura química: La estructura química de cada polifenol es un factor clave que influye en su tiempo de retención en una cromatografía de fase reversa. Los polifenoles con estructuras químicas diferentes pueden interactuar de

manera distinta con la columna y la fase móvil, lo que afecta su tiempo de retención.

- **Polaridad:** Los polifenoles pueden variar en su polaridad, y esto influye en su afinidad por la fase estacionaria (columna C18) y la fase móvil. Los compuestos más polares interactúan más con la fase móvil y eluyen primero. Los compuestos menos polares (más apolares) interactúan más con la fase estacionaria y tienen mayor tiempo de retención.
- **Tamaño molecular:** El tamaño molecular de los polifenoles también es importante. Los polifenoles más grandes o con estructuras más voluminosas pueden experimentar interacciones más fuertes con la columna y, por lo tanto, se retendrán más tiempo en la misma.
- **Interacciones con la fase móvil:** Las interacciones de los polifenoles con la fase móvil (metanol y agua con ácido acético) pueden influir en su tiempo de retención. Diferentes polifenoles pueden interactuar de manera diferente con esta fase móvil, lo que afecta su tiempo de elución.

En la **Figura 13** se muestra el cromatograma correspondiente a los estándares de polifenoles escogidos para analizar mencionado anteriormente a una concentración de 150 μM , a su vez en la **Tabla 9** se detallan las estructuras específicas de los polifenoles trabajados y su tiempo de retención correspondiente para cada uno de ellos. Se observa una correlación entre la estructura de cada uno con el tiempo de retención: en primer lugar eluyen los polifenoles más polares, dado el gradiente generado, la fase móvil inicial es metanol y se va adicionado concentraciones crecientes de la fase móvil B que es muy polar. Esto indica que los compuestos más polares tendrán menores tiempos de retención porque interactúan más con la fase móvil (más afín a ellos), eluyendo rápidamente y los compuestos menos polares interactuarán más con la fase estacionaria (C18), teniendo mayores tiempos de retención, ya que necesitarán mayores concentraciones de fase móvil B para ser eluidos. Eluyendo primero los de menor tamaño y mayor polaridad como el ácido cafeico y el hidroxitiroxol, por último los menos polares y de mayor tamaño como la oleuropeina y el pinoresinol. Estos datos comparables con otros trabajos de investigación publicados (115).

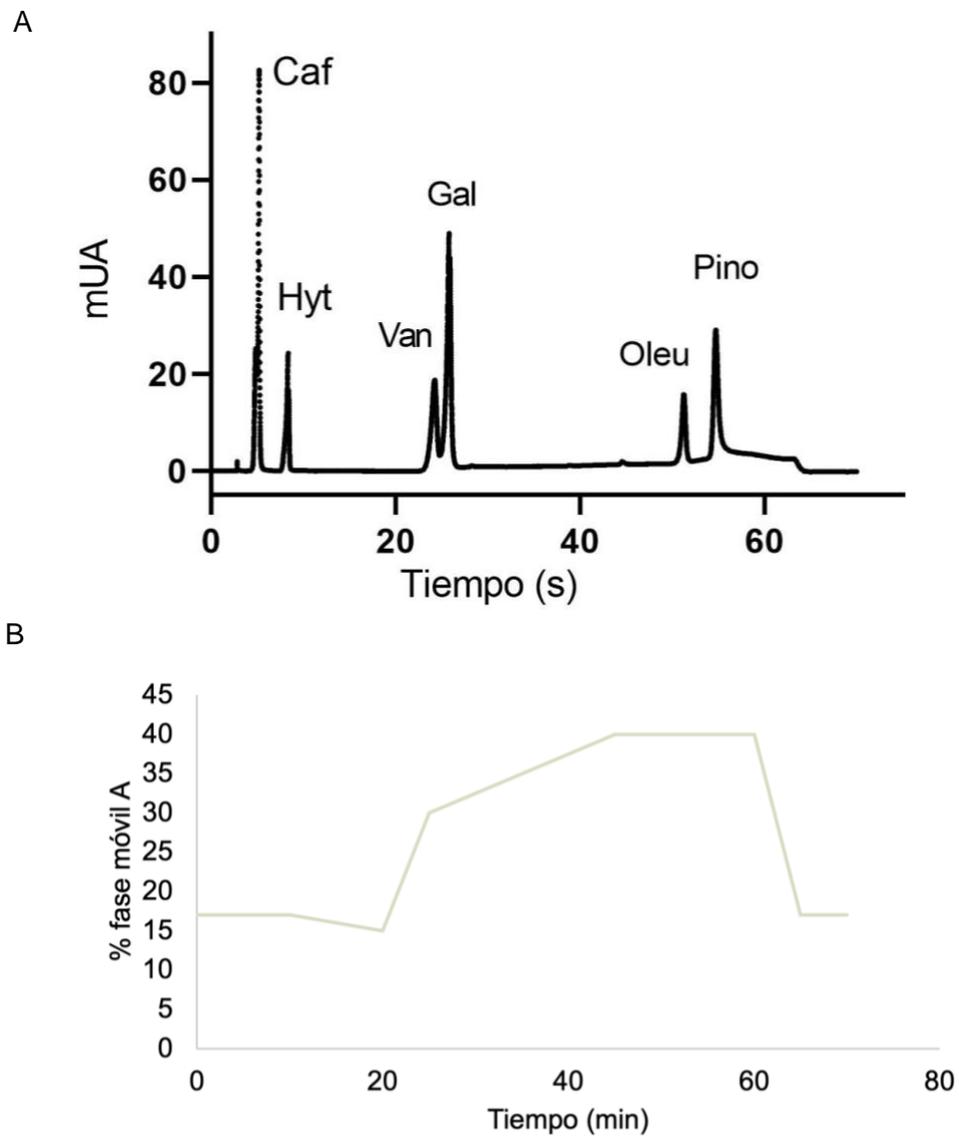
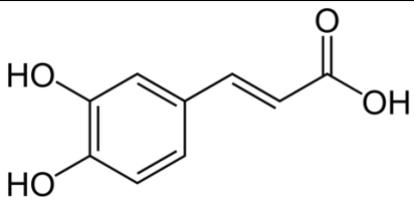
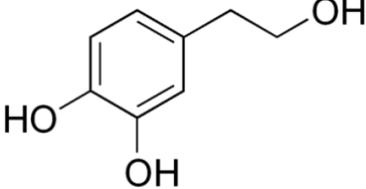
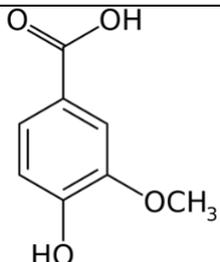
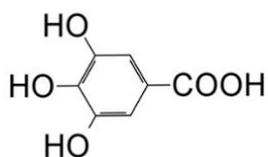
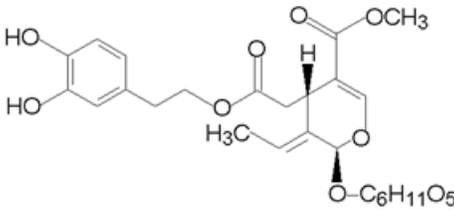
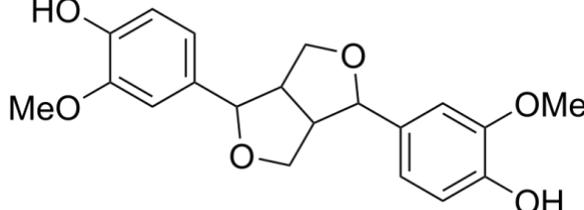


Figura 13. (A) Cromatograma de los estándares de polifenoles: Ácido cafeico, Hidroxitirosol, Ácido vanílico, Ácido gálico, Oleuropeína y Pinoresino. (B) Gráfico de gradiente utilizado.

Tabla 9. Relación entre estructura de los diferentes polifenoles analizados y los tiempos de retención obtenidos experimentalmente.

Polifenol	Estructura	T. retención (s)
Ácido cafeico		5,24
Hidroxitiroxol		8,64
Ácido vanílico		25,80
Ácido gálico		28,27
Oleuropeína		51,24
Pinoresinol		55,91

Con los tiempos de retención ya identificados para cada uno de los polifenoles antes mencionados, se corrieron las muestras de aceite de oliva de la

variedad Coratina y Arbequina envero, sus cromatogramas se detallan en la **Figura 14** respectivamente.

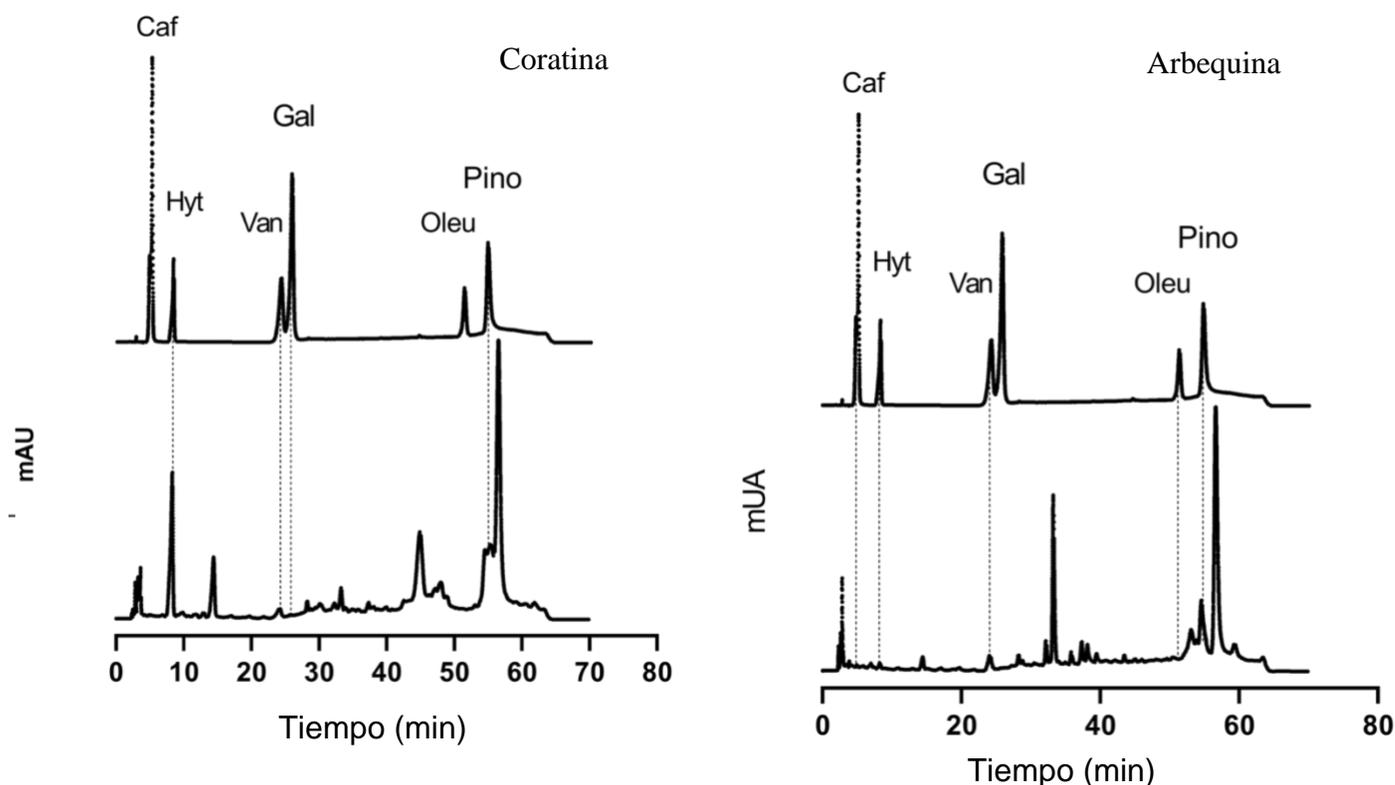


Figura 14. Cromatograma de elución de aceite de oliva extra virgen variedad Coratina y Arbequina envero.

En el caso de la muestra de aceite de AOVE de la variedad Coratina envero se identificaron picos correspondientes a los siguientes polifenoles: hidroxitirosol, ácido vanílico, ácido gálico y pinosinol. En cuanto a la muestra de Arbequina envero se identificaron los picos correspondientes a los siguientes polifenoles: ácido cafeico, hidroxitirosol ácido vanílico, ácido gálico,oleuropeina y pinosinol. El perfil de polifenoles no presenta mayor diferencia entre las variedades, a excepción del ácido cafeico y oleuropeina que son detectados solamente en la variedad arbequina. En estudios realizados por otros investigadores se observa el mismo comportamiento en cuanto al perfil de los compuestos fenólicos. A su vez, se observan grandes diferencias a nivel de concentración entre las diferentes

variedades (95). Esto podría ser interpolable con las gráficas obtenidas, ya que se presentan grandes diferencias entre las alturas de los picos (mUA), lo que podría indicar diferentes concentraciones en los polifenoles entre las variedades. Para confirmarlo se deberían realizar análisis cuantitativos con una curva de calibración con concentraciones determinadas de polifenoles. Algunos de los picos no pudieron ser identificados en las muestras debido a no contar con los estándares necesarios para la caracterización, pero mediante análisis bibliográfico se puede relacionar algunos de los picos con los polifenoles adecuados. Por ejemplo, el α -tirosool es un compuesto fenólico muy similar al Hidrotirosool, pero con carácter menos polar debido a que tiene un solo grupo hidroxilo en su anillo aromático en comparación con el hidrotiroxol que posee dos. Es uno de los polifenoles más abundantes en la variedad Coratina, pero que en la variedad Arbequina se encuentra en menor proporción (109,116). Al analizar la **Figura 14**, las cuales representan los cromatogramas de las muestras de Coratina y Arbequina respectivamente, se puede observar un gran pico entre los polifenoles hidrotiroxol y valílico. Este pico podría corresponderse con este, el α -tirosool por presentar mayor tiempo de retención que hidrotiroxol pero menos que otros polifenoles más apolares y estar presentes en diferente proporción en las variedades de olivo.

El proceso de extracción del aceite es un factor crítico determinante del contenido de fenoles en el aceite, esto podría estar contribuyendo en la diferencia entre las dos variedades estudiadas. Mediante este proceso, los fenoles muy polares quedan adheridos a la pulpa de la aceituna; es así que los mayores contenidos de fenoles se obtienen con sistemas de presión y decánteres de dos fases, ya que en los de tres se adiciona agua perdiendo fenoles en ella. En un proyecto realizado de forma paralela a esta tesis de grado, se enriqueció aceite de soja con polifenoles procedentes de alperujo. Mediante medios mecánicos se logró trasvasar al aceite de soja polifenoles que habían quedado en la pulpa y el carozo tras la elaboración del aceite. Algunos de los compuestos fenólicos que lograron pasar al aceite fueron el hidrotiroxol, Tirosool, Ác. Vanílico, Ác. caféico, vainillina, entre otros. Es importante destacar que los polifenoles se trasvasan al aceite de soja de manera diferencial si se trabaja con alperujo procedente de la variedad

Coratina o Arbequina. Esto va de la mano con los resultados obtenidos sobre el perfil diferencial y contrastante de las dos variedades.

4.3 Nitración y oxidación de ácidos grasos

Para evidenciar el rol que tienen los polifenoles en la formación de NO₂-FA, se construyó un aceite sintético con el mismo perfil de ácidos grasos que el AOEV, sin los componentes de la fracción minoritaria. El aceite sintético generado fue enriquecido con diferentes concentraciones de polifenoles extraídos de las variedades Coratina y Arbequina trabajadas. De esta manera nos podemos concentrar en el rol que juegan estos componentes minoritarios específicamente en la formación de los NO₂-FA. Cuando se estudió el efecto del aceite de oliva en la formación de estas especies se había observado que al someter al AOVE a condiciones gástricas simulando lo que ocurre en el estómago se producía NO₂-cLA y NO₂-OA. Este efecto podría ser modulado por otros componentes del aceite que tienen marcada evidencia de actividad antioxidante, reaccionando con las especies reactivas de oxígeno desfavoreciendo la oxidación y favoreciendo la nitración de los ácidos grasos. Un claro ejemplo son los tocoferoles, el más abundante en el aceite de oliva es α -tocoferol, este es capaz de neutralizar los radicales libres y prevenir la peroxidación de lípidos de membrana y proteínas de baja densidad (LDL) (117).

La oxidación lipídica del aceite después de la digestión gástrica *in vitro* se determinó utilizando la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA). Se preparó de manera paralela una curva con soluciones estándares de TEP con concentraciones (0,61; 1,22; 2,43 y 4,86 $\mu\text{mol/L}$). Para la curva se obtuvo la gráfica presentada en la **Figura 15**, con una ecuación de la recta $y=4,1852x+1,015$ y un $R^2=0,9926$. Mediante la interpolación de los valores de fluorescencia de las muestras de aceite se contruyen los gráficos de UF en función de concentración de polifenoles (**Figura 16**).

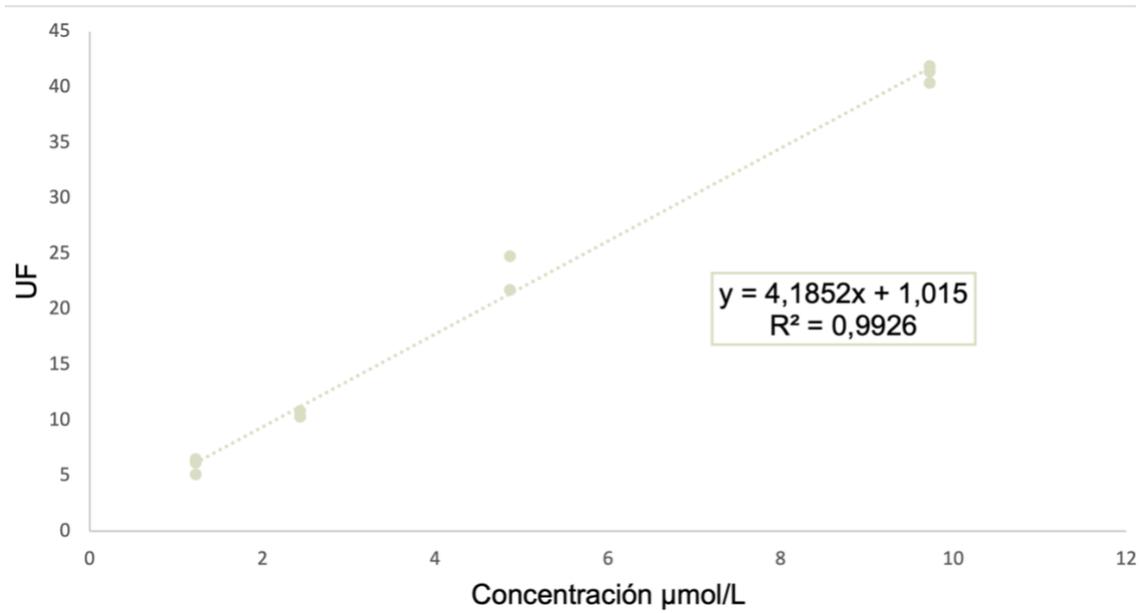
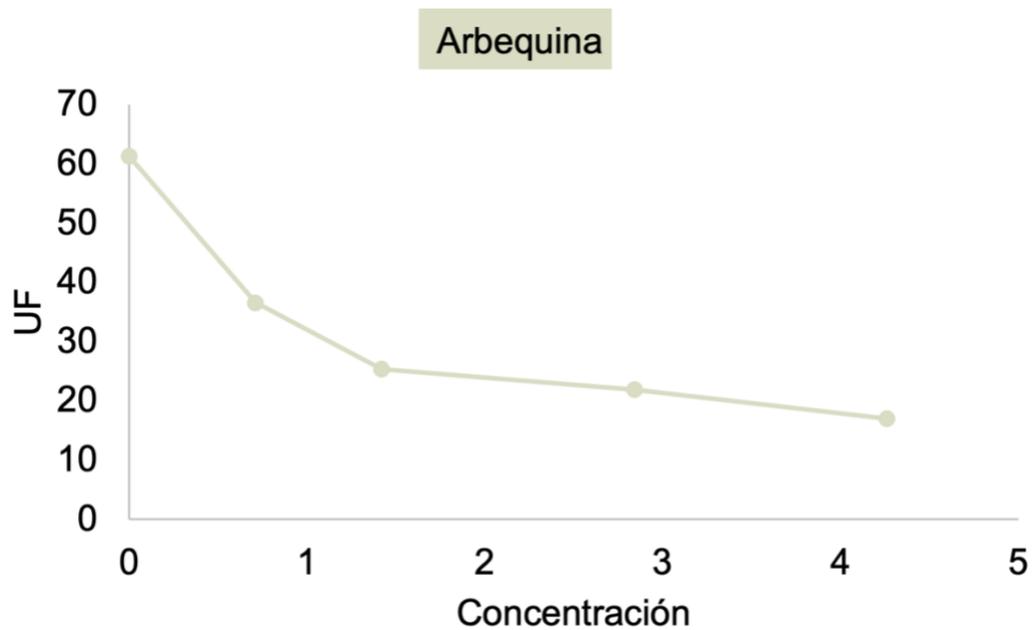


Figura 15. Curva de calibración con soluciones estándar de TEP (1,1,3,3-tetraethoxypropano) con concentraciones (0.61, 1.22, 2.43 y 4.86 μmol/L). Se midió mediante fluorescencia con excitación a 515 nm y emisión a 550 nm.



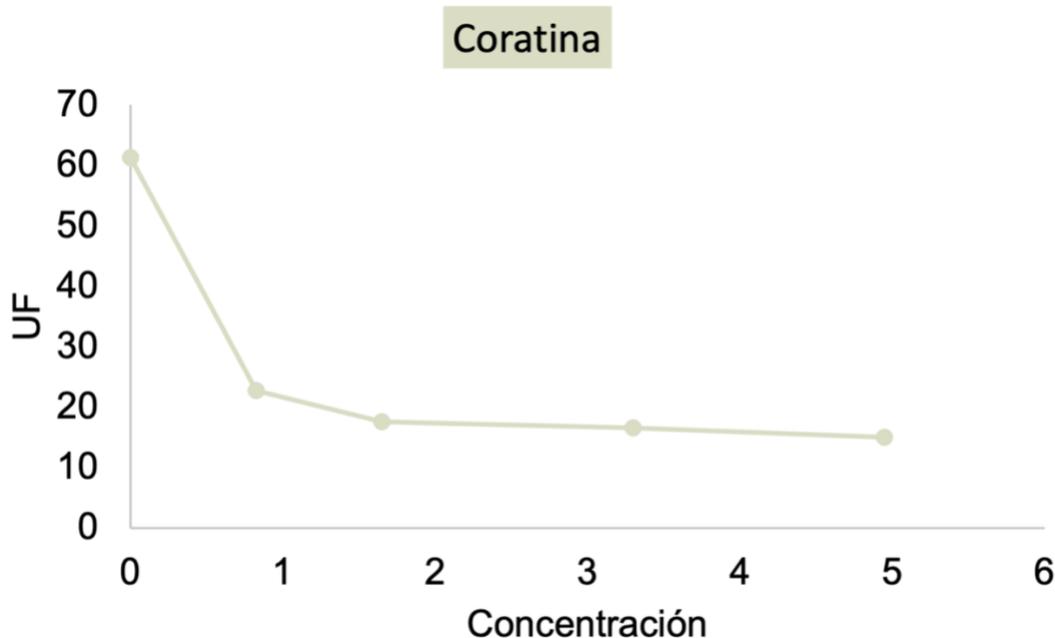


Figura 16. Gráficas de unidades de fluorescencia en función de la concentración de polifenoles para las variedades Arbequina y Coratina envero.

Cabe destacar que para la construcción de la gráfica de la **Figura 16** se realizaron las medidas de fluorescencia por triplicado, pero que a la hora de graficar los valores mostrados son del promedio. Claramente, al analizar las gráficas para ambas variedades se observa que en ausencia de polifenoles se da la máxima oxidación de los ácidos grasos provenientes del aceite de oliva, al ir aumentando la concentración de los mismos se observa que la oxidación disminuye considerablemente. Confirmaría que los polifenoles de alguna manera logran interaccionar ERO como los radicales libres evitándolo que suceda, al tener mayor disponibilidad de polifenoles para que interaccionen con dichas especies menores es el nivel de oxidación que se genera. Sería interesante agregar mayor concentración de polifenoles para evaluar si los niveles de oxidación llegan a cero o si se mantienen en un nivel bajo.

En la **Figura 17 y 18**, se muestran las gráficas de nitración vs oxidación para ambas variedades. En ambas figuras se observa una máxima oxidación lipídica en ausencia de polifenoles y una mínima oxidación con la mayor concentración, al igual que en las gráficas presentadas anteriormente. En cuanto a la nitración de los

ácidos grasos se ven comportamientos diferentes para las especies analizadas, a grandes rasgos se puede decir que se da un favorecimiento de la nitración a medida que aumenta la concentración de polifenoles del OA y cLA en la variedad Coratina (C y D), pero cuando se trata de Arbequina se observa que la concentración de polifenoles aumenta la formación de NO₂-cLA solamente (A y B). Estas diferencias pueden deberse a que el AO es menos susceptible a la nitración en comparación con cLA, el cual es el ácido graso preferido para la nitración en condiciones gástricas como se mencionó anteriormente.

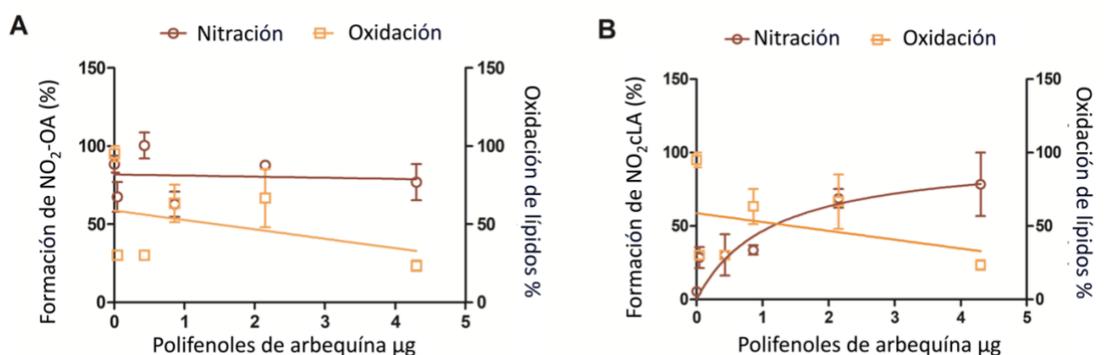


Figura 17. Nitración vs oxidación de lípidos en aceite sintético a diferentes concentraciones de polifenoles de las diferentes variedades. (A) Oxidación de lípidos vs formación de NO₂-OA (B) Oxidación de lípidos vs formación de NO₂-cLA en presencia de polifenoles de la variedad arbequina. Para la oxidación lipídica, 100% representa la oxidación en ausencia de polifenoles. Para la nitración de lípidos, 100% representa NO₂-FAs en la presencia de la máxima concentración de polifenoles.

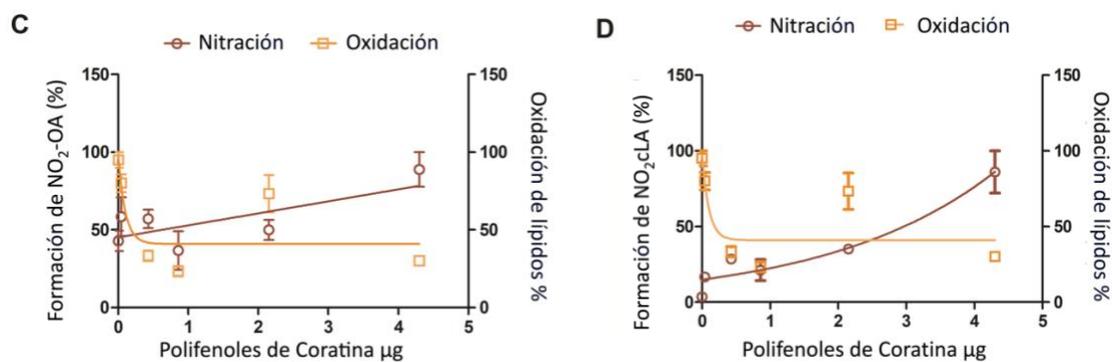


Figura 18. Nitración/oxidación de lípidos en aceite sintética a diferentes concentraciones de polifenoles de las diferentes variedades. (C) Oxidación de lípidos vs formación de NO₂-OA (D) Oxidación de lípidos vs formación de NO₂-cLA en presencia de polifenoles de la variedad Coratina.

Oxidación de lípidos vs formación de NO₂-cLA en presencia de Polifenoles de la variedad Coratina. Para la oxidación lipídica, 100% representa la oxidación en ausencia de polifenoles. Para la nitración de lípidos, 100% representa NO₂-FAs en la presencia de la máxima concentración de polifenoles.

A su vez se encuentran diferentes correlaciones de la oxidación/nitración lipídica entre las variedades Coratina y Arbequina, esto puede atribuirse a la diferencia de los perfiles de polifenoles que se encontraron entre ambas variedades como se detalló anteriormente. En la variedad Arbequina se detectaron los siguientes polifenoles: ácido cafeico, hidroxitirosol ácido vanílico, ácido gálico oleuropeina y pinoresinol. Mientras que para Coratina se detectaron los anteriores a excepción del ácido cafeico y oleuropeina. También es importante resaltar que en Coratina tenemos un gran pico no identificado, pero que tras investigación bibliográfica se podría tratar del α -tiroso, otros picos no identificados marcan relevantes diferencias en los perfiles de compuestos fenólicos. Todo esto nos lleva a pensar que el perfil de polifenoles presentes en cada variedad puede estar influyendo en la formación de NO₂-FA diferencial observada entre las dos variedades. La concentración de polifenoles aumenta en gran medida la formación de los NO₂-FA, pero el perfil de estos compuestos determina cómo será la formación de estas especies, por ese motivo se observan diferentes puntos de inflexión para ambas variedades claramente representada en las gráficas D y B, en donde se observa un aumento en la formación de NO₂-cLA diferencial para Coratina y Arbequina.

Teniendo en cuenta la hipótesis de que la formación de especies nitradas está modulada por la presencia de polifenoles cuando se somete al aceite a condiciones gástricas y de la variedad de olivo, sería importante evaluar la implicancia de los diferentes polifenoles proporcionados por el AOV de manera independiente; de esta manera se podría conocer si los efectos generados por estos compuestos minoritarios son producidos por el colectivo de todos los polifenoles o si están involucrados unos pocos. Otro aspecto interesante a tener en cuenta para futuros estudios es poder dilucidar las diferentes vías de señalización de los ácidos grasos nitrados derivados del consumo de aceite en algún modelo de enfermedad

que sea relevante para nuestro país como la enfermedad del hígado graso no alcohólico, enfermedad de gran incidencia en Uruguay por la dieta consumida. El efecto antioxidante que presentan los polifenoles derivados del aceite de oliva o sub productos de su producción, podrían ser utilizados para enriquecer un aceite de semilla y así aumentar su estabilidad oxidativa y adquirir las propiedades benéficas que presentan estos compuestos.



5. Conclusiones

En el presente trabajo, y gracias a la colaboración con el INIA “Las Brujas”, se determinó el porcentaje de los distintos ácidos grasos que conforman la fracción mayoritaria del aceite de oliva de las variedades Arbequina y Coratina mediante cromatografía de gases. El análisis del perfil de ácidos grasos obtenido revela diferencias significativas en la composición de ambas variedades.

Además, se logró detectar la presencia de ácido linoleico conjugado (cLA) en los aceites de Arbequina y Coratina. Su cuantificación se llevó a cabo mediante HPLC-MS/MS, utilizando una reacción de Diels-Alder entre dienos conjugados y PTAD. No se había logrado cuantificar efectivamente este ácido graso en el aceite de oliva con anterioridad.

Se extrajeron los polifenoles del aceite de oliva, uno de los componentes minoritarios de este producto. La extracción se llevó a cabo utilizando solventes orgánicos, con el objetivo de determinar su concentración, analizar su perfil en el aceite y enriquecer un aceite sintético elaborado con diferentes concentraciones de estos compuestos.

En cuanto a la cuantificación, se lograron establecer rangos concordantes con los reportados en la bibliografía consultada, destacando una mayor concentración de polifenoles en la variedad Coratina en comparación con Arbequina. Este resultado se correlaciona con las características organolépticas que distinguen a ambas variedades.

Durante la caracterización de algunos de los polifenoles presentes en el aceite, se observó un perfil distinto entre las dos variedades analizadas. En el caso de la muestra de aceite de AOVE de la variedad Coratina envero se identificaron picos correspondientes a los siguientes polifenoles: hidroxitirosol, ácido vanílico, ácido gálico y pinosinol. En cuanto a la muestra de Arbequina envero se identificaron los picos correspondientes a los siguientes polifenoles: ácido cafeico, hidroxitirosol, ácido vanílico, ácido gálico, oleuropeina y pinosinol. El perfil de polifenoles no presenta mayor diferencia entre las variedades, a excepción del ácido cafeico y oleuropeina que son detectados solamente en la variedad arbequina. Sin

embargo, queda pendiente la identificación de ciertos compuestos fenólicos que no fue posible determinar en este estudio.

Al analizar las gráficas de oxidación y nitración en función de la concentración de polifenoles, se observa que estos compuestos afectan significativamente la oxidación y nitración de los ácidos grasos. Aunque el efecto no es lineal, dentro del rango estudiado parece que, a mayor concentración de polifenoles, se evidencia una mayor nitración y una menor oxidación.

Además, se detecta un comportamiento diferencial entre las dos variedades de aceite en la formación de especies nitradas, lo que sugiere que el perfil específico de polifenoles de cada variedad es responsable de estas diferencias determinadas.

Si bien el OA es el ácido graso más abundante en el AOVE, es menos susceptible a la nitración que los ácidos grasos. Por el contrario, el cLA es el ácido graso más susceptible a la nitración.

A nivel general, se puede concluir que el aceite de oliva sirve como fuente de $\text{NO}_2\text{-FA}$ bajo condiciones gástricas y que los polifenoles podrían proteger al AOV de la oxidación de lípidos, favoreciendo la nitración de ácidos grasos. Este aumento de la formación de $\text{NO}_2\text{-FA}$ en AOV debido a la presencia de polifenoles puede podría mejorar sus bien documentadas acciones protectoras pleiotrópicas de lípidos electrófilos en la salud humana. Estas especies formadas e identificadas tienen un rol importante en las propiedades beneficiosa que presenta el consumo de AOVE para la salud.

Sería interesante investigar si la formación de las especies nitradas se debe a la acción de un grupo específico de polifenoles o si resulta de una interacción sinérgica entre ellos.



6. Referencias

6. Referencias

1. Fornell A. El olivo y la producción de aceite en las Uillae de la Bética. In Jaén; p. 101–19.
2. Bolens L. Riquezas de la tierra andaluza y primacía del aceite de oliva en la sociedad y la civilización de al-Andalus (siglos X-XVI). Riquezas de la tierra andaluza y primacía del aceite de oliva. 1996;80–81:181–216.
3. Standish R. The first of trees. The history of the olive. First. 1960.
4. Duhamel G, Flandrin J louis, Atenea P. Historia del aceite de oliva [Internet]. 2015 [cited 2020 Apr 27]. Available from: <https://www.aceitedeoliva.com/historia-del-aceite-de-oliva/>
5. Román J, Villarino A, Serrano L, Urrialde R, Lezcano C, Sánchez F. El aceite de oliva y la dieta mediterránea. Nutrición y salud. 2008;7:7–24.
6. Ferronato B, Rierlla V. Descripción de la calidad de aceites de oliva de los cultivares arbequina y coratina para el este del Uruguay. Vol. 87, 經濟志林. [Montevideo]: Universidad de la República Facultad de Agronomía ; 2017.
7. Barranco D, Fernández R, Romero L. El cultivo del olivo. 6ta, editor. 2008.
8. Oficina de Estadística Agropecuarias. Resultado del censo nacional de olivos 2023. Montevideo; 2023 Dec.
9. Noel M, Leidy A, Borges G, Mastandrea S. Revista oficial del Consejo Oleícola Internacional. 2021;128.
10. Nieve Criado M. Effect of Growing Area on Pigment and Phenolic Fractions of Virgin Olive Oils of the Arbequina Variety in Spain. 2004;81:633–40.
11. Consejo Oleícola Internacional. Norma comercial aplicable a los Aceites de Oliva y los Aceites de Orujo de Oliva [Internet]. Madrid; Nov, 2022. Available from: <http://www.internationaloliveoil.org/>
12. International olive council. Consejo Oleícola Internacional [Internet]. 2024 [cited 2024 Nov 30]. Available from: <https://www.internationaloliveoil.org/acerca-del-coi/mision-textos-basicos/?lang=es>
13. Ojeda M. Calidad del aceite de oliva virgen extra caracterizacion varietal.
14. Gila A. Clarificación de los aceites de oliva vírgenes y su efecto en las características físico - químicas y sensoriales. [Jaen]: Facultad de ciencias experimentales ; 2017.
15. Cornejo V. Caracterización química de aceites de oliva vírgenes variedad Arbequina producidos en San Juan, Argentina. [Córdoba]: Universidad Católica de Córdoba; 2018.
16. Barranco D, Fernandez R, Romero L. El cultivo del olivo. 6ta, editor. 2008.
17. Ministerio de Agricultura. Instructivo técnico para la ejecución de análisis en aceites de oliva y aceites de orujo de oliva de exportación.
18. International Olive Council. Determination of peroxide value [Internet]. 2017. Available from: <http://www.internationaloliveoil.org/>
19. International Olive Council. Method of analysis spectrophotometric investigation in the ultraviolet foreword [Internet]. 2019. Available from: <http://www.internationaloliveoil.org/>
20. Vergara M, Carmona J, Garcia B, Igartubutu JM, Garcia M. XLI Jornadas de VITICULTURA Y ENOLOGÍA de la Tierra de Barros. I Congreso Agroalimentario de Extremadura Ilustración de portada: Diseño original [Internet]. 2019. Available from: <http://www.univsantana.com>

21. Anunciación C. Características organolépticas y análisis sensorial del aceite de oliva. cuarta. Junta de Andalucía, editor. Andalucía;
22. Consejo Oleícola Internacional. Análisis sensorial de los aceites de oliva, método para la valoración organoléptica de los aceites de oliva vírgenes. [Internet]. España; Jun, 2024. Available from: <http://www.internationaloliveoil.org/>
23. Sadkaoui A. Influencia de las características del fruto y las condiciones de preparación de la pasta de aceituna, en el rendimiento del proceso de extracción del aceite de oliva virgen. [Doctorado]. [Jaén]: Facultad de ciencias experimentales ; 2017.
24. Sanchez-Rodriguez. Compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen. Revisión. *Nutr Clin Med.* 2018;XII(2):80–94.
25. Lozano J, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. Composición del aceite de oliva. *Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía.* 2009;48:197–224.
26. Grampone A, Irigaray B. Analisis de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva . In: Grampone A, Villamil J, editors. *Aceites de oliva; de la planta al consumidor.* Montevideo : Hemiferio Sur; 2013. p. 95–140.
27. Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva [Internet]. Consejo Oleícola Internacional. 2009. p. 1–18. Available from: <http://www.internationaloliveoil.org/>
28. Benatti P, Nicolai R, Calvani M, Peluso G. Polyunsaturated Fatty Acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *J Am Coll Nutr.* 2004 Aug 1;23(4):281–302.
29. Wiktorowska-Owczarek A, Berezińska M, Nowak J. The Structure and Nomenclature of Fatty Acids.
30. Coronado Herrera M, Vega Y León S, Gutiérrez Tolentino R, García Fernández B, Díaz González G. Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: nutrición, bioquímica y salud. 2006 Jul 4;72–9.
31. Beltrán G, Del Río C, Sánchez S, Martínez L. Seasonal changes in olive fruit characteristics and oil accumulation during ripening process. *J Sci Food Agric.* 2004;84(13):1783–90.
32. López-Miranda J, Pérez-Jiménez F, Ros E, De Caterina R, Badimón L, Covas MI, et al. Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. Vol. 20, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* 2010. p. 284–94.
33. Harborne JB. *Methods in plant biochemistry.*
34. Martínez G, López F. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu Apellidos, nombre.
35. Collado J. Identificación de los polifenoles en zumos de frutas rojas. 2011.
36. Zamora R, Knaze V, Rothwell JA, Hémon B, Moskal A, Overvad K, et al. Dietary polyphenol intake in europe: The european prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) study. *Eur J Nutr.* 2016 Jun 17;55(4):1359–75.
37. Tomas-Barberan FA, Ferreres F, Gil AL. ANTIOXIDANT PHENOLIC METABOLITES FROM FRUIT AND VEGETABLES AND CHANGES DURING FOSTHARVEST STORAGE AND PROCESSING. Vol. 23. 2000.
38. Tomás-Barberán FA, Espín JC. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2001. p. 853–76.

39. Kamm W, Dionisi F, Hischenhuber C, Engel KH. Authenticity assessment of fats and oils. *Food Reviews International*. 2001;17(3):249–90.
40. García JM, Yousfi K, Mateos R, Olmo M, Cert A. Reduction of oil bitterness by heating of olive (*Olea europaea*) fruits. *J Agric Food Chem*. 2001;49(9):4231–5.
41. Montedoro G, Garofolo G. Quality characteristics of virgin olive oil. Influences of some variables: variety, environment, extraction, packaging of the final product. *Revista Italiana delle Sostanze Gasse*. 1984;6a:157–62.
42. Quiles J, Ramírez M. *Olive oil and health*. Londres; 2006.
43. Lanza F. *Olive, a global history*. 2011.
44. Caramia G, Gori A, Valli E, Cerretani L. Virgin olive oil in preventive medicine: From legend to epigenetics. Vol. 114, *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2012. p. 375–88.
45. Bertuzzi FM, Tavani A, Negri EVA, Vecchia LA. Authors' response Olive oil consumption and risk of non-fatal myocardial infarction in Italy. 1999;1274–7.
46. Martínez M, Fernández E, Serrano M, Marti A, Martinez JA. Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction : an operational healthy dietary score. 2002;160:153–60.
47. Trichopoulou A, Lagiou P, Kuper H, Trichopoulos D. *Cancer and Mediterranean Dietary Traditions* [Internet]. Available from: <http://aacrjournals.org/cebpa/article-pdf/9/9/869/3257158/ce090000869p.pdf>
48. Schwingshackl L, Hoffmann G. Adherence to Mediterranean diet and risk of cancer: An updated systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cancer Med*. 2015 Dec 1;4(12):1933–47.
49. Gill CIR, Boyd A, McDermott E, McCann M, Servili M, Selvaggini R, et al. Potential anti-cancer effects of virgin olive oil phenols on colorectal carcinogenesis models in vitro. *Int J Cancer*. 2005 Oct 20;117(1):1–7.
50. Angeloni C, Malaguti M, Barbalace MC, Hrelia S. Bioactivity of olive oil phenols in neuroprotection. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2017.
51. Schaffer S, Podstawa M, Visioli F, Bogani P, Müller WE, Eckert GP. Hydroxytyrosol-rich olive mill wastewater extract protects brain cells in vitro and ex vivo. *J Agric Food Chem*. 2007 Jun 27;55(13):5043–9.
52. Rigacci S, Guidotti V, Bucciandini M, Parri M, Nediani C, Cerbai E, et al. Oleuropein aglycon prevents cytotoxic amyloid aggregation of human amylin. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2010 Aug;21(8):726–35.
53. Martínez-González MÁ, De La Fuente-Arrillaga C, Nunez-Cordoba JM, Basterra-Gortari FJ, Beunza JJ, Vazquez Z, et al. Adherence to Mediterranean diet and risk of developing diabetes: Prospective cohort study. *BMJ*. 2008 Jun 14;336(7657):1348–51.
54. Salas-Salvadó J, Bulló M, Estruch R, Ros E, Covas MI, Ibarrola-Jurado N, et al. Prevention of Diabetes With Mediterranean Diets A Subgroup Analysis of a Randomized Trial [Internet]. 2014. Available from: www.annals.org
55. Fitó M, Cladellas M, de la Torre R, Martí J, Muñoz D, Schröder H, et al. Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: A randomized, crossover, controlled trial. *Eur J Clin Nutr*. 2008;62(4):570–4.
56. Ruíz-Gutiérrez V, Muriana FJG, Guerrero A, Cert AM, Villar J. Plasma lipids, erythrocyte membrane lipids and blood pressure of hypertensive women after

- ingestion of dietary oleic acid from two different sources. Vol. 14, *Journal of Hypertension*. 1996. p. 1483–90.
57. Covas MI, Nyyssönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJF, Kiesewetter H, et al. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors [Internet]. Article in *Annals of Internal Medicine*. 2006. Available from: www.annals.org
 58. Scaccini C, Nardini M, Aquino MD, Gentili V, Felice M Di, Tomassini G. Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasma and lipoprotein fractions. *Journal Lipid Research* [Internet]. 1992;33(5):627–33. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)41427-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2275(20)41427-0)
 59. Jemai H, Feki AEL, Sayadi S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J Agric Food Chem*. 2009;57(19):8798–804.
 60. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. 2006;2:161–72.
 61. Choo HJ, Kim JH, Kwon OB, Lee CS, Mun JY, Han SS, et al. Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia*. 2006 Apr;49(4):784–91.
 62. Hao J, Shen W, Yu G, Jia H, Li X, Feng Z, et al. Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2010 Jul;21(7):634–44.
 63. Kerimi A, Nyambe-Silavwe H, Pyner A, Oladele E, Gauer JS, Stevens Y, et al. Nutritional implications of olives and sugar: attenuation of post-prandial glucose spikes in healthy volunteers by inhibition of sucrose hydrolysis and glucose transport by oleuropein. *Eur J Nutr*. 2019 Apr 1;58(3):1315–30.
 64. Lucas L, Russell A, Keast R. Molecular Mechanisms of Inflammation. Anti-Inflammatory Benefits of Virgin Olive Oil and the Phenolic Compound Oleocanthal. Vol. 17, *Current Pharmaceutical Design*. 2011.
 65. Beauchamp GK, Keast RSJ, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, et al. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*. 2005 Sep 1;437(7055):45–6.
 66. Woodcock SR, Bonacci G, Gelhaus SL, Schopfer FJ. Nitrate fatty acids: Synthesis and measurement. Vol. 59, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc.; 2013. p. 14–26.
 67. Trostchansky A, Rubbo H. Nitrate fatty acids: Mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties. Vol. 44, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc.; 2008. p. 1887–96.
 68. Bonacci G, Baker PRS, Salvatore SR, Shores D, Khoo NKH, Koenitzer JR, et al. Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration. *Journal of Biological Chemistry*. 2012 Dec 28;287(53):44071–82.
 69. Fazzari M, Trostchansky A, Schopfer FJ, Salvatore SR, Sánchez-Calvo B, Vitturi D, et al. Olives and olive oil are sources of electrophilic fatty acid nitroalkenes. *PLoS One*. 2014 Jan 14;9(1).
 70. Mata-Pérez C, Sánchez-Calvo B, Padilla MN, Begara-Morales JC, Luque F, Melguizo M, et al. Nitro-fatty acids in plant signaling: Nitro-linolenic acid induces the molecular chaperone network in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2016 Feb 1;170(2):686–701.

71. Mata-Pérez C, Sánchez-Calvo B, Padilla MN, Begara-Morales JC, Valderrama R, Corpas FJ, et al. Nitro-fatty acids in plant signaling: New key mediators of nitric oxide metabolism. Vol. 11, *Redox Biology*. Elsevier B.V.; 2017. p. 554–61.
72. Hansen AL, Buchan GJ, Rühl M, Mukai K, Salvatore SR, Ogawa E, et al. Nitro-fatty acids are formed in response to virus infection and are potent inhibitors of STING palmitoylation and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Aug 14;115(33):E7768–75.
73. Woodcock SR, Salvatore SR, Freeman BA, Schopfer FJ. Synthesis of 9- and 12-nitro conjugated linoleic acid: Regiospecific isomers of naturally occurring conjugated nitrodienes. *Tetrahedron Lett*. 2021 Sep 28;81.
74. Woodcock SR, Marwitz AJV, Bruno P, Branchaud BP. Synthesis of nitrolipids. All four possible diastereomers of nitrooleic acids: (E)- and (Z)-, 9- and 10-nitro-octadec-9-enoic acids. *Org Lett*. 2006 Aug 31;8(18):3931–4.
75. Buchan GJ, Bonacci G, Fazzari M, Salvatore SR, Gelhaus Wendell S. Nitro-fatty acid formation and metabolism. Vol. 79, *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. Academic Press Inc.; 2018. p. 38–44.
76. Augusto O, Bonini MG, Amanso AM, Linares E, Santos CCX, De Menezes SL. NITROGEN DIOXIDE AND CARBONATE RADICAL ANION: TWO EMERGING RADICALS IN BIOLOGY. 2002.
77. Schopfer FJ, Khoo NKH. Nitro-Fatty Acid Logistics: Formation, Biodistribution, Signaling, and Pharmacology. *Trends in Endocrinology and Metabolism* [Internet]. 2019;30(8):505–19. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.04.009>
78. Trostchansky A, Rubbo H. Nitrated fatty acids: Mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties. Vol. 44, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc.; 2008. p. 1887–96.
79. Mastrogiovanni M. Estudio de la nitración de lípidos en la lipoproteína de baja densidad. [Montevideo]: Facultad de Medicina ;
80. Aris A, Pryor WA. The Reaction of Low Levels of Nitrogen Dioxide with Methyl Linoleate in the Presence and Absence of Oxygen. 1994.
81. Bonacci G, Baker PRS, Salvatore SR, Shores D, Khoo NKH, Koenitzer JR, et al. Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration. *Journal of Biological Chemistry*. 2012 Dec 28;287(53):44071–82.
82. Lundberg JO, Carlström M, Weitzberg E. Metabolic Effects of Dietary Nitrate in Health and Disease. Vol. 28, *Cell Metabolism*. Cell Press; 2018. p. 9–22.
83. Duncan C, Dougall H, Johnston P. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of diet. *Nature Medicine* . 1995;1:546–51.
84. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. Vol. 7, *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008. p. 156–67.
85. Vitturi DA, Minarrieta L, Salvatore SR, Postlethwait EM, Fazzari M, Ferrer-Sueta G, et al. Convergence of biological nitration and nitrosation via symmetrical nitrous anhydride. *Nat Chem Biol*. 2015 Jul 20;11(7):504–10.
86. Woodcock SR, Salvatore SR, Bonacci G, Schopfer FJ, Freeman BA. Biomimetic nitration of conjugated linoleic acid: Formation and characterization of naturally occurring conjugated nitrodienes. *Journal of Organic Chemistry*. 2014 Jan 3;79(1):25–33.

87. Sánchez-Calvo B, Mastrogiovanni M, Santos M, Petingi S, Conde-Innamorato P, Arias-Sibillotte M, et al. Detection of Nitro-Conjugated Linoleic Acid and Nitro-oleic Acid in Virgin Olive Oil under Gastric Conditions: Relationship to Cultivar, Fruit Ripening, and Polyphenol Content. *ACS Food Science and Technology*. 2022;2(4):673–81.
88. Schopfer FJ, Vitturi DA, Jorkasky DK, Freeman BA. Nitro-fatty acids: New drug candidates for chronic inflammatory and fibrotic diseases. Vol. 79, *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. Academic Press Inc.; 2018. p. 31–7.
89. Bates DJP, Lively MO, Gorczynski MJ, King SB, Townsend AJ, Morrow CS. Noncatalytic interactions between glutathione S-transferases and nitroalkene fatty acids modulate nitroalkene-mediated activation of peroxisomal proliferator-activated receptor γ . *Biochemistry*. 2009 May 19;48(19):4159–69.
90. Cui T, Schopfer FJ, Zhang J, Chen K, Ichikawa T, Baker PRS, et al. Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Nov 24;281(47):35686–98.
91. Villacorta L, Minarrieta L, Salvatore SR, Khoo NK, Rom O, Gao Z, et al. In situ generation, metabolism and immunomodulatory signaling actions of nitro-conjugated linoleic acid in a murine model of inflammation. *Redox Biol*. 2018 May 1;15:522–31.
92. Khoo NKH, Rudolph V, Cole MP, Golin-Bisello F, Schopfer FJ, Woodcock SR, et al. Activation of vascular endothelial nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 expression by electrophilic nitro-fatty acids. *Free Radic Biol Med*. 2010 Jan 15;48(2):230–9.
93. Liu Y, Jia Z, Liu S, Downton M, Liu G, Du Y, et al. Combined losartan and nitro-oleic acid remarkably improves diabetic nephropathy in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2013;305:1555–62. Available from: <http://www.ajprenal.org>
94. Liu S, Jia Z, Zhou L, Liu Y, Ling H, Zhou SF, et al. Nitro-oleic acid protects against adriamycin-induced nephropathy in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2013;305:1533–41. Available from: <http://www.ajprenal.org>
95. Khoo NKH, Fazzari M, Chartoumpekis D V., Li L, Guimaraes DA, Arteel GE, et al. Electrophilic nitro-oleic acid reverses obesity-induced hepatic steatosis. *Redox Biol*. 2019 Apr 1;22.
96. Sánchez-Calvo B, Cassina A, Mastrogiovanni M, Santos M, Trias E, Kelley EE, et al. Olive oil-derived nitro-fatty acids: protection of mitochondrial function in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2021 Aug 1;94.
97. Piesche M, Roos J, Kühn B, Fettel J, Hellmuth N, Brat C, et al. The Emerging Therapeutic Potential of Nitro Fatty Acids and Other Michael Acceptor-Containing Drugs for the Treatment of Inflammation and Cancer. Vol. 11, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
98. Chen Woodcock CS, Huang Y, Woodcock SR, Salvatore SR, Singh B, Golin-Bisello F, et al. Nitro-fatty acid inhibition of triple-negative breast cancer cell viability, migration, invasion, and tumor growth. *Journal of Biological Chemistry*. 2018 Jan 26;293(4):1120–37.
99. Feippe A, Ibáñez F, Altier GP. Fruit Ripening Stage Effect on the Fatty Acid Profile of “Arbequina” and “Picual” Olives in Uruguay.

100. Bonacci G, Baker PRS, Salvatore SR, Shores D, Khoo NKH, Koenitzer JR, et al. Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration. *Journal of Biological Chemistry*. 2012 Dec 28;287(53):44071–82.
101. McDonald S, Prenzler PD, Antolovich M, Robards K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chem*. 2001;73(1):73–84.
102. Trostchansky A, Mastrogiovanni M, Miquel E, Rodríguez-Bottero S, Martínez-Palma L, Cassina P, et al. Profile of arachidonic acid-derived inflammatory markers and its modulation by nitro-oleic acid in an inherited model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front Mol Neurosci*. 2018 Apr 30;11.
103. Bonacci G, Baker PRS, Salvatore SR, Shores D, Khoo NKH, Koenitzer JR, et al. Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration. *Journal of Biological Chemistry*. 2012 Dec 28;287(53):44071–82.
104. Schopfer FJ, Batthyany C, Baker PRS, Bonacci G, Cole MP, Rudolph V, et al. Detection and quantification of protein adduction by electrophilic fatty acids: mitochondrial generation of fatty acid nitroalkene derivatives. *Free Radic Biol Med*. 2009 May 1;46(9):1250–9.
105. Mastrogiovanni M, Trostchansky A, Rubbo H. Fatty acid nitration in human low-density lipoprotein. Vol. 679, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Academic Press Inc.; 2020.
106. Wong SHY, Knight JA, Hopper SM, Zaharia O, Leach CN, Sunderman FW. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem*. 1987;33(2):214–20.
107. Sánchez-Calvo B, Mastrogiovanni M, Santos M, Petingi S, Conde-Innamorato P, Arias-Sibillotte M, et al. Detection of Nitro-Conjugated Linoleic Acid and Nitro-oleic Acid in Virgin Olive Oil under Gastric Conditions: Relationship to Cultivar, Fruit Ripening, and Polyphenol Content. *ACS Food Science and Technology*. 2022;2(4):673–81.
108. Chin SF, Liu W, Storkson JM, Ha YL, Pariza' MW. Dietary Sources of Conjugated Dienoic Isomers of Linoleic Acid, a Newly Recognized Class of Anticarcinogens. Vol. 5, *JOURNAL OF FOOD COMPOSITION AND ANALYSIS*. 1992.
109. Bayram B, Esatbeyoglu T, Schulze N, Ozcelik B, Frank J, Rimbach G. Comprehensive Analysis of Polyphenols in 55 Extra Virgin Olive Oils by HPLC-ECD and Their Correlation with Antioxidant Activities. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2012 Dec 1;67(4):326–36.
110. Soler-Rivas C, Espín JC, Wichers HJ. Review Oleuropein and related compounds.
111. Ceci LN, Mattar SB, Carelli AA. Chemical quality and oxidative stability of extra virgin olive oils from San Juan province (Argentina). *Food Research International*. 2017 Oct 1;100:764–70.
112. Ayto J, Mailer R, Deirdre A, Conlan D. Quality and oxidative stability of Australian olive oil according to harvest date and irrigation. 2006;14(2007):138–56.
113. Covas MI, Ruiz-Gutiérrez V, de la Torre R, Kafatos A, Lamuela-Raventós RM, Osada J, et al. Minor Components of Olive Oil: Evidence to Date of Health Benefits in Humans. 2006;20–30. Available from: https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-abstract/64/suppl_4/S20/1918903
114. Romani A, Pine / P, Mulinacci / N, Galardi / C, Vincieri FF, Liberatore / L, et al. HPLC and HRGC Analyses of Polyphenols and Secoiridoid in Olive Oil.

115. Carrasco-Pancorbo A, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Gallina-Toschi T, Fernández-Gutiérrez A. Analytical determination of polyphenols in olive oils. Vol. 28, *Journal of Separation Science*. 2005. p. 837–58.
116. Gilbert-López B, Valencia-Reyes ZL, Yufra-Picardo VM, García-Reyes JF, Ramos-Martos N, Molina-Díaz A. Determination of Polyphenols in Commercial Extra Virgin Olive Oils from Different Origins (Mediterranean and South American Countries) by Liquid Chromatography–Electrospray Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Food Anal Methods*. 2014;7(9):1824–33.
117. Preedy V, Ross R. *Olives and Olive oil in health and disease prevention*. Primera. 2010.