



Original/*Alimentos funcionales*

Efecto hipotensor de un extracto de componentes bioactivos de hojas de olivo: estudio clínico preliminar

Carmen Cabrera-Vique¹, Miguel Navarro-Alarcón¹, Carlos Rodríguez Martínez² y Juristo Fonollá-Joya²

¹Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. ²Laboratorio de Nutrición. Biosearch Life. Granada. España.

Resumen

Objetivo: evaluar el posible efecto hipotensor en sujetos pre-hipertensos e hipertensos, de un extracto de hoja de olivo (EHO) estandarizado al 15% (m/m) en oleouropeína y con un contenido medio del 10% (m/m) en ácidos triterpénicos y del 1% (m/m) en hidroxitirosol. Asimismo, se ha valorado su acción sobre el estatus antioxidante y el perfil lipídico sanguíneos.

Material y métodos: se ha llevado a cabo un ensayo de intervención en humanos con administración de 1.600 mg de extracto/día. Los parámetros evaluados han sido presión sistólica y diastólica, retardo de la oxidación del colesterol LDL (lag time) y niveles sanguíneos de óxido nítrico (NO), malondialdehído (MDA), capacidad antioxidante (CAO), perfil lipídico, glucosa, transaminasas y creatinina.

Resultados: se observó en todos los sujetos una disminución estadísticamente significativa de la presión sistólica y diastólica, y un aumento de los niveles de NO ($P < 0,050$). En los sujetos con presión sistólica más elevada también se redujo significativamente su valor tras la intervención ($P = 0,002$). El "lag time" de las LDL aumentó significativamente ($P = 0,047$), y en todos los sujetos los niveles de colesterol (CHO) se redujeron significativamente. Los niveles de colesterol LDL, triglicéridos (TG) y del índice CHO/colesterol HDL disminuyeron con tendencia a la significancia ($P = 0,076$; $P = 0,059$; $P = 0,056$; respectivamente).

Conclusión: este estudio, aunque preliminar, pone de relieve por primera vez la influencia positiva del EHO ensayado en la regulación de la hipertensión así como en la velocidad de oxidación de las LDL y en el perfil lipídico sanguíneo.

(Nutr Hosp. 2015;32:242-249)

DOI:10.3305/nh.2015.32.1.8644

Palabras clave: Extracto de hojas de olivo. Oleouropeína. Ácidos triterpénicos. Hidroxitirosol. Efecto hipotensor.

HYPOTENSIVE EFFECT OF AN EXTRACT OF BIOACTIVE COMPOUNDS OF OLIVE LEAVES: PRELIMINARY CLINICAL STUDY

Abstract

Objective: to evaluate the possible hypotensive effect in pre-hypertensive and hypertensive subjects of an olive leaf extract (OLE) standardized to 15% (w/w) in oleuropein, and with a 10% (w/w) mean content of triterpenic acids and 1% (w/w) in hydroxytyrosol. Moreover, the possible effects on the blood antioxidant status and lipid profile have been also evaluated.

Materials and methods: this interventional study has been performed in human volunteers, to whom 1600 mg OLE/days, was administered. The analyzed parameters at the beginning and end of the study were diastolic and systolic pressure, delay in the LDL-cholesterol oxidation "lag time" and blood levels of nitric oxide (NO), malonic dialdehyde (MDA), antioxidant capacity (AOC) lipid profile, glucose, transaminases and creatinine.

Results: a decrease in the diastolic and systolic pressure, and an increase in the NO values all statistically significant (CHO) for all volunteers, was found. In volunteers with higher systolic pressure their levels were also significantly diminished after the intervention trial ($P = 0,002$). The LDL lag time increased significantly ($P = 0,047$). Additionally, in all volunteers CHO levels were significantly decreased, and those of LDL cholesterol, triglycerides (TG) and the CHO/HDL cholesterol ratio were diminished with a tendency to the significance ($P = 0,076$; $P = 0,059$; $P = 0,056$; respectively).

Conclusions: this preliminary study reports by the first time the positive influence of the OLE assayed in the regulation of the hypertension, LDL lag time and blood lipid profile. Therefore, further studies are of great interest.

(Nutr Hosp. 2015;32:242-249)

DOI:10.3305/nh.2015.32.1.8644

Key words: Extract of olive leaves. Oleuropein. Triterpenic acids. Hydroxytyrosol. Hypotensive effect.

Correspondencia: Miguel Navarro-Alarcón.
Departamento de Nutrición y Bromatología.
Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
18071 Granada (España).
E-mail: nalarcon@ugr.es

Recibido: 8-I-2015.

Aceptado: 8-IV-2015.

Abreviaturas

GOT: Glutámico oxalacético transaminasa.
GPT: Glutámico pirúvico transaminasa.
EHO: Extracto de hojas de olivo.
CHO: Colesterol total.
ECV: Enfermedades cardiovasculares.
 γ -GT: Gamma glutamiltransferasa.
HDL: Lipoproteínas de alta densidad.
IMC: Índice de masa corporal.
LDL: Lipoproteínas de baja densidad.
TG: Triglicéridos.
CAO: Capacidad antioxidante.
NO: Óxido nítrico.
HT: Hidroxitirosol.
Lag time: Tiempo de retardo de oxidación de las LDL.
CV: Cardiovascular.
AO: Antioxidante.

Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud¹ las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en todo el mundo y no sólo en países desarrollados, ya que un 80% de los infartos se producen en países de economías medias o bajas. Entre las ECV se incluye la cardiopatía coronaria, enfermedades cerebrovasculares, arteriopatías, trombosis venosas, embolias, etc. Los estudios epidemiológicos de los últimos 50 años han identificado como factores de riesgo, la hipertensión, niveles elevados en sangre de colesterol (CHO), triglicéridos (TG), homocisteína, LDL-colesterol (LDL) y ciertos factores de coagulación; también bajos niveles de HDL-colesterol, hiperglucemia, tabaquismo, obesidad y síndrome metabólico, entre otros².

Una dieta rica en antioxidantes (AO) que previenen la oxidación del colesterol LDL se ha relacionado con una disminución del riesgo cardiovascular (CV), tal como indican diversos estudios epidemiológicos y de intervención de humanos³⁻⁷. El elevado aporte de AO es uno de los argumentos más firmes para explicar el efecto beneficioso de la dieta mediterránea en las ECV⁸. En este sentido, el aceite de oliva virgen es la principal fuente de grasa alimentaria en los países mediterráneos y su efecto positivo frente a las ECV se atribuye tanto al adecuado perfil en ácidos grasos como a la elevada presencia de AO como la oleuropeína y su derivado hidroxitirosol (HT), tirosol, ácido protocatéquico, ácido caféico y luteolina, entre otros^{3,8-9}. También presentan especial interés los ácidos triterpénicos siendo los más comunes los ácidos ursólico, morónico, morólico, betulínico y el 3,4-secoolean-18-enedioico así como el oleanólico y maslínico⁹⁻¹². Algunos estudios han demostrado que estos compuestos podrían poseer un efecto vasorelajante en el endotelio arterial¹²⁻¹³.

La hoja del olivo, también ha despertado un notable interés en la actualidad por su elevado contenido en AO, similares a los del aceite¹⁴⁻¹⁵. Entre los compues-

tos identificados destacan oleuropeína, HT, tirosol, rutina, luteolina y verbascósido¹⁴⁻¹⁶. Recientes estudios han demostrado que las hojas de olivo presentan efectos antihipertensivos¹⁶⁻¹⁷ además de efectos antiinflamatorios, hipoglucémicos, antimicrobianos e hipocolesterolémicos¹⁸⁻¹⁹, todos ellos relacionados en gran medida, con su potencial AO.

El principal objetivo del presente estudio ha sido evaluar mediante un ensayo clínico con voluntarios humanos pre- e hipertensos, el posible efecto hipotensor de un extracto de hojas de olivo (EHO) estandarizado al 15% (m/m) en oleuropeína y con un contenido medio del 10% (m/m) en ácidos triterpénicos y del 1% (m/m) en HT. Los parámetros evaluados han sido presión sistólica y diastólica, retardo de la oxidación del colesterol LDL y las determinaciones sanguíneas de óxido nítrico (NO), malondialdehído (MDA), capacidad antioxidante del plasma (CAO), perfil lipídico, glucosa, transaminasas y creatinina.

Material y métodos

Preparación del producto ensayado

Las cápsulas del EHO fueron aportadas por la empresa Biosearch Life (Granada, España), con un contenido estandarizado del 15% (m/m) en oleuropeína y con un contenido medio del 10% (m/m) en ácidos triterpénicos y del 1% (m/m) en HT. Cada cápsula contenía 400 mg del producto, administrándose durante el desarrollo del estudio 4 cápsulas/día, 2 en cada una de las comidas principales (almuerzo y cena), lo que constituyó una dosis diaria de 1.600 mg del extracto.

Sujetos

La muestra estuvo constituida por 10 voluntarios pre-hipertensos o hipertensos cuya selección se hizo en base a los niveles de tensión arterial sistólica (entre 120 a <125 y \geq 125 mm Hg, respectivamente) y tensión arterial diastólica (80 a <85 y \geq 85 mm Hg, respectivamente).

Los sujetos manifestaron su aceptación voluntaria a participar en el estudio. Los criterios de exclusión fueron padecer una enfermedad grave, estar tomando medicación que afecte a los valores de tensión arterial (antihipertensivos, antiinflamatorios, diuréticos, etc.) y el no mostrar gran interés en el cumplimiento de las normas del estudio.

Los voluntarios recibieron información detallada oral y escrita sobre el estudio, incluyendo un boletín informativo y un formulario de consentimiento individual. También se les instruyó para no cambiar sus hábitos de vida (dieta y ejercicio físico) durante los 28 días de duración.

El estudio fue desarrollado de acuerdo con la Declaración de Helsinki, previa aprobación del protocolo

por el Comité de Ética de la Investigación Biomédica de la Provincia de Granada, España.

Diseño del estudio

Se solicitó a los voluntarios que acudieran en ayunas a la Unidad Metabólica de Biosearch Life los días 0 y 28 del estudio para la extracción de las muestras de sangre. Las muestras fueron tomadas por un asistente técnico sanitario contratado para tal fin. En total se recogieron 2 muestras de sangre de 17,5 mL de cada voluntario que fueron centrifugadas a 3.500 g durante 10 min, para separar los componentes celulares del plasma, y congeladas a una temperatura de -80°C para poder analizarlas simultáneamente al final del estudio, evitando así cualquier sesgo metodológico. Sólo los parámetros de seguridad se midieron el mismo día en que se tomaron las muestras.

Los días posteriores a las extracciones sanguíneas se realizó la medida de tensión arterial. Para tal fin los voluntarios debían acudir a la Unidad Metabólica sin consumir café o té ni fumar, aunque sí podían desayunar. Antes de la medida permanecían en dicha unidad sentados y relajados durante al menos 10 minutos. La medida se realizó con un equipo Medisana 3MAM (Medisana AG, Meckenheim, Alemania) en el brazo izquierdo, apoyado en una mesa con la palma de la mano hacia arriba y con los dos pies apoyados en el suelo. Durante la medida los voluntarios debían permanecer en absoluto silencio. Tras 10 minutos de descanso se repitió el proceso y el dato que se utilizó fue la media de las 2 medidas. Se comprobó que no hubiera una diferencia entre ambas superior al 5%.

El análisis de las muestras se realizó en el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Granada (España) y en un Laboratorio de Referencia (Reference Laboratory S. A., Barcelona). Las pruebas llevadas a cabo fueron: CHO en plasma, colesterol HDL, colesterol LDL, TG, creatinina, glutámico oxalacético transaminasa (GOT), glutámico pirúvico transaminasa (GPT) y gamma glutamiltransferasa (γ -GT) utilizando kits comerciales de enzimas colorimétricas (Biosystems S.A., Barcelona, España), y un espectrofotómetro Spectronic Helios Gamma (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). El colesterol LDL en suero (mg/dL) se obtuvo utilizando la ecuación de Friedewald y cols.²⁰

La CAO se determinó usando el TROLOX como estándar según el método descrito por Miller y cols.²¹. Las concentraciones de MDA se determinaron por HPLC según la técnica analítica previamente optimizada por Fukunaga y cols.²² y que está basada en la reacción del ácido tiobarbitúrico y separación en fase reversa.

Para medir el tiempo de retardo de oxidación del LDL “lag time”, se hizo un “pool” con los plasmas de los voluntarios y se midió según la técnica desarrollada por Esterbauer y cols.²³. Para ello se tomaron 50 μ g

de LDL, se añadieron a 1 mL de PBS y se incubaron con CuSO_4 10 μM durante varias horas a 37°C. La formación de los dienos conjugados fue continuamente controlada mediante la medida del aumento de absorbancia a 234 nm cada 10 min. Los niveles plasmáticos de NO fueron determinados mediante kits comerciales de Oxford Biomedical Research, Inc. (Oxford, MI, USA).

Tratamiento estadístico de los datos

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el paquete de software estadístico SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Se aplicó el test de *t* de Student pareado para la evaluación de los datos obtenidos. Valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados y discusión

La hipótesis de partida del presente estudio era demostrar que el EHO rico en los 3 compuestos bioactivos estudiados (oleoeuropeína, ácidos triterpénicos e HT) presenta un efecto hipotensor. Los resultados obtenidos en el estudio de intervención desarrollado, sí manifiestan un efecto hipotensor con descenso de la tensión sistólica y diastólica y un aumento de los niveles de NO. Adicionalmente, se observa un retraso en el “lag time” de las LDL y por tanto del riesgo aterogénico así como una tendencia al descenso de los valores plasmáticos de LDL y TG, y del índice de riesgo cardiovascular CHO/HDL. Todos estos hallazgos, se manifiestan sin modificación negativa de los parámetros relacionados con la seguridad, lo que podría permitir la continuación del mismo con una población muestral considerablemente más elevada y con períodos de intervención superiores, e incluso con el diseño de alimentos funcionales basados en este extracto.

Estudio del efecto hipotensor

El consumo de 1.600 mg/día del EHO en dos tomas durante la comida y la cena redujo significativamente la presión sistólica en un 8,5% y la diastólica en un 9,9%, aproximadamente (Tabla I). Si se seleccionan los valores de los voluntarios con presión sistólica de inicio iguales o superiores a 125 mm de Hg (grupo B) la bajada es del 12% y es significativa. Sin embargo cuando seleccionamos los voluntarios con presión diastólica de inicio igual o superior a 85 mm de Hg (grupo C), la bajada tras la intervención fue superior al 15% aunque no llegó a la significancia estadística debido, seguramente, a que se trata de un muestra poblacional baja ($P=0,077$). Los datos aparecen recopilados en la Tabla I.

Tabla I

Valores de tensión sistólica y diastólica y de óxido nítrico (NO) antes y después de la administración de un extracto de hoja de olivo (EHO) estandarizado al 15% (m/m) en oleoeuropeína y con un contenido medio del 10% (m/m) en ácidos triterpénicos y del 1% (m/m) en hidroxitirosol

Parámetro	Grupo de estudio ^a	Inicio estudio (media±SD)	Fin estudio (media±SD)	P
Tensión sistólica (mm Hg)	A	133,2±3,4	122,0±1,8	0,011
	B	138±3,1	121,9±2,6	0,002
Tensión diastólica (mm Hg)	A	80,9±2,1	72,9±2,1	0,026
	C	87,0±1,0	73,4±5,1	0,077
NO (μM)	A	18,3±3,0	28,0±4,8	0,035
	F	8,7±2,2	20,9±7,4	0,122
	G	24,8±2,3	32,7±6,0	0,213

^aA: todos los voluntarios, n=10. B: voluntarios con tensión sistólica ≥125 mm Hg, n=7. C: voluntarios con tensión diastólica ≥85 mm Hg, n=4. F: voluntarios con niveles plasmáticos de NO ≤20 μM, n=4. G: voluntarios con valores plasmáticos de NO >20 μM, n=6.

Por el contrario, y seguramente relacionado con estos resultados hubo un incremento significativo (52,65%) de los valores de NO que llega a ser superior al 140% cuando seleccionamos a los voluntarios con menor valor de NO en sangre al inicio del estudio, y superior al 32% cuando se seleccionan los que tenían valores más altos. Por la misma razón previamente comentada creemos que no hubo significancia.

Moreno-Luna y cols.²⁴ investigaron en un grupo de 24 mujeres jóvenes con valores pre-hipertensivos que el consumo de aceite de oliva rico en compuestos fenólicos produjo un marcado descenso tanto en la presión sistólica como diastólica; disminuciones de presión sanguínea también han sido observadas tras la ingesta de aceite de oliva en sujetos normotensos²⁵⁻²⁶ e hipertensos²⁷. Aunque en estos tres estudios referenciados el efecto hipotensor se atribuye al ácido oleico presente en el aceite de oliva virgen extra, estos investigadores concluyen diciendo que éste no es el único componente que produce efectos hipotensores, y que los compuestos fenólicos minoritarios del olivo, así como sus derivados, juegan un papel muy importante en el impacto beneficioso sobre la salud. Muchos de estos beneficios contribuyen a mejorar factores CV que reducen la tensión arterial mediante diferentes mecanismos, y que a su vez mejoran globalmente la ECV, lo que se asocia con lo apreciado en el presente trabajo relativo al aumento de los niveles de NO en todos los voluntarios, como indicador de vasodilatación.

Contrariamente a lo apreciado en nuestro estudio, otros investigadores como De Bock y cols.²⁸ no observan que el consumo diario de cápsulas de EHO, con un aporte diario de 51,1 mg de oleoeuropeína y 9,7 mg de HT tenga efecto alguno en la presión arterial ambulatoria ni en el perfil lipídico de 46 varones con sobrepeso (IMC comprendido entre 25 y 30 kg/m²), durante un período de intervención de 12 semanas. A diferencia de este trabajo, el efecto hipotensor descrito en nuestro

estudio puede estar relacionado con el hecho de que la dosis diaria administrada fue considerablemente más elevada (240 mg de oleoeuropeína, 160 mg de ácidos triterpénicos y 16 mg de HT) además de incluir sujetos pre- e hipertensos.

Sin embargo, en otro estudio realizado en ratas con hipertensión inducida, la administración posterior de un EHO no produjo una reducción en los valores de tensión arterial²⁹. Dekanski y cols.¹⁷ observaron que una elevada dosis de EHO (2.000 mg/kg peso) administrada por vía intragástrica producía en ratas Wistar hipertensas un descenso significativo en la tensión arterial, y un aumento de la peroxidación lipídica plasmática y de la actividad de la enzima superóxido dismutasa.

Como hemos indicado anteriormente los niveles plasmáticos de NO se incrementaron significativamente al finalizar el estudio en todos los voluntarios (Tabla I). En otros estudios se ha evidenciado el efecto vasodilatador del NO y su consecuente bajada de tensión arterial^{13,30}, efecto a veces asociado a la acción de los ácidos triterpénicos¹². Rodríguez- Rodríguez y cols.¹³ realizaron un estudio en el que se evidenciaba que el ácido triterpénico oleanólico, aislado del orujo de aceite de oliva era capaz de relajar, de una manera dosis-dependiente, las contracciones inducidas por fenilefrina en los anillos aórticos de ratas con endotelio funcional, indicándose que el mecanismo de acción llevado a cabo por este ácido era la producción endotelial de NO.

Teniendo en cuenta lo indicado con anterioridad, pensamos que el efecto hipotensor que presenta el EHO ensayado es dosis-dependiente, por un lado, y por otro, podría no ser específicamente intrínseco a los componentes bioactivos presentes en el mismo (oleoeuropeína, ácidos triterpénicos e HT), sino que adicionalmente podría también deberse a la acción sobre otros parámetros bioquímicos asociados al riesgo CV.

Tabla II

Valores plasmáticos de malondialdehído, capacidad antioxidante y tiempo de retardo de oxidación de las LDL (lag time) antes y después de la administración de un extracto de hoja de olivo estandarizado al 15% (m/m) en oleouropeína y con un contenido medio del 10% (m/m) en ácidos triterpénicos y del 1% (m/m) en hidroxitirosol

Parámetro	Grupo de estudio ^a	Inicio estudio (media±SD)	Fin estudio (media±SD)	P
Malondialdehído (μM/L)	A	2,26±0,34	1,56±0,31	0,201
capacidad antioxidante ^b	A	263,40±25,20	261,00±8,80	0,936
Lag time (minutos)	A ^c	102,70±1,40	112,70±3,90	0,047

^aA: Todos los voluntarios, n=10. ^b Expresada como equivalentes de TROLOX. ^c Datos de 6 repeticiones de un "pool" del plasma de todos los voluntarios.

Estudio de oxidación

En relación a los valores referentes al estudio de oxidación sólo hubo una mejora significativa con aumento de los valores del tiempo de retardo de la oxidación de las LDL "lag time" (Tabla II), permaneciendo los valores de CAO y MDA inalterados de forma significativa ($P>0,05$), tras la intervención con el EHO en los voluntarios. Sin embargo en un estudio previo de absorción en humanos tras el consumo de una dosis oral simple (2,5 mg/kg/día) de un suplemento purificado de HT proveniente de aceite de oliva, no se observaron cambios en el lag time de las LDL ni tampoco en la CAO ni en los niveles de MDA³¹. Las diferencias con los resultados encontrados en nuestro ensayo se fundamentan con la presencia adicional al HT en el EHO usado por nosotros de otros AO tales como la oleouropeína y los ácidos triterpénicos a elevadas dosis, así como, y no menos importante, a que la intervención se prolongó durante 4 semanas. Este retraso en el lag time de las LDL, las protegería frente a la oxidación y en definitiva de su capacidad de inicio de un proceso aterogénico.

Uno de los efectos más estudiados de los compuestos fenólicos del olivo y sus productos derivados es su potente acción AO sobre las moléculas de colesterol LDL, las cuales tienen como es sabido un fuerte carácter aterogénico. Otros investigadores como De la Torre-Carbot y cols.³² observaron que la administración de dos aceites de oliva (virgen y refinado), con diferentes concentraciones de compuestos fenólicos, producía cambios significativos positivos en los marcadores de oxidación de las LDL, protegiéndolas frente a ésta. En especial, el HT es capaz de unirse a las moléculas de LDL ejerciendo su CAO y reduciendo así el daño que estas moléculas oxidadas causarían en la capa íntima del endotelio arterial, como paso previo en el inicio de un proceso de aterogénesis. Además estos fenoles también tienen CAO sobre otros fenoles provenientes de otras fuentes y que estaban previamente unidos al LDL. Estos resultados son consistentes con los indicados por Covas y cols.³³ demostrando que el consumo diario de un aceite de oliva con una alta concentración

de fenoles reducía el daño oxidativo de los lípidos, como también hemos encontrado en nuestro trabajo.

Por el contrario en el presente estudio, el consumo del EO no modifica significativamente los valores de otros marcadores de oxidación como son los de MAD ni los de CAO. De manera semejante³⁴ realizaron un estudio *in vivo* con el objetivo de observar las posibles modificaciones en diferentes marcadores de oxidación, tras una ingesta de 18 mg/día de compuestos fenólicos procedentes del consumo de aceite de oliva durante 3 semanas. El estudio concluyó que no se observaban modificaciones significativas en ninguno de los parámetros analizados. Estos autores indican que a pesar de que los fenoles del aceite de oliva parecían absorberse bien, su contenido en éste con potencial AO en la dieta mediterránea, es probablemente demasiado bajo para producir un efecto medible sobre oxidación de LDL u otros marcadores de oxidación en los seres humanos. Ante esta situación estos autores concluyen que no existían hasta ese momento evidencias de que el consumo de fenoles en las cantidades proporcionadas por el aceite de oliva en la dieta protegiese contra la modificación oxidativa de las LDL en un grado importante³⁴. Por el contrario otros investigadores han descrito que la oleouropeína de la aceituna presenta efectos beneficiosos como AO en ECV además de tener un efecto antitrombótico³⁵. Por esta razón, consideramos interesante enfocar las futuras líneas de investigación en este campo hacia productos que concentren en mayor medida los compuestos fenólicos del aceite de oliva así como de las hojas de olivo, con un considerable potencial antioxidante.

Estudio del efecto en el perfil lipídico y otros parámetros bioquímicos

En relación a la influencia que el consumo del EHO ejerce en los diferentes parámetros bioquímicos analizados cabe destacar bajada significativa en todos los sujetos en los valores de CHO ($P<0,01$), disminución próxima al 11% (Tabla III). También la tendencia al descenso de los valores de CHO y LDL en los volun-

Tabla III

Valores de perfil lipídico, índice aterogénico y glucemia antes y después de la administración de un extracto de hoja de olivo estandarizado al 15% (m/m) en oleouropeína y con un contenido medio del 10% (m/m) en ácidos triterpénicos y del 1% (m/m) en hidroxitirosol

Parámetro	Grupo de estudio ^a	Inicio estudio (media ± SD)	Fin estudio (media ± SD)	P
Colesterol total (mg/dL)	A	223,50±12,90	199,10±10,50	0,009
	D	263,50±12,10	224,20±13,00	0,062
Colesterol HDL (mg/dL)	A	47,10±3,00	45,90±2,40	0,506
	D	50,70±6,40	48,50±3,60	0,484
Colesterol LDL (mg/dL)	A	148,00±13,60	131,00±10,50	0,076
	D	183,60±11,10	151,60±13,70	0,114
Triglicéridos (mg/dL)	A	142,00±14,80	111,00±8,90	0,059
	E	202,30±24,10	126,00±13,00	0,080
CHO/HDL	A	4,89±0,37	4,45±0,32	0,056
	D	5,37±0,48	4,69±0,39	0,151
LDL/HDL	A	3,26±0,36	2,94±0,29	0,154
	D	3,73±0,33	3,18±0,37	0,181
Glucosa (mg/dL)	A	89,50±1,50	89,90±1,60	0,637

^aA: todos los voluntarios, n=10. D: voluntarios con niveles sanguíneos de CHO ≥ 220 mg/dL, n=4. E: voluntarios con niveles plasmáticos de TG ≥ 150 mg/dL, n=3.

tarios con valores de CHO ≥ 220 mg/dL. Estas bajadas, fueron mayores (en torno a un 40% de descenso), cuando los voluntarios se seleccionaron por tener valores basales de inicio de CHO ≥ 200 mg/dL. Creemos que un número superior de sujetos incluidos en el estudio, hubiese facilitado el que se alcanzara la significancia estadística.

Aunque los niveles de colesterol HDL no se vieron afectados, sin embargo, la relación CHO/HDL bajó casi significativamente (P=0,056; Tabla II). Tampoco el descenso de los valores de la relación LDL/HDL alcanzó la significancia estadística. En cuanto a los valores de TG, también se ha apreciado que tras la intervención bajan con tendencia a la significancia, tanto en todos los voluntarios como en el grupo con valores de TG más elevado (≥ 150 mg/dL).

En un estudio realizado con ratas Wistar alimentadas con una dieta hiperglucídica e hiperlipídica que les indujo un síndrome metabólico, se observó que cuando posteriormente fueron suplementadas con extracto de hojas de olivo (EHO) se observó que se mejoró la tolerancia glucídica y se normalizó la deposición de grasa abdominal así como los niveles plasmáticos de TG y CHO. Además se redujeron los niveles de ácido úrico en plasma y los de estrés oxidativo³⁶.

En un ensayo realizado por Jemay y cols.³⁷ se observó en ratas alimentadas con una dieta rica en CHO inductora de hiperlipidemia, como los hidrolizados con HT provenientes de la administración posterior de un EHO con oleouropeína, disminuían los niveles plasmáticos de CHO, TG y LDL, mientras aumentaban los

de HDL. En nuestro trabajo solamente se mejoraron tras la intervención los valores de CHO, como hemos comentado con anterioridad.

Por otra parte, Sánchez-Muñiz y cols.¹⁰ refieren que los índices de riesgo cardiovascular CHO/HDL y LDL/HDL disminuyen significativamente en un grupo de hombres (n=12) con hipercolesterolemia tras la ingesta de aceite de oliva y lo hace en mayor medida que en un grupo similar (n=13) pero que ingiere aceite de girasol. Nuestros resultados se aproximan a los aportados por estos autores al observarse para el índice CHO/HDL un descenso significativo (P=0,056, n=10) tras la administración del EHO evaluado.

Estudio de seguridad

Los parámetros de seguridad analizados (GPT, GOT, γ-GT y creatinina) permanecieron estables a lo largo del estudio y siempre dentro de los valores normales, como se ha puesto de manifiesto en otros estudios de intervención³⁸. Cabe destacar que los niveles de GOT disminuyeron significativamente, tras el consumo por los voluntarios del EHO (Tabla IV), lo que como marcador de daño hepático, el hecho de que se aprecie una disminución significativa de sus valores, tras el estudio de intervención, podría relacionarse con una mejora del estatus hepático de los voluntarios participantes en el estudio.

Este último hallazgo complementa los resultados preliminares no publicados apreciados por nuestro

Tabla IV

Estudio de seguridad representado por los niveles de transaminasas (GOT, GPT, γ -GT) y creatinina, antes y después de la administración de un extracto de hoja de olivo estandarizado al 15% (m/m) en oleouropeína y con un contenido medio del 10% (m/m) en ácidos triterpénicos y del 1% (m/m) en hidroxitirosol

Parámetro	Grupo de estudio ^a	Inicio estudio (media \pm SD)	Fin estudio (media \pm SD)	P
GOT (U/L)	A	30.80 \pm 5.40	25.60 \pm 4.70	0.002
GTP (U/L)	A	26.80 \pm 3.80	25.90 \pm 3.80	0.597
γ -GT (U/L)	A	35.60 \pm 8.00	30.60 \pm 5.50	0.152
Creatinina (mg/dL)	A	0.99 \pm 0.05	0.95 \pm 0.05	0.185

^aA: Todos los voluntarios, n=10.

grupo de investigación en conejos, en los que tras la administración de una dieta aterogénica rica en CHO conjuntamente con HT, tras su sacrificio después de la intervención, se apreció en el estudio histológico que el hígado de los incluidos en el grupo anterior tenía un aspecto semejante al del grupo control. Estos hallazgos abren la puerta a investigaciones futuras relativas al estudio del posible efecto protector de los compuestos bioactivos ensayados presentes en el EHO en la mejora y prevención del daño hepático asociado a diferentes patologías.

Conclusiones

Los resultados obtenidos manifiestan que el extracto de hojas de olivo ensayado presenta, en sujetos pre-hipertensos e hipertensos, un efecto hipotensor al disminuir los valores de presión sistólica y diastólica, y al elevar los plasmáticos de óxido nítrico, sustancia con un marcado efecto vasodilatador. El aumento de los niveles de óxido nítrico no parece ejercer un efecto prooxidante, debido a que los marcadores de oxidación (niveles de MDA) no aumentan tras la intervención. Los datos también muestran un retraso en la susceptibilidad de oxidación de las LDL. La ingesta del extracto también produjo una mejora del perfil lipídico, al disminuir los niveles de CHO, y todo ello sin modificar los parámetros bioquímicos relacionados con la seguridad del producto. Por tanto, aunque se trata de un estudio preliminar, los hallazgos son muy prometedores y útiles en el diseño de futuros alimentos funcionales utilizando extractos de hojas de olivo con el fin de prevenir y combatir los problemas asociados a hipertensión arterial y oxidación de las LDL colesteroles, como inicio de un proceso de aterogénesis y al síndrome metabólico.

Conflicto de intereses

Juristo Fonollá y Carlos Rodríguez Martínez trabajan para la empresa que respaldó este proyecto. El resto de autores declara no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

Queremos manifestar nuestro agradecimiento a la empresa Biosearch Life y al grupo AGR-141, colaboradores directos en el desarrollo y financiación de los ensayos necesarios para la realización del estudio.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). En <http://www.who.int/es/>.
2. Mitra S, Deshmukh A, Sachdeva R, Lu J, Mehta JL: Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy. *Am J Med Sci* 342(2):135-142, 2011.
3. Mari-Sanchis A, Beunza JJ, Be-Rastrullo M, Toledo E, Gortaiz FJ, Serrano-Martinez M, Martinez-González MA: Olive oil consumption and incidence of diabetes mellitus in the Spanish sun cohort. *Nutr Hosp* 26(1): 137-143, 2011.
4. Caruso D, Berra B, Giavarini F, Cortesi N, Fedeli E, Galli GL: Effect of virgin olive oil phenolic compounds on *in vitro* oxidation of human low density lipoproteins. *Nutr Metals Cardiovasc Dis* 9:102-107, 1999.
5. Coni E, Di Benedetto R, Di Pasquale M, Masella R, Modesti D, Mattei R: Protective effect of oleuropein, an olive biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids* 35: 45-54, 2000.
6. Vissers MN, Zock PL, Leennen R, Roodenburg AJ, Van Putte KP, Katan MB: Effect of consumption of phenols from olives and extra virgin olive oil on LDL oxidizability in healthy humans. *Free Radic Res* 35: 619-629, 2001.
7. González-Santiago M, Martín-Bautista E, Carrero JJ, Fonollá J, Baró L, Bartolomé MV, Gil-Loyzaga P, López-Huertas E: One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis* 188: 35-42, 2006.
8. Bulló M, Lamuela-Raventos R, Salas J: Mediterranean diet and oxidation: nuts and olive oils as important sources of fat and antioxidants. *Curr Top Med Chem* 11(14): 1797-810, 2011.
9. Bogani P, Galli C, Villa M, Visioli F: Postprandial antiinflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis* 190: 181-186, 2007.
10. Sánchez-Muniz FJ, Bastida S, Gutiérrez-García O, Carbajal A: Olive oil-diet improves the simvastatin effects with respect to sunflower oil-diet in men with increased cardiovascular risk. A preliminary study. *Nutr Hosp* 24(3): 333-339, 2009.
11. López H, Ruiz MD, Cabrera-Vique C. Grasas y aceites. En: Gil A (ed.): "Tratado de Nutrición", 2nd edn. Madrid: Editorial Médica Panamericana, pp. 249-280, 2010.
12. Rios MY, López-Martínez S, López-Vallejo F, Medina-Franco JL, Villalobos-Molina R, Ibarra-Barajas M, Navarrete-Vázquez

- quez G, Hidalgo-Figueroa S, Hernández-Abreu O, Estrada-Soto, S: Vasorelaxant activity of some structurally related triterpenic acids from *Phoradendron reichenbachianum* (Viscaceae) mainly by NO production: *Ex vivo* and in silico studies. *Fitoterapia* 83: 1023-1029, 2012.
13. Rodríguez R, Herrera MD, Perona JS, Ruiz-Gutiérrez, V: Potential vasorelaxant effects of oleanolic acid and erythrodiol, two triterpenoids contained in 'orujo' olive oil, on rat aorta. *Br J Nutr* 92: 635-642, 2004.
 14. Talhaoui N, Gómez-Caravaca AM, León L, De la Rosa R, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Determination of phenolic compounds of "Sikitita" olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents "Arbequina" and "Picual" olive leaves. *LWT-Food Sci Technol* 58: 28-34, 2014.
 15. Silva S, Gomes L, Leitao F, Coelho AV, Boas LV: Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Sci Technol Int* 12: 385-396, 2006.
 16. Susalit E, Agus N, Effendi I, Tjandrawinata RR, Nofiarny D, Perrinjaquet-Mocchetti T: Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-I hypertension: comparison with Captopril. *Phytomedicine* 18: 251-258, 2011.
 17. Dekanski D, Mihailovic-Stanojevic N, Milanovic GJ, Jovovic D, Miloradovic Z: Effects of high dose olive leaf extract on the hemodynamic and oxidative stress parameters in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Serb Chem Soc* 79: 1085-1097, 2014.
 18. Lee OH, Lee BY: Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresour Technol* 101: 3751-3754, 2010.
 19. Dekanski D, Ristic C, Radonjic N, Petronijevic N, Dekanski A, Mitrovic D: Olive leaf extract modulates cold restraint stress-induced oxidative changes in rat liver. *J Serb Chem Soc* 76: 1207-1218, 2011.
 20. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS: Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502, 1972.
 21. Miller JN, Rice-Evans C, Davies MJ, Gophinathan V, Milner A: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 84: 407-412, 1993.
 22. Fukunaga K, Yoshida M, Nakazono N: A simple rapid, highly sensitive and reproducible quantification method for plasma malondialdehyde by high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 12: 300-303, 1998.
 23. Esterbauer H, Striegl H, Rotheneder M: Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radica Res Commun* 6: 67-65, 1989.
 24. Moreno-Luna R, Muñoz-Hernandez R, Miranda ML, Costa AF, Jiménez-Jiménez L, Vallejo-Vaz AJ, Muriana FJ, Villar J, Stiefel P: Olive oil polyphenols decrease blood pressure and improve endothelial function in young women with mild Hypertension. *Am J Hypertens* 25: 1299-1304, 2012.
 25. Espino A, López-Miranda J, Castro P, Rodríguez M, López F, Blanco A: Monounsaturated fatty acids enriched diets lower plasma insulin levels and blood pressure in healthy young men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 6: 147-154, 1996.
 26. Lahoz C, Alonso R, Ordovás JM, Lopez-Farre A, de Oya M, Mata P: Effects of dietary fat saturation on eicosanoid production, platelet aggregation and blood pressure. *Eur J Clin Invest* 27(9): 780-787, 1997.
 27. Ruiz-Gutierrez V, Muriana FJ, 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. *J Hypertens* 14(12): 1483-1490, 1996.
 28. De Bock M, Derraik GB, Brennan CM, Biggs JB, Morgan PE, Hodgkinson SC, Hofman PL, Cutfield WS: Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *Plos One* 8: 1-8, 2013.
 29. Khayyal MT, El-Ghazaly MA, Abdallah DM, Nassar NN, Okpanyi SN, Kreuter MH: Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats. *Arzneimittelforschung* 52: 797-802, 2002.
 30. Alfonso RA, Patarrão RS, Macedo MP, Mota M: Carvedilol's actions are largely mediated by endogenous nitric oxide. *Rev Port Cardiol* 25(10): 911-917, 2006.
 31. González-Santiago M, Fonollá J, López-Huertas E: Human absorption of a supplement containing purified hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, and evidence for its transient association with lox-density lipoprotein. *Pharmacol Res* 61: 364-370, 2010.
 32. De la Torre-Carbot K, Chávez JL, Jáuregui O, Castellote AI, Lamuela RM, Nurmi T, Poulsen HE, Gaddi AV y cols.: Elevated circulating LDL phenol levels in men who consumed virgin rather than refined olive oil are associated with less oxidation of plasma LDL. *J Nutr* 140: 501-508, 2010.
 33. Covas MI, De la Torre K, Farré M, Kaikkonen J, Fitó M, López M, Pujadas MA, Juglar J, Weinbrenner T, Lamuela RM, De la Torre R: Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radical Biol Med* 40: 608-616, 2006.
 34. Vissers MN, Zock PL, Katan MB: Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *Eur J Clin Nutr* 58: 955-965, 2004.
 35. Syed O: Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharm J* 18: 111-121, 2010.
 36. Poudyal H, Campbell F, Brown L: Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *J Nutr* 140: 946-953, 2010.
 37. Jemaia H, Bouaziza H, Fkia I, El Fekib A, Sayadia S: Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem Biol Interac* 176: 88-98, 2008.
 38. Martínez-Rodríguez R, Navarro-Alarcón M, Rodríguez-Martínez C, Fonollá-Joya J: Efectos sobre el perfil lipídico en humanos de un extracto de algarroba (*Ceratonia siliqua* L.) rico en polifenoles, incluido en un lácteo como alimento funcional: estudio piloto. *Nutr Hosp* 28: 2103-2110, 2013.