

Efecto de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen sobre la resistencia de las lipoproteínas de baja densidad a la oxidación

Juan Antonio Moreno^a, José López-Miranda^a, Purificación Gómez^a, Fatima Benkhalti^b, Es-saddik El Boustani^b y Francisco Pérez-Jiménez^a

^aUnidad de Lípidos y Arteriosclerosis. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. España.

^bFaculté des Sciences. Université Cadi Ayyad. Semlalia. Marrakech. Marruecos.



FUNDAMENTO Y OBJETIVO: Varios estudios epidemiológicos y experimentales han relacionado la ingestión de antioxidantes, abundantes en la alimentación mediterránea, con una baja incidencia de enfermedad cardiovascular. Uno de los posibles mecanismos de dicha acción es la protección frente a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). El objetivo de nuestro estudio fue comparar la actividad antioxidante de diversos compuestos fenólicos, presentes en el aceite de oliva virgen, sobre dichas lipoproteínas.

SUJETOS Y MÉTODO: Las LDL fueron aisladas de voluntarios sanos por medio de ultracentrifugación secuencial a partir de plasma sanguíneo. Seguidamente fueron oxidadas con CuCl₂ en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos y de un extracto de aceite de oliva virgen. Se determinó la producción de dienos conjugados, mediante la monitorización continua del aumento de absorción a 234 nm, como indicador de la oxidación de las LDL.

RESULTADOS: Los resultados ponen de manifiesto que el extracto de aceite de oliva virgen prolonga la fase de latencia y disminuye la tasa de progresión de manera significativa ($p < 0,05$) a bajas concentraciones (2 µg/ml). Este efecto antioxidante también se observó con bajas concentraciones (2 µM) de ácido cafeico y oleuropeína ($p < 0,05$). Sin embargo, fue necesario aumentar 50 veces la concentración de flavona para obtener un efecto similar ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES: El extracto de aceite de oliva virgen rico en compuestos fenólicos, así como los compuestos fenólicos presentes en él (ácido cafeico y oleuropeína) son potentes antioxidantes a muy bajas concentraciones. Por tanto, el efecto beneficioso de la alimentación mediterránea puede deberse, en parte, a la acción protectora de dichos compuestos.

Palabras clave: Lipoproteínas de baja densidad. Dieta mediterránea. Compuestos fenólicos. Aceite de oliva virgen.

Effect of phenolic compounds of virgin olive oil on LDL oxidation resistance

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Several epidemiological and experimental studies have associated the intake of antioxidants, which are abundant in the Mediterranean diet, with a low incidence of cardiovascular disease. One possible mechanism of this action is the oxidative protection in low density lipoproteins (LDL). The aim of our study was to compare the antioxidative activity of diverse phenolic compounds present in virgin olive oil on these lipoproteins.

SUBJECTS AND METHOD: LDL was isolated from blood plasma of healthy volunteers by sequential ultracentrifugation. This was followed by oxidation with CuCl₂ in the presence of different concentrations of phenolic compounds and virgin olive oil extract. Production of conjugated dienes was determined by the continuous monitoring of increased absorbency at 234 nm as an indicator of LDL oxidation.

RESULTS: Virgin olive oil extract prolonged the latency phase and significantly lowered the progression rate ($p < 0.05$) at low concentrations (2 µg/ml). This antioxidative effect was also observed with low concentrations (2 µM) of caffeic acid and oleuropein ($p < 0.05$). However, it was necessary to increase the concentration of flavone up to 50 times to observe a similar effect ($p < 0.05$).

CONCLUSION: Both virgin olive oil extract enriched in phenolic compounds and phenolic compounds present in olive oil (caffeic acid and oleuropein) are potent antioxidants at very low concentrations. Thus, the beneficial effects of a Mediterranean diet may be partly due to the protective action of these compounds.

Key words: Low density lipoproteins. Mediterranean diet. Phenolic compounds. Virgin olive oil.

Correspondencia: Dr. F. Pérez Jiménez.
Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis. Hospital Universitario Reina Sofía.
Avda. Menéndez Pidal, s/n. 14004 Córdoba. España.
Correo electrónico: fperezjimenez@uco.es

Recibido el 12-7-2002; aceptado para su publicación el 15-10-2002.

La cardiopatía isquémica constituye la principal causa de muerte en los países desarrollados. Existe, sin embargo, una amplia variabilidad en la incidencia y tasa de mortalidad de esta enfermedad, lo que hace pensar en la importancia que los factores ambientales tienen en su desarrollo.

Las modificaciones oxidativas de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) constituyen un factor clave e importante en la génesis y desarrollo de la aterotrombosis¹⁻⁴. Las LDL oxidadas pueden favorecer el desarrollo de la placa de ateroma a través de mecanismos tales como su citotoxicidad⁵, su efecto quimiotáctico sobre monocitos⁶, la inhibición de la motilidad de los macrófagos⁷, sus efectos trombogénicos^{8,9}, su efecto sobre el tono vascular¹⁰ y, por último, favoreciendo su captación por parte de los macrófagos, hasta transformarse en células espumosas¹¹. Además, varios estudios han apuntado la existencia de LDL oxidadas *in vivo*¹²⁻¹³.

La alimentación mediterránea, rica en frutas, verduras, cereales, vino, y cuyo principal aporte en grasas está constituido por el aceite de oliva, se asocia con una baja incidencia de enfermedad cardiovascular¹⁴⁻¹⁵. Tales beneficios se han atribuido a sus efectos sobre las concentraciones de lípidos plasmáticos¹⁶, mejora del metabolismo hidrocarbonado¹⁷, reducción de la presión arterial¹⁷ y efecto antioxidante sobre las LDL. Tradicionalmente se ha venido explicando este último hecho por la vitamina E, presente en el aceite de oliva^{18,19}. Sin embargo, este alimento contiene otra variedad de compuestos, los compuestos fenólicos, que pueden prevenir la oxidación de las LDL *in vitro* con igual o mayor efectividad que las vitaminas C y E^{20,21}, y con ello el riesgo de padecer aterotrombosis.

Los compuestos fenólicos ejercen su actividad antioxidante porque actúan como quelantes de iones metálicos libres y retiran los radicales libres formados durante el proceso de lipoperoxidación. En este proceso, los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva, como la oleu-

ropeína o el hidroxitirosol, retrasan la separación de vitamina E presente en las LDL y previenen la formación de lipoperoxidos al retrasar la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, sustratos iniciales del proceso de peroxidación²²⁻²⁴. Además, la oleuropeína y el hidroxitirosol limitan la captación de las LDL por parte del macrófago e inhiben la agregación plaquetaria, reduciendo la producción de eicosanoides de los leucocitos activados²⁵ e incrementando la producción de óxido nítrico por los macrófagos²⁶.

En el aceite de oliva existen múltiples compuestos fenólicos, algunos de los cuales han demostrado ser potentes agentes antioxidantes. Nuestro objetivo es comparar la eficacia antioxidante del ácido cafeico, la oleuropeína, la flavona y un extracto de aceite de oliva, frente a la oxidación inducida de la partícula de LDL.

Sujetos y método

Aislamiento de las LDL

Las LDL se aislaron mediante ultracentrifugación secuencial a partir de una mezcla de plasma sanguíneo procedente de 10 voluntarios sanos. Se utilizaron una ultracentrifuga Beckman (Palo Alto, CA, EE.UU.) modelo LE-70 y un rotor NVT65 a 65.000 rpm, 4 °C, durante 2 h. Tras aislar las LDL, procedimos a dializarlas con PBS (*phosphate-buffered saline*, pH 7,4); (OXOID, Basinstoke, Reino Unido), con el fin de eliminar el EDTA presente en las LDL. Utilizamos membranas de diálisis (Medicell International Ltd., Londres, Reino Unido) que fueron sometidas a tres cambios del líquido de diálisis a lo largo de 24 h, desgasificándolo con una fuente de nitrógeno. Posteriormente fueron esterilizadas mediante filtración a través de un filtro Milipore 0,2 µm. A continuación determinamos el contenido de proteínas en dichas lipoproteínas mediante el método de Bradford²⁷.

Obtención y preparación de los compuestos fenólicos

Para el estudio de la resistencia a la oxidación de las LDL *in vitro* se utilizaron compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva, tales como oleuropeína (Extrasynthese, Genay, Francia), el ácido cafeico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.), la flavona (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) y un extracto de aceite de oliva virgen enriquecido en compuestos fenólicos.

El extracto de aceite de oliva virgen rico en compuestos fenólicos se obtuvo por medio de dos extracciones líquido/líquido diferentes²⁸. En la primera, el aceite de oliva se mezcló con hexano y se lavó tres veces con una mezcla de metanol/agua (60% v/v). El extracto hidrometanólico resultante fue almacenado durante 24 h a -20 °C. En un paso posterior se realizó la segunda extracción para eliminar las posibles impurezas. Para ello se añadió una mezcla de hexano y acetonitrilo, y se obtuvo el extracto de aceite de oliva enriquecido en compuestos fenólicos. El total de los fenoles fue determinado a 760 nm a partir del reactivo Folin Ciocalteu²⁹.

Estudio de resistencia a la oxidación de las LDL *in vitro*

Para el estudio de la resistencia a la oxidación de las LDL *in vitro* hemos seguido el método descrito por Esterbauer et al.³⁰. Para ello incubamos 100 µg/l de las LDL aisladas anteriormente con diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos estudiados; ácido cafeico (0,2, 2 y 5 µM), oleuropeína (0,2, 2 y 5 µM) y flavona (50, 75, 100 µM), así como con un extracto de aceite de oliva virgen (0,2, 0,5 y 2 µg/ml). La oxidación se realizó con 10 µmol/l de CuCl₂ en PBS, excepto para la flavona, que se hizo con etanol. Por último, valoramos la cinética de oxidación de es-

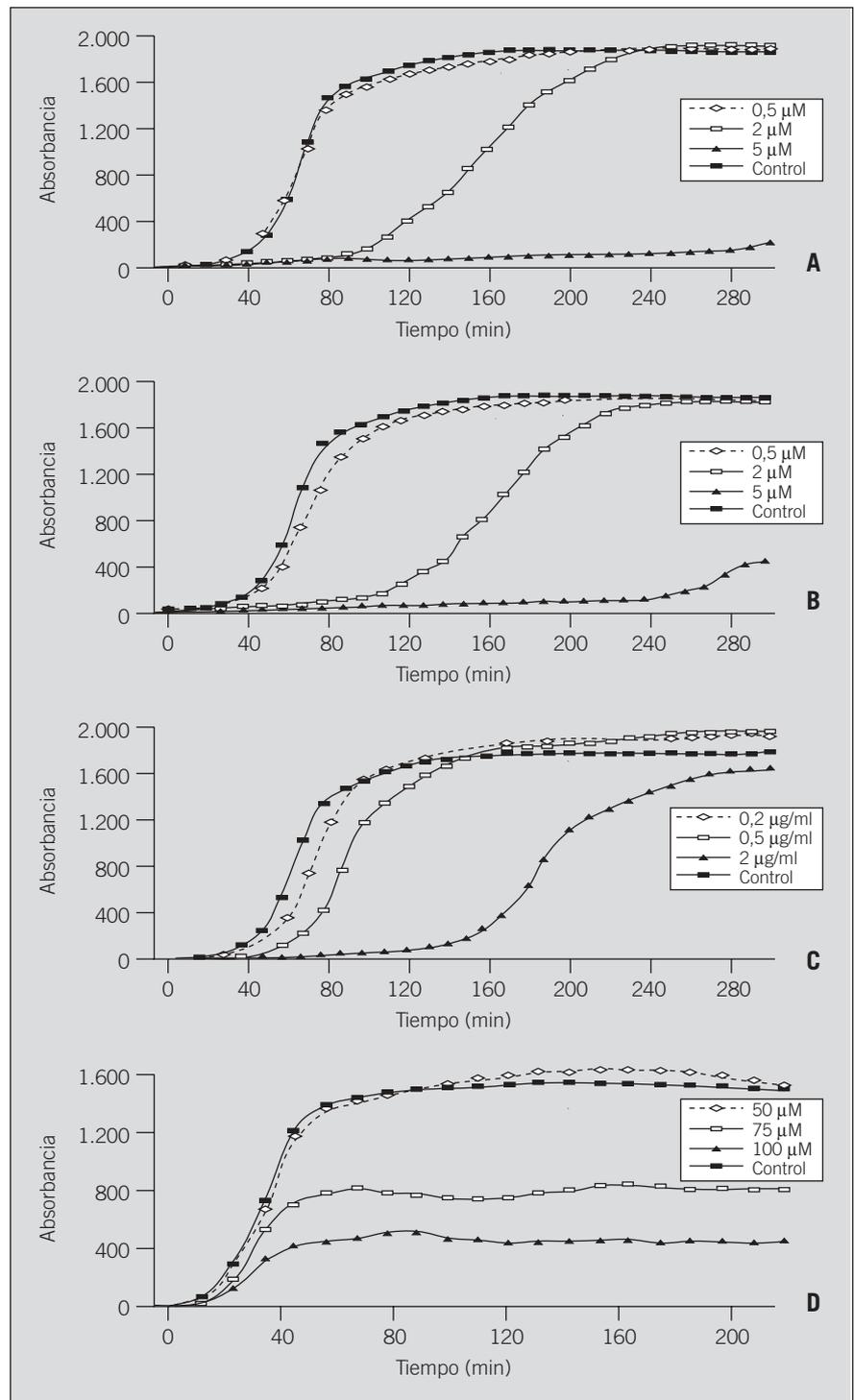


Fig. 1. Curvas de oxidación inducida de la partícula de LDL, con soluciones de diferentes compuestos fenólicos. A: oleuropeína; B: ácido cafeico; C: extracto de aceite de oliva enriquecido en compuestos fenólicos; D: flavona.

tas LDL a 37 °C mediante la monitorización continua (cada 5 min durante 4 h) de la producción de dienos conjugados en un espectrofotómetro Beckman DU-640 a 234 nm. Determinamos los cambios en la absorción a 234 nm con relación al tiempo 0, obteniendo tres fases consecutivas en la curva de la cinética de oxidación de las LDL: fase lag o fase de latencia, fase de propagación y fase de descomposición. Como parámetros definitivos de la resistencia a la oxidación de las LDL hemos medido: a) el tiempo de latencia o tiempo expresado en minutos antes de que

comience el proceso oxidativo, y b) la tasa de progresión, definida como el incremento de producción de dienos conjugados por unidad de tiempo en la fase de propagación.

Análisis estadístico

En el estudio estadístico de los datos se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para medidas repetidas, con el fin de determinar el efecto de las diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos fe-

nólicos sobre la fase de latencia y la tasa de progresión obtenidas al oxidar las LDL. Cuando se encontró significación estadística, se realizó la prueba de Tuckey para comparación *post hoc* con la que identificar diferencias entre grupos. Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$. Como programa estadístico se utilizó el SPSS (versión 7.5 en castellano).

Resultados

Las soluciones con ácido cafeico, oleuropeína, flavona y el extracto de aceite de oliva virgen aumentan la resistencia a la oxidación de las LDL *in vitro*. Dicho efecto varió en función del tipo y concentración del compuesto fenólico utilizado (fig. 1). El tiempo de latencia, antes del inicio de la fase exponencial de oxidación de las LDL, fue significativamente mayor ($p < 0,05$) para el ácido cafeico y la oleuropeína, a una concentración 2 μM , con respecto a su control (tabla 1). Además se observó, en las soluciones de ácido cafeico y oleuropeína, un descenso significativo ($p < 0,05$) en la tasa de progresión de formación de dienos conjugados durante la fase exponencial de la cinética de oxidación de las LDL con respecto al control (tabla 2). No se exponen los resultados de estos compuestos a una concentración de 5 μM en las tablas 1 y 2 porque a dicha concentración no se oxidaron las lipoproteínas. Todas las concentraciones del extracto de aceite de oliva virgen (0,2, 0,5 y 2 $\mu\text{g/ml}$) retrasaron de manera significativa ($p < 0,05$) la fase de latencia de las LDL (tabla 1). A una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ de extracto de aceite de oliva virgen, se observó un descenso significativo ($p < 0,05$) de la tasa de progresión de formación de dienos conjugados con respecto al control (tabla 2). Por el contrario, en el caso de la flavona, el único aumento significativo de la fase de latencia ($p < 0,05$) se obtuvo a una concentración de 100 μM de flavona (tabla 1). Igualmente, se observó un descenso significativo ($p < 0,05$) de la tasa de formación de dienos conjugados a dicha concentración de flavona, respecto al control (tabla 2).

Discusión

Nuestros resultados demuestran que el extracto de aceite de oliva virgen, rico en polifenoles, y los propios compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva (ácido cafeico y oleuropeína) reducen la oxidabilidad de las LDL *in vitro* a concentraciones bajas. Además, hemos demostrado que el poder antioxidante de dichos compuestos es diferente, siendo la flavona la que tuvo un menor poder antioxidante. Los factores que influyen en la resistencia a la oxidación de las LDL son el tamaño de la propia partícula, la proporción de los distintos ácidos grasos y su contenido en antioxidantes^{31,32}. Parece claro que los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva pueden prevenir las

TABLA 1

Fase de latencia correspondiente a la oxidación inducida de la partícula de LDL, con soluciones de diferentes compuestos fenólicos

Ácido cafeico				
Concentración	Control	0,2 μM	2 μM	
Tiempo (min)	45,2 (7,1)	57,4 (9,9) ^b	163 (27,9) ^a	
Oleuropeína				
Concentración	Control	0,2 μM	2 μM	
Tiempo (min)	45,2 (7,1)	50,2 (4,6) ^b	131,8 (24,4) ^a	
Flavona				
Concentración	Control	50 μM	75 μM	100 μM
Tiempo (min)	16,9 (4,1)	18,1 (4,5) ^d	17,8 (7,2) ^d	29,2 (5,5) ^a
Extracto de aceite de oliva				
Concentración	Control	0,2 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$
Tiempo (min)	45,2 (7,1)	63 (12,1) ^{a,c}	82 (16,5) ^{a,c}	191 (31,2) ^a

^aSignificativamente diferente ($p < 0,05$) frente a control; ^bsignificativamente diferente ($p < 0,05$) frente a 2 μM ; ^csignificativamente diferente ($p < 0,05$) frente a 2 $\mu\text{g/ml}$; ^dsignificativamente diferente ($p < 0,05$) frente a 100 μM . Los datos se expresan como X (DE).

TABLA 2

Tasas de progresión correspondiente a la oxidación inducida de la partícula de LDL, con soluciones de diferentes compuestos fenólicos

Ácido cafeico				
Concentración	Control	0,2 μM	2 μM	
Tiempo (min)	61,2 (10,3)	45,3 (5,6) ^a	35,6 (3,8) ^a	
Oleuropeína				
Concentración	Control	0,2 μM	2 μM	
Tiempo (min)	61,2 (10,3)	52,4 (6,1) ^b	33,8 (4,2) ^a	
Flavona				
Concentración	Control	50 μM	75 μM	100 μM
Tiempo (min)	48,9 (5,8)	43,6 (4,9) ^d	41,7 (5,2) ^d	29,6 (3,6) ^a
Extracto de aceite de oliva				
Concentración	Control	0,2 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$
Tiempo (min)	61,2 (10,3)	67,8 (13,5) ^{c,e}	53,6 (8,4) ^c	39,3 (3,8) ^a

^aSignificativamente diferente ($p < 0,05$) frente a control; ^bsignificativamente diferente ($p < 0,05$) frente a 2 μM ; ^csignificativamente diferente ($p < 0,05$) frente a 2 $\mu\text{g/ml}$; ^dsignificativamente diferente ($p < 0,05$) frente a 100 μM ; ^esignificativamente diferente ($p < 0,05$) frente a 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Los datos se expresan como X (DE).

modificaciones oxidativas que puedan sufrir las LDL actuando en diferentes planos: inhibiendo la pérdida de los antioxidantes endógenos de las partículas²²⁻²⁴, actuando como quelantes de iones metálicos prooxidantes, atrapando radicales libres y retrasando la reacción de lipoperoxidación^{18,33}.

En nuestro estudio hemos encontrado un efecto antioxidante, dependiente de su concentración en el ensayo, lo que concuerda con resultados de otros autores²²⁻²⁴, si bien no existen estudios previos que los comparen entre sí. Nuestros datos demuestran que el poder antioxidante varía de un compuesto fenólico a otro. El ácido cafeico y la oleuropeína tienen un gran poder a concentraciones muy bajas, mientras que es necesario aumentar la concentración de flavona para obtener un efecto similar. Los compuestos fenólicos estabilizan los radicales libres al donarles uno de

los hidrógenos de sus grupos hidroxilo, formándose un puente de hidrógeno entre dos grupos cercanos. Por tanto, el grado de actividad antioxidante está relacionado con el número de grupos hidroxilos que posea el compuesto³⁴. En particular, la existencia de dos grupos confiere una elevada capacidad antioxidante, mientras que si existe un único grupo, como en el tirosol, esta actividad protectora disminuye. Esto explica las diferencias obtenidas anteriormente, ya que el ácido cafeico y la oleuropeína presentan dos grupos hidroxilos muy cercanos entre sí y la flavona presenta solamente uno.

En cuanto al estudio de la susceptibilidad a la oxidación *in vitro* de las LDL en presencia del extracto de aceite de oliva virgen rico en compuestos fenólicos, hemos encontrado un efecto protector. Visioli et al²⁴ ya señalaron una relación entre el contenido en fenoles y la estabilidad oxi-

dativa del aceite de oliva. Otros autores han observado que a mayor contenido de compuestos fenólicos, en diferentes tipos de aceite de oliva, mayor incremento en la fase de latencia de las LDL²⁰ y que el tipo de compuesto fenólico también influye en la capacidad antioxidante del aceite de oliva³⁵. Es difícil comparar la potencia antioxidante del extracto de aceite de oliva con respecto a cada uno de los compuestos fenólicos por separado, ya que sus concentraciones se expresan en unidades diferentes. Sin embargo, el extracto de aceite de oliva confiere un mayor efecto protector al comparar las fases de latencia, a las concentraciones sometidas a prueba en este experimento *in vitro*.

Actualmente poseemos evidencias que parecen indicar que los compuestos fenólicos, dependiendo de su concentración en la dieta, se pueden absorber directamente³⁶⁻³⁸ y, por tanto, incrementar la capacidad antioxidante del plasma, tanto en humanos como en animales^{39,40}. Del mismo modo, Bonanome et al⁴¹ han señalado que los compuestos fenólicos del aceite de oliva son absorbidos por el intestino en cantidad variable, con un rápido aclaramiento plasmático, de manera que no aparecen en el estado de ayuno, lo que indica que pueden ejercer su efecto antioxidante en la fase posprandial.

En conclusión, nuestro estudio demuestra que el extracto de aceite de oliva virgen y sus compuestos fenólicos pueden aumentar la resistencia a la oxidación de las LDL *in vitro* a bajas concentraciones. Este hecho, unido a las evidencias indicativas de que estos compuestos se pueden asimilar directamente a partir de la dieta, podría explicar el menor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares observado en los países que siguen una alimentación mediterránea rica en aceite de oliva.

Agradecimiento

Este trabajo se ha realizado gracias a las ayudas del CICYT (SAF96/0060, OLI 96/2146 a Francisco Pérez Jiménez [F.P.J.], SAF 01/2466-C05 04 a F.P.J., SAF 01/03666 a José López Miranda [J.L.M.]), el Ministerio de Sanidad (FIS, 98/1531, 01/0449 a J.L.M. y FIS 99/0949 a F.P.J.), Fundación Cultural Hospital Reina Sofía-Cajasur (Purificación Gómez y Juan Antonio Moreno), Consejería de Salud, Servicio Andaluz de Salud (PAI 97/58, 98/126, 99/116, 00/212 y 01/243 a J.L.M. y PAI 97/57, 98/132, 99/165, 00/39 a F.P.J.) y Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Grundy SM. Role of low density lipoproteins in atherogenesis and development of coronary heart disease. *Clin Chem* 1995;41:139-46.
- Jialal I, Devaraj S. The role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Nutr* 1996; 126:1053S-7S.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JC. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoproteins that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915-24.
- Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb* 1995;15:551-61.
- Thorne SA, Abbot SE, Winyard PG, Blake DR, Mills PG. Extent of oxidative modification of low density lipoprotein determines the degree of cytotoxicity to human coronary artery cells. *Heart* 1996;75:11-6.
- Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, et al. Minimally modified low density lipoprotein induced monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5134-8.
- Aviram M. Macrophage foam cell formation during early atherogenesis is determined by the balance between pro-oxidants and anti-oxidants in arterial cells and blood lipoproteins. *Antioxid Redox Signal* 1999;1:585-94.
- Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995;270:319-24.
- Drake TA, Hannani K, Fei H, Lavi S, Berliner JA. Minimally oxidized low density lipoprotein induced tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol* 1991;138:601-7.
- Latron G, Lafont H, et al. Stimulating effects of oxidized low density lipoproteins on plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1991;11:1821-9.
- Maor I, Mandel H, Aviram M. Macrophage uptake of oxidized LDL inhibits lysosomal sphingomyelinase, thus causing the accumulation of unesterified cholesterol-sphingomyelin-rich particles in the lysosomes. A possible role for 7-ketocholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15: 1378-87.
- Bui MN, Sack MN, Moutsatsos G, Lu DY, Katz P, McCown R, et al. Autoantibody titers to oxidized low-density lipoprotein in patients with coronary atherosclerosis. *Am Heart J* 1996;131: 663-7.
- Hammer A, Kager G, Dohr G, Rabl H, Ghassempur Y, Jürgens G. Generation, characterization and histochemical application of monoclonal antibodies selectively recognizing oxidatively modified apoB-containing serum lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:704-13.
- Keys A. Coronary heart disease in seven countries. *Circulation* 1970;41(Suppl 1):1-211.
- Willett WC, Sacks F, Trichopoulos A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, et al. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr* 1995;61:1402S-6S.
- Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb* 1992; 12:911-19.
- Salas J, López Miranda J, Jansen S, Zambrana JL, Castro P, Paniagua J, et al. La dieta rica en grasa monoinsaturada modifica beneficiosamente el metabolismo de los carbohidratos y la presión arterial. *Med Clin (Barc)* 1999;113:765-9.
- Castro P, Miranda JL, Gómez P, Escalante DM, Segura FL, Martín A, et al. Comparison of an oleic acid enriched-diet vs NCEP-I diet on LDL susceptibility to oxidative modification. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:61-7.
- López-Miranda J, Gómez P, Castro P, Marín C, Paz E, Bravo MD, et al. La dieta mediterránea mejora la resistencia a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). *Med Clin (Barc)* 2000;115:361-5.
- Fito M, Covas MI, Lamuela-Raventós RM, Vila J, De la Torre C, Marrugat J. Aceite de oliva e inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. Importancia de los compuestos fenólicos. *Med Clin (Barc)* 2000;115:166-9.
- Visioli F, Galli C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Rev* 1998;56:142-7.
- Visioli F, Bellomo G, Montedoro GF, Galli C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 1995; 117:25-32.
- Caruso D, Berra B, Giavarini F, Cortesi N, Fedeli E, Galli G. Effect of virgin olive oil phenolic compounds on in vitro oxidation of human low density. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1999;9:102-7.
- Visioli F, Galli C. Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sci* 1994;55: 1965-71.
- Visioli F, Petroni A, Galli C. Phenolic compounds extracted from olive oil prevent oxidation of low-density lipoproteins and inhibit platelet function and platelet and leukocyte eicosanoid production in vitro. En: Paoletti R, Samuelsson B, Catapano AL, Poli A, Pinetti M, editors. *Oxidative processes and antioxidants*. New York: Raven Press, 1994; p. 199-206.
- Visioli F, Bellosa S, Galli C. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci* 1998; 62:541-6.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- Chimi H, Sadik A, Le Toutour B, Rahmani M. Contribution à l'étude comparative des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olives du tyrosol, de l'hydroxytyrosol, de l'acide caféique, de l'oleuropeine et du BHT. *Rev Fr Corps Gras* 1988;35: 339-44.
- Montedoro G. Phenolic substances present in virgin olive oil. Note I. Identification of phenolic acids and their antioxidant power. *Sci Tecnol Alim* 1972;2:177-86.
- Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* 1989;6:67-75.
- Jialal Y, Grundy SM. Effect of dietary supplementation with alpha-tocopherol on the oxidative modification of low density lipoprotein. *J Lipid Res* 1992;33:899-906.
- Makimattila S, Liu ML, Vakkilainen J, Schlenzka A, Lahdenperä S, Syvanne M, et al. Impaired endothelium-dependent vasodilation in type 2 diabetes. Relation to LDL size, oxidized LDL and antioxidants. *Diabetes Care* 1999;22: 973-81.
- De Whalley CV, Rankin SM, Hoult JR, Jessup W, Leake DS. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol* 1990;39:1743-50.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med* 1996;20: 933-56.
- Wiseman SA, Mathtot JNNJ, De Fouw NJ, Tibjurg LBM. Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis* 1996;120:15-23.
- Scaccini C, Nardini M, D'Aquino M, Gentili V, Di Felice M, Tomassi G. Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasma and lipoprotein fractions. *J Lipid Res* 1992;33:627-33.
- Kühnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components; their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 1996;24:117-91.
- Hollman PC, De Vries JH, Van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1995;62: 1276-82.
- Visioli F, Caruso D, Plasmati E, Patelli R, Mulinacci N, Romani A, et al. Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose-dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radic Res* 2001; 34:301-5.
- Visioli F, Galli C, Bornet F, Mattei A, Patelli R, Galli G, et al. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett* 2000; 468:159-60.
- Bonanome A, Pagnan A, Caruso D, Toia A, Xamin A, Fedeli E, et al. Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2000;10:111-20.