

Resumen Bibliografía

Los extractos del olivo, obtenidos de las hojas, frutos y ramas del mismo, contienen una veintena de polifenoles entre los que destacamos hidroxitirosol, oleuropeína y tirosol, sin embargo, a lo largo de este documento nos referiremos a ellos de forma genérica como polifenoles del olivo. Los productos enriquecidos con dichos polifenoles se han desarrollado para la prevención o el tratamiento de problemas, como la Colitis Ulcerosa, por su capacidad antioxidante, anti-inflamatoria y regeneradora y protectora del DNA.

Los productos desarrollados no contienen ningún derivado del petróleo, ni activos como siliconas o parafinas, que evitarían que los componentes activos beneficiosos penetrasen en el sistema celular. Además, tampoco contienen colorantes ni fragancias debido a que muchas de esas sustancias son a menudo causantes de alergias o de sensibilidades extremas. Los productos han sido elaborados únicamente con elementos de origen natural, aislados, purificados y concentrados sin alterar su composición biológica.

Además, la invención incide sobre la forma de fabricar los productos de una forma ecológica, exenta de trazas de pesticidas y que consiga una estabilidad asegurada de los ácidos grasos insaturados y de los polifenoles del olivo, sin que se degraden u oxiden durante largos periodos de tiempo.

La oleuropeína (OLE) es uno de los compuestos fenólicos más abundantes en hojas de olivo (*Olea europaea* L). Recientemente, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) ha emitido su propio informe de evaluación sobre las propiedades saludables de esta molécula en la salud humana¹¹. Es ampliamente conocido por sus potentes actividades antioxidantes y antiinflamatorias que parecen ser la base de sus múltiples actividades farmacológicas: antiviral, anticancerígeno, neuroprotector, antimicrobiano, y gastroprotector, entre otros^{12,13}.

Mientras que una serie de datos preclínicos alentadores han revelado los efectos de los polifenoles en la inflamación intestinal como extractos de plantas o moléculas puras, se dispone de estudios escasos sobre la oleuropeína aislada. En cuanto a la EII, particularmente OLE ha demostrado ser eficaz en colitis aguda, crónica y asociada al cáncer de colon¹⁴⁻¹⁶. Sin embargo, OLE está limitado por su mala estabilidad no sólo contra factores externos (luz, oxígeno) sino también a través del organismo humano (pH, enzimas). Varios estudios sugieren que OLE sufre un complejo proceso de

biotransformación durante la digestión gástrica¹⁷⁻¹⁹. Debido a esto, los resultados de eficacia recuperados de la administración oral de OLE podrían ser menores que los esperados y se han utilizado dosis demasiado altas hasta la fecha para estudios in vivo, que podrían aportar toxicidad.

Desde la antigüedad se conocen los beneficios del aceite de oliva en relación a la acción protectora e hidratante sobre la piel y otros tejidos. Esto es debido a que el ácido oleico (de la serie Omega-9), ácido graso mayoritario en el aceite de oliva, y su derivado el Hidroxi-oleico son capaces de ayudar en la reestructuración de las membranas lipídicas celulares.

Tradicionalmente, los efectos saludables del aceite de oliva se atribuían únicamente al alto contenido lipídico, sin embargo, hoy en día se sabe que los polifenoles del olivo también ejercen una actividad protectora celular. Los polifenoles del olivo forman parte del 1-3% de la fracción insaponificable del aceite. La composición de los polifenoles del olivo varía en cantidad y la calidad dependiendo de la variedad de olivo, la edad del árbol, las técnicas agrícolas empleadas en el cultivo, el grado de madurez, la composición del suelo, el clima, el procesamiento técnico y almacenamiento (Amarowicz et al., 2009, Cicerale et al., 2009, Corona et al., 2009, Muzzalupo et al., 2011, Visioli & Galli, 1998). En general, existen cuatro clases principales de compuestos fenólicos que se encuentra en estos aceites: flavonoides, lignanos, fenoles simples y secoiridoides (Figura 2).

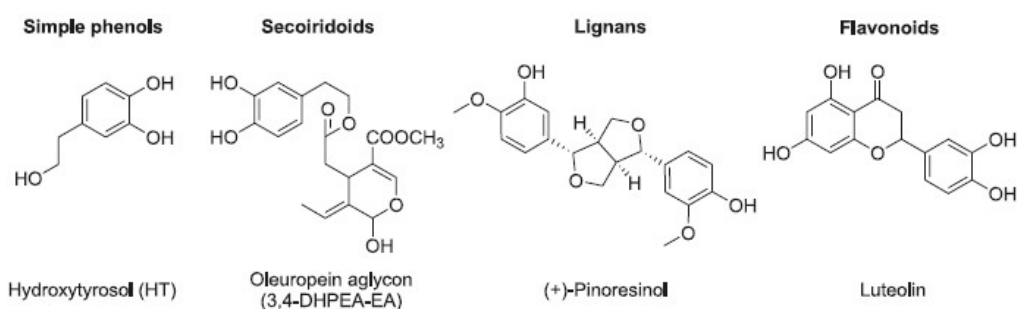


Figura 1. Principales compuestos fenólicos del aceite de oliva (Martin-Pelaez *et al.*, 2013)

Al parecer, en las hojas del olivo se producen modificaciones químicas. Las enzimas endógenas hidrolíticas, principalmente las glicosidasas, pueden activarse durante procesos de molienda de las hojas o maceración en extractos acuosos y catalizar la hidrólisis de los fenoles como la oleuropeína (Ryan et al., 2003) con la consiguiente

producción del aglicón, que se isomeriza rápidamente a través de la forma enólica a un dialdehído (Figura 3).

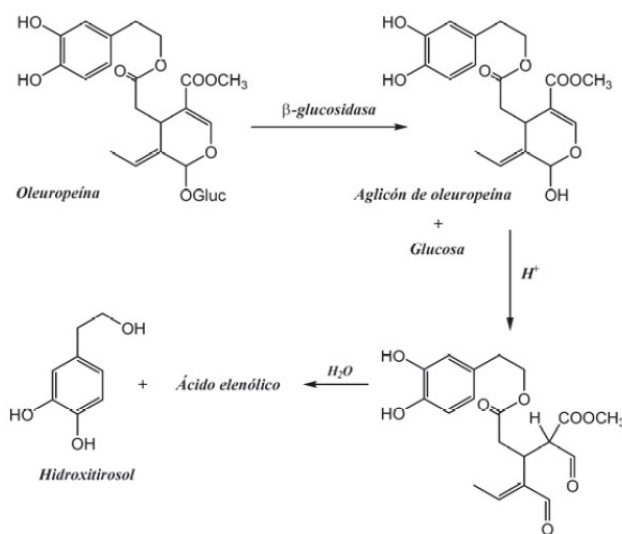


Figura 2. Hidrólisis y degradación parcial de la oleuropeína en hojas de olivo (De la Fuente P. *et al.*, 2004)

En el fruto del olivo también se producen modificaciones químicas, de este modo, las olivas pueden contener principalmente compuestos polares como los glicósidos oleuropeína y ligstrósida que son los precursores de los derivados aglicona, compuestos más polares aún. La oleuropeína-aglicona es el éster del ácido elenólico con el 3,4-dihidroxifeniletanol (hidroxitirosol) y la ligstrósida-aglicona es el éster del ácido elenólico con el 4-hidroxifeniletanol (tirosol) y se forman cuando se pierde una molécula de glucosa del correspondiente glicósido en el proceso de maduración de la oliva. Las agliconas y sus diferentes derivados son los fenoles más abundantes en las olivas maduras y en el aceite. Los derivados difieren en sus estructuras químicas, pudiéndose abrir o cerrar el anillo, siendo los polifenoles tirosol e hidroxitirosol los productos finales de la hidrólisis de los derivados aglicona de la oleuropeína y la ligstrósida (Figura 4).

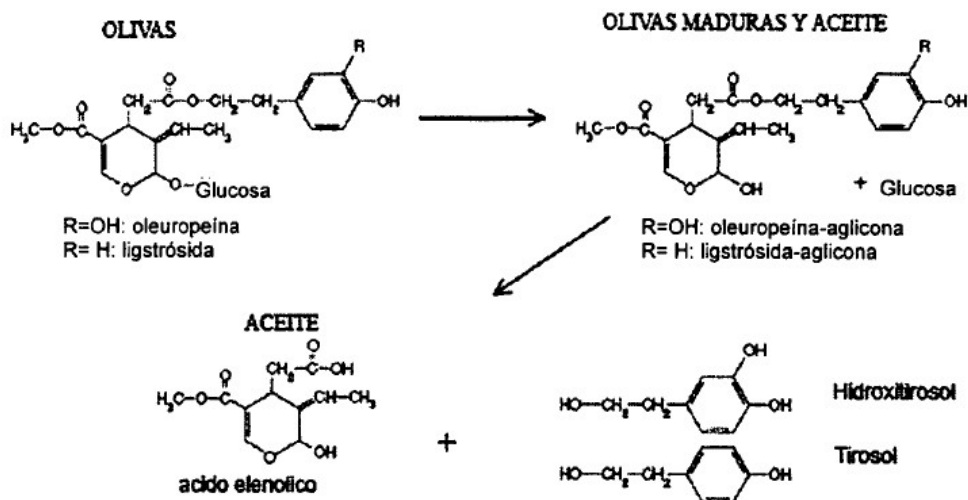


Figura 3. Hidrólisis y degradación parcial de la oleuropeína en el fruto del olivo.

La oleuropeína es un glucósido amargo que se encuentra sobre todo en las hojas del olivo, *Olea europea*, sino también en otras partes de este árbol, incluyendo las raíces, corteza y frutas. El uso medicinal de los extractos de hoja de olivo se remonta a principios de 1800, cuando fueron utilizados en forma líquida como un tratamiento para las infecciones de malaria. Actualmente, ha alcanzado una gran popularidad debido al creciente número de publicaciones científicas que ponen de manifiesto sus efectos saludables en los diferentes ámbitos de la medicina. Éstos compuestos se caracterizan por presentar una elevada capacidad para frenar el estrés oxidativo y neutralizar los radicales libres (Chimi H, et al., 1991). Asimismo, diversos estudios han demostrado otras actividades biológicas, tales como antiagregante plaquetario (Petroni et al., 1995), antioxidante de las lipoproteínas LDL (Manna et al., 2004, Visioli et al., 1995) e inhibidor de las lipooxigenasas (implicadas en el proceso inflamatorio) (de la Puerta et al., 1999), mejorando los síntomas de desórdenes de la piel como la dermatitis, eczemas, psoriasis, así como capacidad para inducir apoptosis en células HL-60 (Della Ragione F, et al., 2000) y actividad in vitro contra bacterias Gram-negativo y Gram-positivo (Bisignano et al., 1999).

Algunos estudios han mostrado que la exposición de células humanas de cáncer de mama altamente agresivas, a extractos fenólicos de aceite de oliva virgen extra (AOVE) enriquecidos con los secoiridoides oleuropeína aglicona y decarboximetil oleuropeína

aglicona, puede inducir vías de señalización intracelular que podrían responder al estrés biológico a nivel molecular o celular. La fuerza de la evidencia que apoya la actividad de estos secoiridoides en la xenohormesis ha sido probada asumiendo que tienen una actividad tumoricida resultante de la activación paradójica por estrés celular de las señales transcriptómicas antiedad de las células cancerígenas (Menéndez y col., 2013).

Estos autores confirmaron que las vías activadas por los secoiridoides AOVE podrían defender las células y los tejidos de una forma similar a la hormesis, ya que regulan el metabolismo energético de tal manera que sería esperable un incremento de la supervivencia celular en momentos de estrés. Además, la actividad anticancerígena de los secoiridoides AOVE estuvo relacionada con la activación por estrés celular de las señales transcriptómicas antiedad de las células cancerígenas, incluyendo el estrés del retículo endoplásmico y la respuesta a proteínas desplegadas, el metabolismo de la espermidina y poliamina y la señalización de la sirtuina-1 (SIRT1) y NRF2. Los secoiridoides AOVE activaron el complejo enzimático AMPK e inhibieron genes cruciales involucrados en el efecto Warburg y la capacidad de autorrenovación de células madre cancerígenas “inmortales”.

Hasta el momento la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA por sus siglas en inglés) ha verificado que *“los polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre frente al daño oxidativo”*, si bien para poder asegurar esta causa-efecto en la protección de los lípidos en sangre frente a la oxidación del colesterol, aspecto mucho más importante que el nivel de colesterol en sí mismo, la EFSA exige a los productos alimentarios que quieran publicitar estos efectos, que aporten un mínimo de *“5 mg diarios de hidroxitirosol y sus derivados (por ejemplo, un complejo de oleuropeína o tirosol)”*, que para el caso del aceite de oliva debieran estar contenidos en 20 g (dos cucharadas de aceite aproximadamente). *“Para que un producto pueda llevar esta declaración, se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 20 g de aceite de oliva”* dice la EFSA en su Lista de declaraciones de propiedades saludables autorizadas, Anexo al Reglamento (UE) nº 432/2012 de la Comisión de 16 de mayo de 2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños.

Con ello, la EFSA ratifica los resultados de numerosas investigaciones y publicaciones, que han demostrado que los polifenoles del olivo hidroxitirosol, oleuropeína y tirosol ayudan a:

- Ejercer acciones antiinflamatorias.
- Mantener una correcta presión sanguínea.
- Contribuir a las defensas.
- Proteger el colesterol LDL de la oxidación.
- Mantener adecuados niveles del protector colesterol HDL.

En este documento se recogen algunas publicaciones y patentes de relevancia relacionadas con los ácidos grasos insaturados y los polifenoles del olivo.

- ✓ Abdullah, K. M., Abdullah, A., Johnson, M. L., Bilski, J. J., Petry, K., Redmer, D. A., Reynolds, L. P. and Grazul-Bilska, A. T. 2003. Effects of Aloe vera open gap junctional intercellular communication and proliferation of human diabetic and nondiabetic skin fibroblasts. *J. Altern. Complement. Med.* 9: 711–718.
- ✓ Aitken RJ, De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14: 727-33.
- ✓ Alland I, Ruiz M. La importancia del factor masculino en Reproducción Asistida. *Rev Ibero Fertil Reprod Hum.* 2010; 27: Suppl 1:S109-S15.
- ✓ Álvarez JG, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit and mouse epididymal spermatozoa: dependence of ratio on temperature and oxygen concentration. *Biol Reprod.* 1985; 32: 342-51.
- ✓ Álvarez JG. Utilidad del ácido docosaheptaenoico en el tratamiento de la infertilidad masculina. *Rev Int Androl.* 2011; 9 (4): 138-144.
- ✓ Alves, D.S.; Pérez-Fons, L.; Estepa, A.; Micol, V. Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin. *Biochem. Pharmacol.* 2004, 68, 549-561.
- ✓ Amarowicz, R., Carle, R., Dongowski, G., Durazzo, A., Galensa, R., Kammerer, D., Maiani, G. & Piskula, M. K. (2009). Influence of postharvest processing and

storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Mol.Nutr.Food Res.* 53 Suppl 2, S151-83.

- ✓ Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Ryan D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst* 2000; 125: 989-1009.
- ✓ Aziz, N. H., Farag, S. E., Mousa, L. A. & Abo-Zaid, M. A. (1998). Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios* 93, 43-54.
- ✓ Barbieri RL. Infertility. En: Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL, editors. *Reproductive Endocrinology*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1999. p. 562-93.
- ✓ Bazoti, F. N., Bergquist, J., Markides, K. E. & Tsarbopoulos, A. (2006). Noncovalent interaction between amyloid-beta-peptide (1-40) and oleuropein studied by electrospray ionization mass spectrometry. *J.Am.Soc.Mass Spectrom.* 17, 568-575.
- ✓ Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gomez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. & Lercker, G. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules* 12, 1679-1719.
- ✓ Benvold E, Gottlieb C, Bygdeman M. Depressed semen quality in Swedish men from barren couples: a study over three decades. *Arch Androl.*1991; 26: 189.
- ✓ Benvold E. 2 semen quality in Norwegian men over 20-year period. *Int J Fertil.* 1989; 34: 401.
- ✓ Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N. & Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J.Pharm.Pharmacol.* 51, 971-974.
- ✓ Boudreau, M.D.; Beland, F.A. An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe Barbadosis* (Miller), *Aloe vera*. *J. Environ. Sci. Health C.* 2006, 24, 103-154.

- ✓ Bracken MB, Eskenazi B, Sachse K, McSharry JE, Hellenbrand K, Leo-Summers L. Association of cocaine use with sperm concentration, motility, and morphology. *Fertil Steril.* 1990; 53: 315-22.
- ✓ Brenes Balbuena M, Castro a. obtaining of antioxidant substances from solutions of the process of production of table olives. Patent is 2186467 (2003).
- ✓ Capasso R, Evidente A, Avolio S, Solla F. A highly convenient synthesis of hydroxytyrosol and its recovery from agricultural waste waters. *J Agr. Food Chem.* (1999) 47:1745-1748.
- ✓ Carluccio, M. A., Siculella, L., Ancora, M. A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., Visioli, F., Distante, A. & De Caterina, R. (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 23, 622-629.
- ✓ Caturla, N., Perez-Fons, L., Estepa, A. & Micol, V. (2005). Differential effects of oleuropein, a biophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes. *Chem.Phys.Lipids* 137, 2-17.
- ✓ Chandan, B.K., Saxena, A.K., Shukla, S., Sharma, N., Gupta, D.K., Suri, K.A., Suri, J., Bhadauria, M., Singh, B. 2007. Hepatoprotective potential of *Aloe barbadensis* Mill. Against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *J. Ethnopharmacol.* 111, 560-566.
- ✓ Chimi H, Cillard J, Cillard P, Rahmani M. (1991).
- ✓ Chithra, P., Sajithlal, G. B. and Chandrakasan, G. 1998. Influence of *Aloe vera* on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. *J. Ethnopharmacol.* 59: 179– 186.
- ✓ Chithra, P., Sajithlal, G. B. and Chandrakasan, G. 1998. Influence of *Aloe vera* on the healing of dermal wounds in diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 59: 195– 201.
- ✓ Chithra, P., Sajithlal, G. B. and Chandrakasan, G. 1998. Influence of *Aloe vera* on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. *Mol. Cell Biochem.* 181: 71–76.

- ✓ Choi, S-W.; Son, B-W.; Son, Y-S.; Park, Y-I.; Lee, S-K.; Chung, M-H. The wound healing effect of a glycoprotein fraction isolated from aloe vera. *Br. J. Dermatol.* 2001, 145, 535-545.
- ✓ Chow, J.T-N.; Williamson, D.A.; Yates, K.M.; Goux, W.J. Chemical characterisation of the immunomodulating polysaccharide of Aloe vera L. *Carbohydr. Res.* 2005, 340, 1131-1142.
- ✓ Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J. & Keast, R. S. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit.Rev.Food Sci.Nutr.* 49, 218-236.
- ✓ COI/T.20/Doc. No. 29 November 2009. Determination of the biofenoles of the oils of olive by HPLC.
- ✓ Colpi GM, Roveda ML, Tognetti A, Balerna M. Seminal tract inflammation and male infertility. Correlations between leukospermia and clinical history, prostatic cytology, conventional semen parameters, sperm viability and seminal plasma protein composition. *Acta Eur Fertil.* 1988; 19: 69-77.
- ✓ Coni, E., Di Benedetto, R., Di Pasquale, M., Masella, R., Modesti, D., Mattei, R. & Carlini, E. A. (2000). Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids* 35, 45-54.
- ✓ Corona, G., Spencer, J. P. & Dessi, M. A. (2009). Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract. *Toxicol.Ind.Health* 25, 285-293.
- ✓ Council of the European Union – 9507/04 – 2586th Council Meeting – 1 and 2 June 2004
- ✓ Dal’Belo, S.E.; Gaspar, L.R.; Berardo Goncalves Maia Campos, P.M. Moisturising effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. *Skin Res. Technol.* 2006, 12, 241-246.
- ✓ De la Fuente P., Chamorro P., Moreno M., Poza M.A. Propiedades antioxidantes del hidroxitirosol procedente de la hoja de olivo (*Olea europaea* L.). *Revista de Fitoterapia* 2004; 4 (2): PI-PF .

- ✓ de la Puerta, R., Ruiz Gutierrez, V. & Hault, J. R. (1999). Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem.Pharmacol.* 57, 445-449.
- ✓ Della Ragione F, Cucciolla V, Borriello A, Della Pietra V, Pontoni G, Racioppi L, Manna C, Galletti P, Zappia V. (2000).
- ✓ Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union – *European Heart Journal*
- ✓ Espin de Gea JC, Soler Rivas C, Wichers HJ, Tomás Barberán FA, García Viguera C, Ferreres de Arce F. Síntesis enzimática del antioxidante hidroxitirosol. Patente ES 2170006 (2002).
- ✓ Esteban Pelayo Villarejo. PhD work for the University Miguel Hernández. September 21, 2006. Tutor: Dr. Domingo Saura. Technological surveillance and economic intelligence for the juice industry. Practical application in the case of functional juices and nutraceuticals derived from olives, Rosemary and artichokes
- ✓ European Cardiovascular Disease Statistics – British Heart Foundation and European Heart Network – 2005
- ✓ Fernandez-Bolanos Guzman J, Heredia Moreno A, Felizon Becerra B, Brenes Balbuena M, Guillén Bejarano R, Rodriguez Arcos R. procedure for obtaining of hydroxytyrosol from olives bone. Patent is 2145701 (2000).
- ✓ Fernandez-Bolanos J, Heredia Moreno A, Rodriguez Gutierrez G, Rodríguez Arcos R, Jiménez Araujo A, Guillen Bejarano R. improvements introduced in the main No. 200002422 patent relating to a procedure for obtaining of hydroxytyrosol purified from products and by-products derived from the olive tree. Patent is 2177457 (2002).
- ✓ Fernandez-Bolanos, J., Rodriguez, G., Rodriguez, R., Heredia, A., Guillen, R. & Jimenez, A. (2002). Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "Alperujo". *J.Agric.Food Chem.* 50, 6804-6811.
- ✓ Fito, M., de la Torre, R. & Covas, M. I. (2007). Olive oil and oxidative stress. *Mol.Nutr.Food Res.* 51, 1215-1224.

- ✓ Fleming, H. P., Walter, W. M., Jr & Etchells, J. L. (1973). Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *Appl. Microbiol.* 26, 777-782.
- ✓ Furneri, P. M., Marino, A., Saija, A., Uccella, N. & Bisignano, G. (2002). In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *Int. J. Antimicrob. Agents* 20, 293-296.
- ✓ Garrido N, Remohi J, Martínez-Conejero JA, García-Herrero S, Pellicer A, Messeguer M. Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. *Reprod Biomed Online.* 2008; 17: 855-65.
- ✓ German, J. B. & Walzem, R. L. (2000). The health benefits of wine. *Annu. Rev. Nutr.* 20, 561-593.
- ✓ Golde, T. E. & Eckman, C. B. (2001). Cholesterol modulation as an emerging strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Discov. Today* 6, 1049-1055.
- ✓ Góngora-Rodríguez A, Fontanilla-Ramírez D. La fragmentación del ADN espermático, influencia sobre las técnicas de Reproducción Asistida y la calidad embrionaria. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2010; 2 (61): 160-64.
- ✓ González F, González AL, Martínez L, Fontes J, Martínez FL, Moliní JL, et al. Esterilidad general I. En: Matorras R, Hernandez J, editores. Estudio y tratamiento de la pareja estéril. Recomendaciones de la SEF con la colaboración de ASEBIR, AEA y SEC. 1ª ed. Madrid: Adalia; 2007. p. 3-72.
- ✓ González Ravina C, Pacheco A. Implementación de los nuevos criterios de la OMS en la práctica clínica. *Rev Asoc Est Biol Rep.* 2011; 16 (1).
- ✓ Goulas, V., Exarchou, V., Troganis, A. N., Psomiadou, E., Fotsis, T., Briasoulis, E. & Gerothanassis, I. P. (2009). Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 600-608.
- ✓ Granados-Principal, S., Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, C. L., Sanchez-Rovira, P. & Ramirez-Tortosa, M. C. (2010). Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr. Rev.* 68, 191-206.

- ✓ Grignaffini P, Roma P, Galli C, Catapano AL. Protection of low-density lipoprotein from oxidation by 3,4-dihydroxyphenylethanol. *Lancet* 1994; 343(8908):1296-7
- ✓ Habeeb, F.; Shakir, E.; Bradbury, F.; Cameron, P.; Taravati, M.R.; Drummond, A.J.; Gray, A.I.; Ferro, V.A. Screening methods used to determine the anti-microbial properties of Aloe vera inner gel. *Methods*. 2007, 42, 315-320.
- ✓ Hamdi, H. K. & Castellon, R. (2005). Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 334, 769-778.
- ✓ Hamman, J.H.; Viljoen, A.M. Use of Aloe vera for increasing the bioavailability of poorly absorbable drugs. 2008. SA patent application 2008/01542.
- ✓ Han, J., Talorete, T. P., Yamada, P. & Isoda, H. (2009). Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology* 59, 45-53.
- ✓ Hardie, D.G., Ross, F.A. & Hawley, S.A. AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern. (2012). *Chem Biol.* 26;19(10):1222-36.
- ✓ Hardie, D.G., Ross, F.A. & Hawley, S.A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. (2012). *Nat Rev Mol Cell Biol.* 22;13(4):251-62.
- ✓ Hawley, S.A., Fullerton, M.D., Ross, F.A., Schertzer, J.D., Chevtzoff, C., Walker, K.J., Peggie, M.W., Zibrova, D., Green, K.A., Mustard, K.J., Kemp, B.E., Sakamoto, K., Steinberg, G.R. & Hardie, D.G. The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. (2012). *Science* 18;336(6083):918-22.
- ✓ Hedner, T. & Everts, B. The early clinical history of salicylates in rheumatology and pain. (1998). *Clin Rheumatol.* 17(1):17-25.
- ✓ Hofman, A., Ott, A., Breteler, M. M., Bots, M. L., Slooter, A. J., van Harskamp, F., van Duijn, C. N., Van Broeckhoven, C. & Grobbee, D. E. (1997). Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* 349, 151-154.

- ✓ Im, S-A.; Oh, S-T.; Song, S.; Kim, M-R.; Kim, D-S.; Woo, S-S.; Jo, T.H.; Park, Y.I; Lee, C-K. Identification of optimal molecular size of modified Aloe polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. *Int. Immunopharmacol.* 2005, 5, 271-279.
- ✓ Kimura, Y. & Sumiyoshi, M. (2009). Olive leaf extract and its main component oleuropein prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice. *J.Nutr.* 139, 2079-2086.
- ✓ Koehn F.E. & Carter G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. (2005). *Nat Rev Drug Discov.* 4(3):206-20.
- ✓ Lavee S, Harshemesh H, Avidan N. Phenolic acids-possible involvement in regulating growth and alternate fruiting in olive trees. *Acta Hort* 1986; 179: 317-328.
- ✓ Lavee S. Involvement of plant regulators and endogenous growth substances in the control of alternate bearing. *Acta Hort* 1989; 239:311-322
- ✓ Lee, J.H., Bodmer. R., Bier, E. & Karin, M. Sestrins at the crossroad between stress and aging. (2010) *Aging (Albany NY)* 2(6):369-74.
- ✓ Lenzi A, Gandini L, Maresca V, Rago R, Sgro P, Dondero F, et al. Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6 (3): 226-31.
- ✓ Lerchl A. Evidence for decreasing quality of sperm. *Br Med J.*1995; 311: 569-74.
- ✓ Leridon H. Studies of fertility and fecundity: comparative approaches from demography and epidemiology. *C R Biol.* 2007; 330: 339-46.
- ✓ Lévesque, H. and Lafont, O. Aspirin throughout the ages: a historical review. (2000). *Rev Med Interne* 21 Suppl 1:8s-17s.
- ✓ Li, J.W.H., & Vederas, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? (2009). *Science* 325 no. 5937, 161-165.
- ✓ Lin DS, Neuringer M, Connor WE. Selective changes of docosahexaenoic acid-containing phospholipid molecular species in monkey testis during puberty. *J Lipid Res.* 2004; 45(3):529-35.

- ✓ Luxembourg Declaration - 29 June 2005 European Charter on Cardiovascular Health
- ✓ Ma, S. C., He, Z. D., Deng, X. L., But, P. P., Ooi, V. E., Xu, H. X., Lee, S. H. & Lee, S. F. (2001). In vitro evaluation of secoiridoid glucosides from the fruits of *Ligustrum lucidum* as antiviral agents. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)* 49, 1471-1473.
- ✓ Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moliterno O, Leone A, Zappia V. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl).ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *J Nutr* 1997; 127: 286-292.
- ✓ Manna, C., Migliardi, V., Golino, P., Scognamiglio, A., Galletti, P., Chiariello, M. & Zappia, V. (2004). Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *J.Nutr.Biochem.* 15, 461-466.
- ✓ Markesbery, W. R. & Carney, J. M. (1999). Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 9, 133-146.
- ✓ Martínez-Soto JC, Domingo JC, Cordobilla B, Palbero L, Pellicer A, Landeras J. Effect of dietary DHA supplementation on sperm DNA integrity. *Fertil Steril.* 2010; 94 (4): S235-S36.
- ✓ Martin-Pelaez, S., Covas, M. I., Fito, M., Kusar, A. & Pravst, I. (2013). Health effects of olive oil polyphenols: recent advances and possibilities for the use of health claims. *Mol.Nutr.Food Res.* 57, 760-771.
- ✓ McChesney J.D., Venkataraman S.K. & Henri J.T. Plant natural products: back to the future or into extinction? (2007). *Phytochemistry* 68(14):2015-22.
- ✓ Menendez, J. A., Joven, J., Aragonés, G., Barrajon-Catalán, E., Beltrán-Debón, R., Borrás-Linares, I., Camps, J., Corominas-Faja, B., Cufí, S., Fernández-Arroyo, S., García-Heredia, A., Hernández-Aguilera, A., Herranz-López, M., Jiménez-Sánchez, C., López-Bonet, E., Lozano-Sánchez, J., Luciano-Mateo, F., Martín-Castillo, B., Martín-Paredero, V., Pérez-Sánchez, A., Oliveras-Ferraro, C., Riera-Borrull, M., Rodríguez-Gallego, E., Quirantes-Piné, R., Rull, A., Tomás-Menor, L., Vazquez-Martin A., Alonso-Villaverde, C., Micol, V. & Segura-Carretero, A. (2013). Xenohormetic and anti-aging activity of

secoiridoid polyphenols present in extra virgin olive oil. A new family of gerosuppressant agents. *Cell Cycle* 15; 12(4): 555–578.

- ✓ Menendez, J. A., Vazquez-Martin, A., Colomer, R., Brunet, J., Carrasco-Pancorbo, A., Garcia-Villalba, R., Fernandez-Gutierrez, A. & Segura-Carretero, A. (2007). Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer* 7, 80.
- ✓ Micol, V., Caturla, N., Perez-Fons, L., Mas, V., Perez, L. & Estepa, A. (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Res.* 66, 129-136.
- ✓ Molinari G. Natural products in drug discovery: present status and perspectives. (2009). *Adv Exp Med Biol* 655:13-27.
- ✓ Moosmann, B. & Behl, C. (1999). The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96, 8867-8872.
- ✓ Mousa, S.A., Gallati, C., Simone, T., Dier, E., Yalcin, M., Dyskin, E., Thangirala, S., Hanko, C. & Rebbaa, A. Dual targeting of the antagonistic pathways mediated by Sirt1 and TXNIP as a putative approach to enhance the efficacy of anti-aging interventions. (2009). *Aging (Albany NY)* 31;1(4):412-24.
- ✓ Muzzalupo, I., Stefanizzi, F., Perri, E. & Chiappetta, A. A. (2011). Transcript levels of CHL P gene, antioxidants and chlorophylls contents in olive (*Olea europaea* L.) pericarps: a comparative study on eleven olive cultivars harvested in two ripening stages. *Plant Foods Hum.Nutr.* 66, 1-10.
- ✓ Ollero M, Powers D, Álvarez JG. Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage. *Mol Reprod Dev.* 2000; 55: 326-34.
- ✓ Omar, S. H. (2010). Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci.Pharm.* 78, 133-154.
- ✓ Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Wurtele, G., Spiegelhalder, B. & Bartsch, H. (2000). Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol.* 1, 107-112.

- ✓ PAT EP 1582512 process for hydroxytyrosol from leaf extracts of olive using acid hydrolysis at a temperature of 70 ° c to 100 ° C for approximately 4 hours.
- ✓ PAT EU 03078256. 9. Use of an extract of leaves of Olea Europea as an antiradical in the field of cosmetics
- ✓ PAT IT 01326553 oil olive enriched by the addition of extracts from leaves of olive or olive oil process wastewater at the olive oil.
- ✓ PAT US 2002/0058078 process for the production of hydroxytyrosol from vegetation water that involves acidifying the water and incubate for at least two months.
- ✓ PAT US 5998641 process of increase in the content of polyphenols in olive oil without increasing bitterness, using emulsified olive oil with an aqueous solution containing polyphenols and an enzyme to desamargar (i.e. β -glucosidase).
- ✓ PAT US-A-6162480 vegetable oil antioxidant enrichment method.
- ✓ PAT US-B1-6746706 method of enrichment of compositions of food (cream spreads, vinaigrette, tomato sauce), where they contain a 20-100% of an aqueous phase characterised by a content between 15 ppm and 50 ppm for together tyrosol and hydroxytyrosol.
- ✓ PAT US-B1-6942890 method to enrich foods by adding to these solid materials from the olive, which requires the incubation during a certain time of food that will enrich,
- ✓ PAT US-B-6361803 using organic solvents, in particular polar solvents, in order to produce an olive extract containing hydroxytyrosol with an acceptable purity.
- ✓ PAT WO 2004/005237. Method of preparing hydroxytyrosol esters, esters thus obtained and use of same
- ✓ PAT WO 2007/1074490 process to obtain triacetilhidroxitirosol from vegetation water of mill that involves the removal of the vegetation water of with organic solvents and acetylation of the dissolution reaction thus obtained.
- ✓ PAT WO 2011/141611 A. Oleoeuropein composition for healing wouds and ulcers in elderly people and/or diabetics

- ✓ PAT WO/2004/009206 method of extracting phenolic compounds from a residual plant material using a hydrothermal process.
- ✓ PAT's 2 233 208 method for the enzymatic preparation of antioxidant compounds in fruits and leaves of the olive tree
- ✓ PAT's 2 291 111 industrial use of tyrosol and hydroxytyrosol contained in the solid byproducts of the industrial pressing of olives, through its solvent extraction.
- ✓ Peroxyl and hidroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *JAOCS* 1991; 68, 307-312.
- ✓ Petroni, A., Blasevich, M., Salami, M., Papini, N., Montedoro, G. F. & Galli, C. (1995). Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb.Res.* 78, 151-160.
- ✓ Pflieger-Bruss S, Schuppe HC, Schill WB. The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. *Androl.* 2004; 36: 337-45.
- ✓ Pugh, N.; Ross, S.A.; ElSohly, M.A.; Pasco, D.S. Characterisation of aloeride, a new highmolecular-weight polysaccharide from Aloe vera with potent immunostimulatory activity. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1030-1034.
- ✓ Raederstorff, D. (2009). Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: a review. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.* 79, 152-165.
- ✓ Ragione, F.D., Cucciolla, V., Borriello, A., Pietra, V.D., Pontoni, G., Racioppi, L., Manna, C., Galletti, P. & Zappia, V. Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Com* 2000; 278: 733-739. .
- ✓ Refolo, L. M., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G. S., Sambamurti, K., Duff, K. & Pappolla, M. A. (2000). Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol.Dis.* 7, 321-331.
- ✓ Regulation (EU) no 432/2012 of the Commission of 16 may 2012 (1), by establishing a list of authorised health claims of foods other than those relating to the reduction of disease risk and to children's health and development

- ✓ Reynolds, T.; Dweck, A.C. Aloe vera leaf gel: a review update. *J. Ethnopharmacol.* 1999, 68, 3-37.
- ✓ Roberts, D. B. and Travis, E. L. 1995. Acemannan-containing wound dressing gel reduces radiation-induced skin reactions in C3H mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 32: 1047–1052.
- ✓ Ryan, D., Prenzler, P. D., Lavee, S., Antolovich, M. & Robards, K. (2003). Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *J.Agric.Food Chem.* 51, 2532-2538.
- ✓ Salminen, A. & Kaarniranta, K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. (2012). *Ageing Research Reviews* 11(2), 230–241.
- ✓ Schmid TE, Eskenazi B, Marchetti G, Young S, Weldon RH, Baumgartner A et al. Micronutrients intake is associated with improved sperm DNA quality in older men. *Fertil Steril.* 2012; 98(5)-1130-37.
- ✓ Seftel A. Male hypogonadism. Part II: etiology, pathophysiology, and diagnosis. *Int J Impot Res.* 2006; 18: 223-28.
- ✓ Seshagiri PB. Molecular insights into the causes of male infertility. *J Biosci.* 2001; 26: 429-35.
- ✓ Spira A, Multigner L. Epidemiology of infertility in 1998. Sperm density and environment. En: Filicori M, Flamigni C, editors. *Treatment of infertility: the new frontiers.* 1st ed. Princeton Junction, New Jersey: Communication Media for Education; 1998.
- ✓ Steenkamp, V.; Stewart, M.J. Medicinal applications and toxicological activities of Aloe products. *Pharm. Biol.* 2007, 45, 411-420.
- ✓ Sudjana, A. N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, T. V. & Hammer, K. A. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *Int.J.Antimicrob.Agents* 33, 461-463.
- ✓ Tanaka, M., Misawa, E., Ito, Y., Habara, N., Nomaguchi, K., Yamada, M., Toida, T., Hayasawa, H., Takase, M., Inagaki, M., Higuchi, R. 2006.

Identification of five phytosterols from Aloe vera gel as anti-diabetic compounds. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1418-22.

- ✓ Tassou, C. C. & Nychas, G. J. (1995a). Inhibition of *Salmonella enteritidis* by oleuropein in broth and in a model food system. *Lett. Appl. Microbiol.* 20, 120-124.
- ✓ Tassou, C. C. & Nychas, G. J. (1995b). Inhibition of *Salmonella enteritidis* by oleuropein in broth and in a model food system. *Lett. Appl. Microbiol.* 20, 120-124.
- ✓ Tassou, C. C., Nychas, G. J. & Board, R. G. (1991). Effect of phenolic compounds and oleuropein on the germination of *Bacillus cereus* T spores. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 13, 231-237.
- ✓ Tranter, H. S., Tassou, S. C. & Nychas, G. J. ((1993). The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 253-259.
- ✓ Van Wyk, B.E., van Rheed, van Oudtshoorn, M.C., Smith, G.F. 1995. Geographical variation in the major compounds of *Aloe ferox* leaf exudate. *Planta Med.* 61, 250-3.
- ✓ Vane, J.R. The fight against rheumatism: from willow bark to COX-1 sparing drugs.(2000) *J Physiol Pharmacol.* 51(4 Pt 1):573-86.
- ✓ Vazquez, B.; Avila, G.; Segura, D.; Escalante, B. Antiinflammatory activity of extracts from Aloe vera gel. *J. Ethnopharmacol.* 1996, 55, 69-75.
- ✓ Vinson, J.A.; Al Kharrat, H.; Andreoli, L. Effect of Aloe vera preparations on the human bioavailability of vitamins C and E. *Phytomedicine* 2005, 12, 760-765.
- ✓ Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols, *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247, 60-64.
- ✓ Visioli, F. & Galli, C. (1998). The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr. Rev.* 56, 142-147.
- ✓ Visioli, F. & Galli, C. (2001). Antiatherogenic components of olive oil. *Curr. Atheroscler. Rep.* 3, 64-67.

- ✓ Visioli, F., Bellomo, G., Montedoro, G. & Galli, C. (1995). Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 117, 25-32.
- ✓ Visioli, F., Bellosta, S. & Galli, C. (1998). Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci.* 62, 541-546.
- ✓ Visioli, F., Caruso, D., Galli, C., Viappiani, S., Galli, G. & Sala, A. (2000). Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 278, 797-799.
- ✓ Walter, W. M., Jr, Fleming, H. P. & Etchells, J. L. (1973). Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Appl.Microbiol.* 26, 773-776.
- ✓ World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 1999.
- ✓ World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 5th ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 2010.
- ✓ Wyrobek J, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 9601–6.
- ✓ Xu, J., Ji, J. & Yan, X.H. Cross-talk between AMPK and mTOR in regulating energy balance. (2012). *Crit Rev Food Sci Nutr* 52(5):373-81.
- ✓ Yagi, A., Tsunoda, M., Egusa, T., Akasaki, K., Tsuji, H. 1998. Immunochemical distinction of Aloe vera, *A. Arborescens* and *A. Chinensis* gel [letter]. *Planta Med.* 64, 277-8.
- ✓ Zenzes MT. Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod Update.* 2000; 6: 122-31.

- ✓ Zhang, L.; Tizard, I.R. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: The major carbohydrate fraction from Aloe vera. *Immunopharmacology* 1996, 35, 119-128.