



Estudi de la toxicitat i biodisponibilitat de l'àcid maslínic

Marta Sánchez González



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NoDerivatives 3.0. Spain License.**



Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia

Departament de Fisiologia

**ESTUDI DE LA TOXICITAT I BIODISPONIBILITAT
DE L'ÀCID MASLÍNIC**

Marta Sánchez González

Barcelona, 2014



Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia
Departament de Fisiologia

Programa de doctorat:
Alimentació i Nutrició

Institut de Nutrició i Seguretat Alimentària

ESTUDI DE LA TOXICITAT I BIODISPONIBILITAT DE L'ÀCID MASLÍNIC

Memòria presentada per **Marta Sánchez González** per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Directores:

Dra. Joana Maria Planas Rosselló
Catedràtica de Fisiologia

Dra. Maria Emília Juan Olivé
Professora Agregada de Fisiologia

Tutora:

Doctoranda:

Dra. M. Carmen López Sabater
Catedràtica de Nutrició i Bromatologia

Marta Sánchez González

Marta Sánchez González
Barcelona, 2014

JOANA MARIA PLANAS ROSSELLÓ, Catedràtica d'Universitat de Fisiologia del Departament de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia, i MARIA EMÍLIA JUAN OLIVÉ, Professora Agregada del Departament de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia,

INFORMEN:

Que la memòria titulada "Estudi de la toxicitat i biodisponibilitat de l'àcid maslínic", presentada per MARTA SÁNCHEZ GONZÁLEZ, per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona ha estat realitzada sota la seva direcció en el Departament de Fisiologia i, considerant-la conclosa, autoritzen la seva presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I per a que així consti, signen la present,

Dra. Joana Maria Planas Rosselló

Dra. Maria Emília Juan Olivé

Barcelona, 28 de juliol de 2014

Aquesta tesi ha estat subvencionada pel Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2009-12866) i la Generalitat de Catalunya (2009-SGR-471). Durant la seva realització, l'autora ha gaudit d'una beca de col·laboració en el projecte *Grup de Fisiologia i Nutrició Experimental (FINEX)*, ref. 2009SGR471 (01/04/2011 a 31/01/2013), d'una *Beca per a la Iniciació de la Tesi Doctoral (BIT)* ref. FFAR2012, de la facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona (01/02/2013 a 31/01/2014) i d'una beca de col·laboració en el projecte ref. 306444 de la Fundació Bosch i Gimpera amb codi de convocatòria 02/2014-10 (01/03/2014 a 31/12/2014). El laboratori d'Anàlisis Clínics del CAP Just Oliveres (Hospitalet del Llobregat), va realitzar les determinacions de les variables hematològiques i bioquímiques del capítol 2. L'assistència a congressos ha estat subvencionada amb borses de viatge concedides per la Comissió de Recerca de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

A mi marido Edgar,
a mi hermana Taty y
a mis padres Lucre y Vicens

LIFE
SCIENCES



En primer lloc, voldria agrair a la Dra. Joana M. Planas que em lliurés l'oportunitat de poder realitzar la tesi doctoral en el seu grup i sota la seva direcció. El meu aprenentatge envers la recerca ha superat amb escreix el que mai podria haver imaginat un cop vaig acabar Ciència i Tecnologia dels Aliments. Els coneixements assolits han estat moltíssims i els consells rebuts, infinits. Tant durant el Màster Experimental, com després en el Màster Oficial i finalment en el Doctorat, sempre ha disposat d'un moment per ajudar-me i escoltar les meves preguntes. Gràcies per acompanyar-me i donar-me ànims durant aquest viatge al voltant del món de la ciència.

A la Dra. M. Emília Juan, per ser més que la meva directora, una companya i una amiga en tot aquest temps. Gràcies per donar-me paciència amb l'HPLC-MS, per quedar-te amb mi analitzant aquells excels interminables, per ajudar-me en la publicació dels articles, per evitar que embogís durant la "recerca" dels metabòlits a l'Orbitrap, per riure quan feia falta i per donar-me la mà cada cop que el món semblava enfonsar-se. Gràcies per tot.

A la Glòria Lozano, òbviament!!!! Ella ha estat el meu peu dret en aquest camí, la meva mà esquerra al laboratori, l'altra costat de la balança, la meva gran gran companya durant aquesta etapa. Són molts els moments compartits i les situacions viscudes. Sempre recordaré els veïns de dalt del congrés de Madrid, els vídeos del "Horny the pig", la nostra amiga "Clotilde", les pedres a sobre del cap, les sabates del teu amor platònic, les batalles per decidir si Rac105 o Kiss FM... Per sempre seràs la millor companya del món!

A la Dra. Lluïsa Miró, per ser la meva germana gran dins el laboratori! Per guiar-me quan no veia sortida, per ajudar-me sempre, però sobretot en aquesta etapa final. Sempre disposada a escoltar i donar ànims! Moltes gràcies!

A la Dra. Anna Pérez, el Dr. Miquel Moretó i la Dra. Conxita Amat, per ser atents i amables amb mi en tot moment i per ser-hi sempre presents donant consells i resposta a totes les meves preguntes.

A tots els alumnes de treball dirigit, màster o Erasmus que han passat pel laboratori i han ajudat que aquesta tesi sigui possible. Sobretot a la Mariona Vicente, la Tatiana, la Saskia i la Cristina Camps, per tots els moments compartits i estones distretes que hem viscut!

A tots els membres del Departament de Fisiologia, per fer del lloc de feina una gran família, sempre disposats a ajudar-se els uns als altres.

A la Dra. Helena Colom, per totes les tardes que vaig passar al seu despatx aprenent cada dia més i més sobre una gran desconeguda per mi, la farmacocinètica. Mai hagués pensat

que arribaria a tenir tants coneixements en aquest camp i tot gràcies a la seva paciència. Ha estat un plaer escriure un dels meus articles amb tu!

Al personal dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona, sobretot als Drs. Isidre Casals i Olga Jáuregui pels bons consells rebuts així com al Dr. Alberto Adeva i al David Bellido per l'ajuda proporcionada cada dia. Sense ells, gran part d'aquesta tesi no hauria estat possible. La seva paciència amb mi mai ha tingut límits i sempre han respòs a totes les preguntes i curiositats que tenia sobre l'espectrometria de masses. Gràcies per fer-me adonar que el laboratori i l'anàlisi són la meva gran passió i que és el que més feliç em fa.

A tot el personal de l'estabulari, especialment a la Dra. Teresa Rodrigo per ajudar-me amb els procediments de recerca i a la Marta, el David i la Paula per ensenyar-me l'administració intravenosa a rates i per cuidar de les meves ratetes quan jo no hi era. Sou molts bons i imprescindibles per la recerca, no ho oblideu.

A la Dra. M. Carmen López, per ser el meu primer contacte amb la recerca, guiar els meus primers passos i ajudar-me sempre que ho he sol·licitat. Has estat una gran tutora!

Al Dr. Jordi Morel, per ser el meu corrector del català en un temps rècord i tenir la paciència d'explicar-me cada una de les lleis d'ortografia i gramàtica d'aquest gran idioma.

A les meves amigues de la Universitat, l'Anna i la Cris! Sempre recolzant-me i fent-me costat envers totes les adversitats del camí. Acompanyant-me tant a nivell acadèmic com personal. Gràcies!

A mis amigos de siempre, Cristina, Javi, Marta y Jofre. Por escucharme y soportarme durante esta dura etapa y darme ánimos para disfrutarla. Gracias por creer en mí, por estar en los momentos buenos y malos y por amenizar cada fin de semana.

¡No podría olvidarme de mi Archi aunque quisiera! Gracias Alberto por estar ahí y hacerme olvidar los problemas de la tesis aunque sea a costa de hacerme rabiar! ¡Jajaja! ¡Nos vemos en la próxima partida!

A mi familia, abuelos/as, tíos/as, primos/as... Todos vosotros tenéis una parte importante de esta historia. Siempre apoyándome y preguntando: ¿Cómo van las ratas? Jejeje. Os quiero y sois todos imprescindibles para que mi gran proyecto llegara a buen puerto. Gracias.

A mis padres, Lucre y Vicens. Sin ellos y sin su cariño habría sido imposible y una quimera que yo llegara tan lejos. Gracias por estar siempre y de forma incondicional a mi lado y celebrar todos mis logros conmigo. He conseguido una meta que jamás habría soñado y

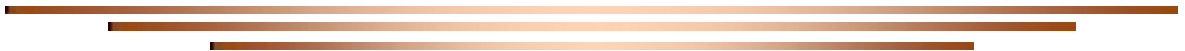
todo gracias a vuestra perseverancia y en creer que soy capaz de conseguir cualquier cosa.
Muchas gracias.

A mi perrito y fiel amigo Brownie. Gracias por tus lametones, por jugar conmigo y distraerme de los problemas, eres más que un animal de compañía y tú también has sido imprescindible durante todo este tiempo para mí.

A mi hermana Taty. Por estar siempre donde te necesito, por escucharme y apoyarme. Por creer y confiar en mí, por compartir largas conversaciones de teléfono sobre nuestros problemas. Por preguntarme: ¿Cómo van las máquinas? ¿Aún van bien o ya se han roto? Por pensar en mí y en mis ratitas y por intentar entender lo que te explicaba. ¡¡Gracias gracias gracias!!

Y, finalmente, a mi pareja, marido, compañero y amigo Edgar. Tú has estado en los momentos más oscuros y en los más alegres, has sido el pilar de mi confianza y has creído en mí sin reservas. Siempre creyendo y pensando que llegaría muy lejos. Gracias por compartir conmigo toda esta etapa y toda mi vida.

ÍNDEX



ÍNDEX	I
ÍNDEX DE FIGURES	V
ÍNDEX DE TAULES	VI
ABREVIATURES	VII
RESUM DE LA TESI	i
I. INTRODUCCIÓ	1
1.1. L'àcid maslínic	1
1.1.1. Característiques químiques i físiques	1
1.1.2. Biosíntesi de l'àcid maslínic a plantes	1
1.2. Fonts de l'àcid maslínic: aliments i plantes	3
1.2.1. Fonts alimentàries	3
a) Olives	3
b) Oli d'oliva	5
c) Vegetals, fruites i condiments	7
1.2.2. Plantes medicinals	8
1.3. Propietats biològiques de l'àcid maslínic	9
1.3.1. Antitumoral	9
a) Càncer de còlon	9
b) Càncer de fetge	9
c) Càncer de mama	10
d) Càncer de pròstata	10
e) Astrocitomes	10
1.3.2. Antioxidant	10
1.3.3. Antidiabètic	11
1.3.4. Antiinfecció	11
1.3.5. Cardioprotector	12
1.3.6. Neuroprotector	13
1.4. Farmacocinètica	13
1.4.1. Absorció	13
1.4.2. Distribució	15
1.4.3. Metabolisme	16

1.4.4. Excreció de l'organisme	17
1.4.5. Anàlisi farmacocinètic	18
a) Model monocompartimental. Administració per bolus intravenós	18
b) Model monocompartimental. Administració extravascular	20
c) Model bicompartimental. Administració per bolus intravenós.....	22
d) Model bicompartimental. Administració extravascular	25
1.4.6. Farmacocinètica poblacional.....	25
a) Mètode en dos fases.....	27
b) Model d'efectes mixtos no lineals.....	27
II. PLANTEJAMENT I OBJECTIUS	31
III. RESULTATS.....	33
3.1. CAPÍTOL 1. POSADA A PUNT I VALIDACIÓ D'UN MÈTODE PER A LA DETERMINACIÓ DE L'ÀCID MASLÍNIC EN PLASMA	35
3.1.1. Resum de l'article 1.....	37
PUBLICACIÓ 1. Determinació en plasma per cromatografia líquida d'alta eficàcia acoblada a espectrometria de masses de l'àcid maslínic, un component bioactiu de l' <i>Olea europaea</i> L.	
<u>Marta Sánchez-González</u> , Glòria Lozano-Mena, M. Emília Juan, Andrés García-Granados and Joana M. Planas. Líquid chromatography-mass spectrometry determination in plasma of maslinic acid, a bioactive compound from <i>Olea europaea</i> L. <i>Food Chem.</i> 141, 4375-4381, 2013.....	39
3.2. CAPÍTOL 2. ESTUDI TOXICOLÒGIC DE L'ÀCID MASLÍNIC	47
3.2.1. Resum de l'article 2.....	49
PUBLICACIÓ 2. Avaluació de la seguretat de l'àcid maslínic, un component bioactiu de l' <i>Olea europaea</i> L.	
<u>Marta Sánchez-González</u> , Glòria Lozano-Mena, M. Emília Juan, Andrés García-Granados and Joana M. Planas. Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from <i>Olea europaea</i> L. <i>Mol. Nutr. Food Res.</i> 57, 339-346, 2013.....	51
3.3. CAPÍTOL 3. DESENVOLUPAMENT D'UN MODEL FARMACOCINÈTIC DE L'ÀCID MASLÍNIC SEGUINT UNA APROXIMACIÓ POBLACIONAL	59
3.3.1. Resum de l'article 3.....	61

	PUBLICACIÓ 3. Farmacocinètica poblacional de l'àcid maslínic, un triterpè de les olives, després de l'administració intravenosa i oral a rata.	
	<u>Marta Sánchez-González</u> , Helena Colom, Glòria Lozano-Mena, M. Emília Juan, and Joana M. Planas. Population pharmacokinetics of maslinic acid, a triterpene from olives, after intravenous and oral administration in rats. <i>Mol. Nutr. Food Chem.</i> DOI: 10.1002/mnfr.201400147.....	63
3.4.	CAPÍTOL 4. IDENTIFICACIÓ I QUANTIFICACIÓ DELS METABÒLITS DE L'ÀCID MASLÍNIC EN PLASMA I ORINA DE RATA.....	73
3.4.1.	Resum de l'article 4	75
	PUBLICACIÓ 4. Identificació dels metabòlits de l'àcid maslínic, un triterpè de les olives, en plasma i orina de rata per espectrometria de masses LTQ-Orbitrap.	
	<u>Marta Sánchez-González</u> , Glòria Lozano-Mena, M. Emília Juan and Joana M. Planas. Identification in rat plasma and urine by LTQ-Orbitrap mass spectrometry of the metabolites of maslinic acid, a triterpene from olives.	77
IV.	DISCUSSIÓ GENERAL	111
V.	CONCLUSIONS	123
VI.	BIBLIOGRAFIA	125

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1.1.	Estructura química de l'àcid maslínic	1
Figura 1.2.	Biosíntesi dels triterpens a partir del 2,3-oxidoesqualè.....	2
Figura 1.3.	Biosíntesi de l'àcid maslínic a través de la β -amirina catalitzat per CYP716A.....	3
Figura 1.4.	Tall longitudinal del fruit de l'olivera.....	3
Figura 1.5.	Contingut d'àcid maslínic segons tipus d'oli i la varietat de l'oliva procedent.....	6
Figura 1.6.	Absorció de compostos a través de l'epiteli intestinal.....	15
Figura 1.7.	Esquema representatiu del model monocompartimental intravenós.....	19
Figura 1.8.	Esquema representatiu del model monocompartimental extravascular (oral)	21
Figura 1.9.	Representació gràfica dels paràmetres farmacocinètics C_{max} i T_{max}	22
Figura 1.10.	Esquema representatiu del model bicompartimental intravenós.....	23
Figura 1.11.	Evolució temporal de les concentracions plasmàtiques d'un compost amb escala semilogarítmica després d'una administració intravenosa de dosi única seguint un model bicompartimental	24
Figura 1.12.	Esquema representatiu del model bicompartimental extravascular (oral)..	25
Figura 1.13.	Variabilitat interindividual en els paràmetres farmacocinètics.....	29
Figura 1.14.	Variabilitat residual o intraindividual en un model poblacional	29

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1.1. Contingut d'àcid maslínic en diferents varietats d'olives de taula 4

Taula 1.2. Classificació dels olis d'oliva..... 5

Taula 1.3. Contingut d'àcid maslínic en diferents vegetals frescos, fruites i llegums..... 7

ABREVIATURES

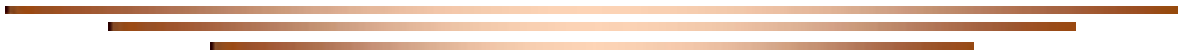


α	Constant de velocitat de disposició ràpida
β	Constant de velocitat de disposició lenta
AGA	α -glicoproteïna àcida
APCI	Ionització química a pressió atmosfèrica
AUC	Àrea sota la corba
CL	Aclariment
CL_T	Aclariment total
C_{max}	Concentració màxima a plasma
C₀	Concentració inicial del compost
DMSO	Dimetilsulfòxid
ESI	Ionització per electrosprai
F	Biodisponibilitat
HDL	Lipoproteïna d'alta densitat
HPLC	Cromatografia líquida d'alta eficàcia
HPLC-LTQ-Orbitrap-MS	Cromatografia líquida d'alta eficàcia acoblada a espectrometria de masses LTQ-Orbitrap
HPLC-MS	Cromatografia líquida d'alta eficàcia acoblada a espectrometria de masses
K₁₂	Constant de velocitat de transferència del compartiment central al perifèric
K₂₁	Constant de velocitat de transferència del compartiment perifèric al central
K_a	Constant d'absorció
K_e	Constant d'eliminació
LDL	Lipoproteïna de baixa densitat
LLOQ	Límit de quantificació
LOD	Límit de detecció
m/z	Relació massa/càrrega
MOFV	Mínim valor de la funció objectiva
NO	Òxid nítric
NONMEM	Model no lineal d'efectes mixtos

Abreviatures

PD	Farmacodinàmica
PK	Farmacocinètica
pvVPC	Comprovació visual predictiva corregida per les prediccions típiques del model
ROS	Espècies reactives de l'oxigen
SIM	Seguiment d'un únic ió
$t_{1/2}$	Temps de semivida
$t_{1/2\beta}$	Temps de semivida d'eliminació
$t_{1/2\alpha}$	Temps de semivida d'absorció
T_{max}	Temps al que s'aconsegueix la concentració màxima a plasma
TNF-α	Factor de necrosi tumoral α
TR	Temps de retenció
V_c	Volum de distribució del compartiment central
V_d	Volum de distribució
V_p	Volum de distribució del compartiment perifèric
V_{ss}	Volum de distribució a l'estat estacionari

RESUM DE LA TESI

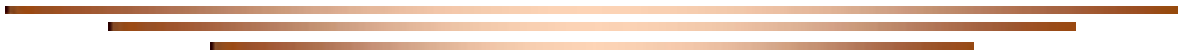


L'àcid maslínic (2 α , 3 β -dihidroxilean-12-ene-28oic) és un triterpè pentacíclic que s'ha aïllat de diferents espècies vegetals, tant medicinals com comestibles, i al qual se li han atribuït efectes beneficiosos per a la salut. A la present memòria s'ha estudiat la toxicitat i la biodisponibilitat d'aquest compost per tal d'aprofundir en el seu coneixement. En primer lloc, s'ha posat a punt una tècnica per determinar l'àcid maslínic a plasma de rata mitjançant una doble extracció líquid-líquid i posterior anàlisi per HPLC-MS. Aquest mètode ha demostrat ser lineal ($R > 0,997$), exacte ($< 4,82\%$), sensible (LLOQ 5 nM), precís, tant intra-dia (5,45%) com inter-dia (8,38%), amb una recuperació del 99% i un efecte matriu del 24%. El mètode va permetre la determinació de l'àcid maslínic a plasma 24 h després de l'administració oral de 10, 25 i 50 mg/kg a rates mascle Sprague-Dawley tot indicant que és apropiat per a ser emprat en estudis de biodisponibilitat. A continuació, s'ha avaluat si l'administració de dosis elevades d'àcid maslínic presenta efectes nocius seguint les normes OECD (2008). La toxicitat subaguda s'ha avaluat administrant l'àcid maslínic (50 mg/kg) diàriament per via oral a ratolins mascle Swiss CD-1 durant 28 dies. No s'han observat alteracions ni anomalies causades pel tractament ni en el pes corporal, ni en les magnituds hematològiques i bioquímiques ni a l'examen histopatològic dels òrgans vitals. Un cop establerta l'absència de resultats de rellevància toxicològica es va estudiar la biodisponibilitat, com a pas previ al seu ús futur com a nutricèutic. Per això, es va administrar el triterpè a rates mascle Sprague-Dawley per via oral (50 mg/kg) i intravenosa (1 mg/kg) i es va extreure sang a diferents temps durant 24 hores. Les concentracions plasmàtiques de l'àcid maslínic obtingudes després de l'administració oral i intravenosa van ser analitzades simultàniament seguint una aproximació poblacional amb el programa NONMEN. El model bicompartimental amb absorció de primer ordre i eliminació lineal és el que millor descriu el comportament de l'àcid maslínic a l'organisme. L'anàlisi de les constants farmacocinètiques indiquen que aquest compost bioactiu té una absorció relativament ràpida ($K_a = 0,52$ 1/h) amb una concentració màxima de 4,03 μ M a les 0,51 h i una biodisponibilitat del 5,13%. Per últim, s'han estudiat els metabòlits de l'àcid maslínic després de l'administració oral a rata (50 mg/kg), mitjançant l'HPLC-LTQ-Orbitrap-MS. S'han identificat 7 metabòlits a plasma resultants del metabolisme de fase I, corresponents a les relacions massa/càrrega (m/z) de 487,3 (M1 - M4), 485,3 (M5) i 501,3 (M6 i M7) i a orina s'han detectat només 4 (M1, M4, M5 i M6) sent l'àcid maslínic majoritari en ambdues matrius. En conclusió, l'àcid maslínic no presenta efectes adversos *in vivo*, té una baixa biodisponibilitat i es metabolitza poc donant derivats únicament de fase I. Els resultats obtinguts constitueixen un primer pas en l'ús futur de l'àcid maslínic com a nutricèutic.

El ácido maslínico (2 α , 3 β -dihidroxi-lean-12-ene-28oico) es un triterpeno pentacíclico que se ha aislado de diferentes especies vegetales, tanto medicinales como comestibles, y al que se le han atribuido efectos beneficiosos para la salud. En la presente memoria se ha estudiado la toxicidad y la biodisponibilidad de este compuesto para profundizar en su conocimiento. En primer lugar, se ha puesto a punto una técnica para determinar el ácido maslínico en plasma de rata mediante una doble extracción líquido-líquido y posterior análisis por HPLC-MS. Este método ha demostrado ser lineal ($R > 0,997$), exacto ($< 4,82\%$), sensible (LLOQ 5 nM), preciso, tanto intra-día (5,45%) como inter-día (8,38%), con una recuperación del 99% y un efecto matriz del 24% para el analito. El método permitió la determinación del ácido maslínico en plasma 24 h después de la administración oral de 10, 25 y 50 mg/kg a ratas macho Sprague-Dawley indicando que es apropiado para ser utilizado en estudios de biodisponibilidad. A continuación, se ha evaluado si la administración de dosis elevadas de ácido maslínico presenta efectos nocivos siguiendo las normas OECD (2008). La toxicidad subaguda se ha evaluado administrando ácido maslínico (50 mg/kg) diariamente por vía oral a ratones macho Swiss CD-1 durante 28 días. No se han observado alteraciones ni anomalías causadas por el tratamiento ni en el peso corporal, ni en las magnitudes hematológicas y bioquímicas ni en el examen histopatológico de los órganos vitales. Una vez establecida la ausencia de resultados de relevancia toxicológica se estudió la biodisponibilidad como paso previo en su uso futuro como nutraceutico. Por este motivo, se administró el triterpeno en ratas macho Sprague-Dawley por vía oral (50 mg/kg) y vía intravenosa (1 mg/kg) y se extrajo sangre a diferentes tiempos durante 24 horas. Las concentraciones plasmáticas del ácido maslínico obtenidas después de la administración oral e intravenosa fueron analizadas simultáneamente siguiendo una aproximación poblacional con el programa NONMEM. El modelo bicompartimental con absorción de primer orden y eliminación lineal es el que mejor describe el comportamiento del ácido maslínico en el organismo. El análisis de las constantes farmacocinéticas indican que este compuesto bioactivo tiene una absorción relativamente rápida ($K_a = 0,52$ 1/h) con una concentración máxima de 4,03 μ M a las 0,51 h y una biodisponibilidad del 5,13%. Por último, se han estudiado los metabolitos del ácido maslínico después de la administración oral en rata (50 mg/kg), mediante el HPLC-LTQ-Orbitrap-MS. Se han identificado 7 metabolitos en plasma resultantes del metabolismo de fase I, correspondientes a las relaciones masa/carga (m/z) de 487,3 (M1 - M4), 485,3 (M5) y 501,3 (M6 y M7) y en orina se han detectado solo 4 (M1, M4, M5 y M6) siendo el ácido maslínico mayoritario en las dos matrices. En conclusión, el ácido maslínico no presenta efectos adversos *in vivo*, tiene una baja biodisponibilidad y un escaso metabolismo con derivados únicamente de fase I. Los resultados obtenidos constituyen un primer paso en el uso futuro del ácido maslínico como nutraceutico.

Maslinic acid (2 α , 3 β -dihydroxyolean-12-en-28oic) is a pentacyclic triterpene isolated from different medicinal and edible plants, and with health-enhancing effects. Therefore, the present work aims to assess the toxicity and bioavailability in order to get an in-depth knowledge of maslinic acid. Firstly, a method was set up to determine maslinic acid in rat plasma by means of a double liquid-liquid extraction and HPLC-MS analysis. The method is linear ($R > 0.997$), accurate ($< 4.82\%$), sensitive (LLOQ 5 nM), precise, both intraday (5.45%) and interday (8.38%), with a recovery of 99% and a matrix effect of 24%. The method allowed the determination of maslinic acid in plasma withdrawn 24 h after the administration of 10, 25 and 50 mg/kg to male Sprague-Dawley rats thus confirming its suitability for further pharmacokinetic analysis. Secondly, it was evaluated whether high doses of maslinic acid have harmful effects, following the OECD guidelines (2008). Subacute toxicological evaluation was performed through the daily oral administration of 50 mg/kg maslinic acid to Swiss CD-1 mice for 28 days. The treatment did not modify the body weight and did not exert harmful effects as shown in the hematology, clinical biochemistry and histopathology evaluation. Once the absence of adverse effects was proved, the bioavailability study of maslinic acid has been carried out, as a previous step for its future use as a nutraceutical. For this reason, the triterpene was administered to male Sprague-Dawley rats orally (50 mg/kg) and intravenously (1 mg/kg) and blood was collected at different times over 24 h. The plasmatic concentrations of maslinic acid obtained after both administrations were analyzed simultaneously following a population PK approach with the NONMEM software. These concentrations were best fitted to a bicompartamental model with first order absorption and linear elimination processes. The pharmacokinetic parameters obtained indicate that maslinic acid has a relatively rapid absorption ($K_a = 0.52$ 1/h) with a maximum concentration of 4.03 μ M at 0.51 h and a bioavailability of 5.13%. Finally, the metabolites of maslinic acid were studied after its oral administration to rats (50 mg/kg) by HPLC-LTQ-Orbitrap-MS. Seven metabolites were identified in plasma resulting from phase I reactions and corresponding to mass/charge ratios (m/z) of 487.3 (M1 - M4), 485.3 (M5) and 501.3 (M6 and M7). Only 4 of them were detected in urine (M1, M4, M5 and M6). Maslinic acid was the main compound in both matrices. In conclusion, maslinic acid does not exert adverse effects *in vivo*, has a low bioavailability and metabolism, with biotransformations mainly attributable to phase I. These results constitute the first step for the future use of maslinic acid as a nutraceutical.

I. INTRODUCCIÓ



1.1. L'ÀCID MASLÍNIC

1.1.1. Característiques químiques i físiques

L'àcid maslínic pertany al grup d'hidrocarburs derivats de l'isoprè, que reben el nom de terpens. Dins de l'amplíssima i diversa família de terpens es troben els triterpens, que tenen 6 unitats d'isoprè i fórmula molecular $C_{30}H_{48}$. Els 30 àtoms de carboni es poden organitzar de formes diferents i la majoria d'ells tenen estructures policícliques, donant lloc a més de 100 esquelets químics diferents. Entre els triterpens es troben els pentacíclics, que són un grup de compostos que estan àmpliament distribuïts al regne vegetal i entre els quals es troba l'àcid maslínic. Aquest compost es sintetitza com a metabòlit secundari i actua com a fitoalexina, protegint la planta d'atacs d'insectes i fongs (Kombargi *et al*, 1998; Pungitore *et al.*, 2005).

L'àcid maslínic (2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-ene-28oic), també anomenat àcid crategòlic (Figura 1.1), és una molècula amb una fórmula empírica $C_{30}H_{48}O_4$, número de registre CAS (Chemical Abstracts Service) de 4373-41-5 i massa molecular de 472,7 g/mol. Aquest compost es presenta en forma de sòlid cristal·lí i es pot dissoldre en solvents orgànics com l'etanol, l'acetona, la dimetilformamida i el DMSO fins a una concentració de 0,5; 1; 15 i 20 mg/mL, respectivament. En canvi, en solvents com l'aigua, la seva solubilitat és molt baixa (0,3 mg/mL a 25°C). Presenta un punt de fusió de 241,4 °C i un punt d'ebullició de 570 °C a 760 mm Hg. La seva densitat és de 1,15 g/cm³ i l'índex de refracció de 1,57.

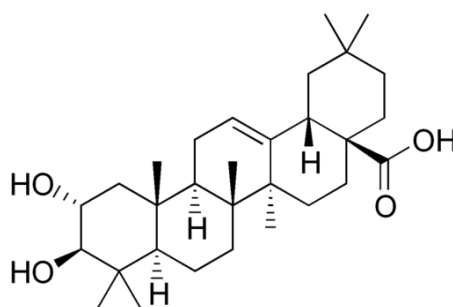


Figura 1.1. Estructura química de l'àcid maslínic.

1.1.2. Biosíntesi de l'àcid maslínic a plantes

L'àcid maslínic se sintetitza per la via del mevalonat a partir del 2,3-oxidoesqualè, un derivat lineal de l'isoprè (Thimmappa *et al.*, 2014). La ciclació del 2,3-oxidoesqualè succeeix a través de diversos enzims, les ciclases del 2,3-òxidoesqualè també anomenades triterpè sintases, que donaran lloc per una banda a la via dels esterols, i per l'altra a la via dels triterpens no esteroïdals. En aquesta darrera via, es forma un

Introducció

carbocatió tetracíclic amb esquelet de dammarà (Figura 1.2). Aquest catió, mitjançant reaccions de ciclació i migracions de metils i hidrurs, genera els carbocacions a partir dels quals, i per reaccions d'oxidació, s'obtenen els triterpens pentacíclics (Thimmappa *et al.*, 2014). A partir dels cations lupenil, ursanil i oleanil, s'obtenen les molècules amb esquelets lupans, ursans i oleanans, que han demostrat exercir diferents activitats beneficioses en diverses malalties (Laszczyk, 2009; Alqahtani *et al.*, 2013). Així, el carbocatió lupenil, donarà lloc al lupeol, que es transformarà en àcid betulínic. Amb esquelet ursà s'obté l' α -amirina a partir de la qual es formen l'uvaol i l'àcid ursòlic (Stiti *et al.*, 2007). Del catió oleanil deriva la β -amirina, considerada un dels triterpens pentacíclics més comuns a les plantes, en què forma part de les resines i ceras de les mateixes de forma lliure o esterificada amb àcids grassos i aïllada de plantes com el clau, el vesc i les fulles de l'olivera (Jatczak i Gryniewicz, 2014).

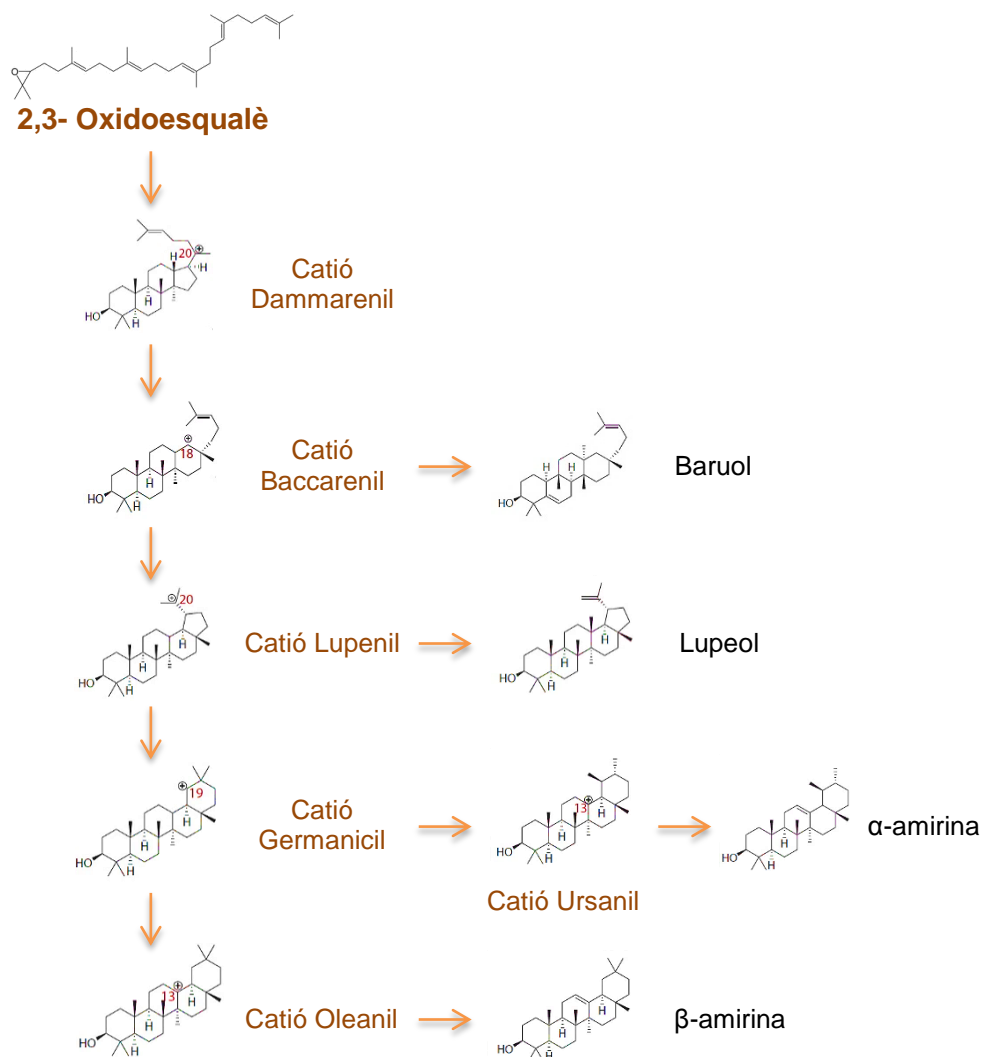


Figura 1.2. Biosíntesi dels triterpens a partir del 2,3-oxidoesqualè (adaptat de Thimmappa *et al.*, 2014).

La β -amirina s'ha descrit com el triterpè precursor de l'àcid maslínic a la *Olea europaea* L. (Stiti *et al.*, 2007). Mitjançant l'actuació dels enzims de la subfamília CYP716A (Figura 1.3), pertanyents a la família dels citocroms P450, la β -amirina es transforma en eritrodíol i aquest, alhora, en àcid oleanòlic per donar lloc a l'àcid maslínic (Stiti *et al.*, 2007; Fukushima *et al.*, 2011).

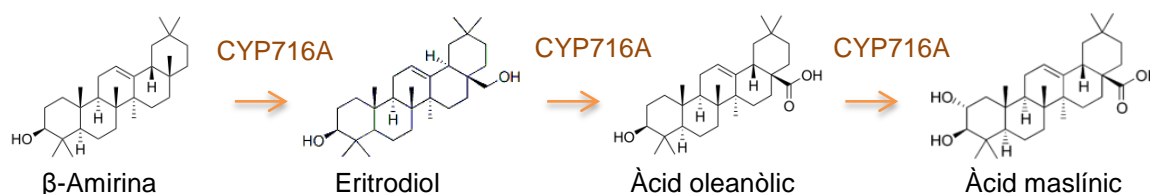


Figura 1.3. Biosíntesi de l'àcid maslínic a través de la β -amirina catalitzat per CYP716A (adaptat de Stiti *et al.*, 2007 i Fukushima *et al.*, 2011).

1.2. FONTS DE L'ÀCID MASLÍNIC: ALIMENTS I PLANTES

L'àcid maslínic és un microelement no nutritiu de la dieta ja que s'ha descrit en diverses fruites, vegetals, llegums, herbes aromàtiques i, especialment, en les fulles i el fruit de l'olivera (Bianchi, 2003; Kalogeropoulos *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2012). A més, la seva presència també s'ha confirmat en diverses plantes emprades en la medicina tradicional originàries de la Xina, Nord-amèrica i Indonèsia, entre d'altres (Yarnell, 2002; Guo *et al.*, 2011; Caligiani *et al.*, 2013; Adnyana *et al.*, 2013).

1.2.1. Fonts alimentàries

a) Olives

Una de les principals fonts alimentàries de l'àcid maslínic són els fruits de la *Olea europaea* L. Dins l'oliva, l'àcid maslínic es troba principalment a l'epicarp del fruit (Figura 1.4) on presenta una funció antifúngica i insecticida (Kombargi *et al.*, 1998; Pungitore *et al.*, 2005).

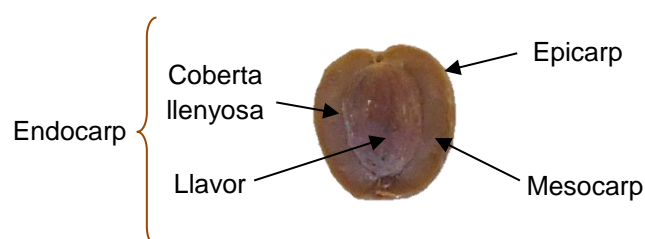


Figura 1.4. Tall longitudinal del fruit de l'olivera.

La concentració d'aquest triterpè pentacíclic dins de l'oliva varia molt segons el sòl, els efectes climàtics i les condicions de creixement de les olives, així com el grau de maduració, la varietat i el tractament al qual ha estat sotmès el fruit pel seu consum (Romero *et al.*, 2010; Guinda *et al.*, 2010; Peragón, 2013). L'efecte de la maduració de les olives en la concentració d'àcid maslínic ha estat estudiada en les varietats picual,

Introducció

cornezuelo, hojiblanca i arbequina pels grups de Peragón (2013) i Guinda *et al.* (2010). Ambdós estudis coincideixen en el fet que la màxima concentració d'àcid maslínic es troba en les primeres etapes de la maduració, quan el fruit presenta una coloració verda i el seu índex de maduració és de 0. En canvi, a mesura que el fruit es va enfosquint, la concentració d'àcid maslínic va disminuint, i s'obtenen els valors més baixos al final de l'etapa de maduració, quan el fruit presenta una coloració negra i el seu índex de maduració es troba entre 2 i 5. A més a més de la maduració, la varietat de l'oliva també influeix en la concentració d'àcid maslínic dins el fruit. Romero *et al.* (2010) va mesurar la quantitat del triterpè en diferents varietats d'olives crues, sent la varietat picual la que va presentar majors quantitats d'àcid maslínic, aproximadament 2000 mg/kg de pes sec. En canvi, la varietat manzanilla va presentar valors molt menors, al voltant dels 1000 mg/kg de pes sec. Per contra, Guinda *et al.* (2010) va obtenir les concentracions majors d'àcid maslínic en la varietat arbequina amb 1500 mg/kg de pes sec. En canvi, la varietat picual només va presentar 1200 mg/kg de pes sec d'àcid maslínic.

Varietat d'oliva	Àcid maslínic (mg/kg pes sec)
Manzanilla verda ^{a)}	384,1 ± 50,0
Hojiblanca verda ^{a)}	904,7 ± 259,6
Gordal ^{a)}	414,2 ± 89,3
Manzanilla negra ^{b)}	287,1 ± 66,6
Hojiblanca negra ^{b)}	506,8 ± 232,5
Kalamata ^{c)}	1318,4 ± 401,0
Manzanilla de color canviant ^{c)}	824,9 ± 179,5

Taula 1.1. Contingut d'àcid maslínic en diferents varietats d'olives de taula (Romero *et al.*, 2010). Els resultats s'expressen com la mitjana ± SD. Tractades seguint l'estil a) espanyol, b) californià i c) grec.

Per últim, el tractament que han de rebre les olives crues perquè puguin ser consumides i passin a ser olives de taula també pot afectar a la quantitat d'àcid maslínic present en el fruit. En general, aquest procés consisteix en un rentat i un tractament amb salmorra, encara que pot variar segons el tipus d'oliva. Romero *et al.* (2010) va mesurar la concentració d'àcid maslínic en olives verdes (hojiblanca, manzanilla i gordal) tractades seguint l'estil espanyol, en olives negres (hojiblanca i manzanilla) seguint l'estil californià i en olives negres naturals (kalamata) i de color canviant (manzanilla) seguint l'estil grec. Els tractaments de les olives seguint l'estil espanyol i el californià impliquen la utilització de solucions alcalines (1 - 2% de NaOH) (Bianchi, 2003). En canvi, l'estil grec només utilitza salmorra acidificada (8% NaCl, 0,8% àcid acètic). La concentració d'àcid maslínic en les olives tractades amb NaOH va passar de 1000-1500 mg/kg a 350-900 mg/kg del

triterpè (Taula 1.1). En canvi, les olives tractades únicament amb salmorra no van veure afectada la seva concentració d'àcid maslínic, presentant valors d'entre 800 i 1400 mg/kg del triterpè. Això és causat pel fet que el medi alcalí permet la solubilització de l'àcid maslínic dins la salmorra, afavorint la sortida del triterpè del fruit. Alexandraki *et al.* (2014) van confirmar aquests resultats obtenint una reducció del 45% en la concentració d'àcid maslínic en la varietat conservolea, tractada segons l'estil espanyol, i sense observar cap canvi en la varietat kalamata, tractada seguint l'estil grec.

b) Oli d'oliva

L'oli d'oliva, principal derivat de l'oliva, també conté àcid maslínic. Aquest triterpè es troba en la fracció saponificable de l'oli, formada pels triacilglicèrids i els àcids grassos (Alarcón de la Lastra *et al.*, 2001). La seva concentració depèn del producte final, oli d'oliva o oli de pinyolada d'oliva, així com del mètode d'obtenció de l'oli.

Els olis d'oliva es poden classificar en dos grans grups: els que procedeixen de l'oliva i els que vénen de la pinyolada d'oliva (Taula 1.2). Els olis d'oliva verge, procedents de l'oliva, són aquells obtinguts exclusivament per mètodes mecànics o altres mitjans físics. Els olis d'oliva refinats s'obtenen per la refinació de l'oli d'oliva verge llampant, i els olis d'oliva es basen en una mescla d'olis d'oliva verges diferents al llampant i oli d'oliva refinat. Per últim, els olis de pinyolada d'oliva s'obtenen mitjançant procediments químics a partir de dissolvents (Agència para el aceite de oliva, 2011).

Olis d'oliva				Olis de pinyolada d'oliva		
Tipus d'oli		Acidesa	Consum	Tipus d'oli	Acidesa	Consum
Olis d'oliva verge	Oli d'oliva verge extra	$\leq 0,8^\circ$	+	Oli de pinyolada d'oliva cru	$\geq 2^\circ$	-
	Oli d'oliva verge	$\leq 2^\circ$	+		Oli de pinyolada d'oliva refinat	$\leq 0,3^\circ$
	Oli d'oliva verge llampant	$> 2^\circ$	-	Oli de pinyolada d'oliva		$\leq 1^\circ$
Oli d'oliva refinat		$\leq 0,3^\circ$	-			
Oli d'oliva		< 1	+			

Taula 1.2. Classificació dels olis d'oliva (Agència para el aceite de oliva, 2011). No aptes per al consum (-), aptes per al consum (+).

Kanaki *et al.* (2013) van estudiar la variació en la concentració d'àcid maslínic que es produïa durant tot el procés de producció de l'oli (fruit, pasta premsada del fruit, primer oli i oli final) obtingut de l'oliva koroneiki, la varietat més important de Grècia. En el fruit inicial van quantificar 1252,9 mg/kg d'àcid maslínic en pes fresc. Aquesta concentració va

augmentar significativament en la pasta del fruit (3123,2 mg/kg) obtinguda després del procés de malaxació (ablanir mecànicament el fruit prèviament premsat a una temperatura màxima de 27°C). La concentració d'àcid maslínic és molt baixa, tant en el primer oli obtingut sense refinar (29,5 mg/kg), com en l'oli final després d'un procés de refinació consistent en una neteja i centrifugació del primer oli amb aigua (20,9 mg/kg), perdent una gran part en el residu sòlid (Kanaki *et al.*, 2013). Per tant, aquests resultats demostren que durant el procés d'obtenció de l'oli d'oliva, gran part de l'àcid maslínic present en el producte inicial no arriba al producte final, l'oli.

Pérez-Camino i Cert (1999) i Allouche *et al.* (2009) van estudiar les concentracions d'àcid maslínic en diferents tipus d'oli d'oliva procedents de diverses varietats d'olives. En l'estudi realitzat per Pérez-Camino i Cert (1999) (Figura 1.5), l'oli d'oliva verge extra procedent de la varietat arbequina és el que té major concentració d'àcid maslínic (98 mg/kg). Per contra, dels olis d'oliva verge, el procedent de la varietat verdial és el que presenta els valors més elevats del triterpè (205 mg/kg) i el procedent de la varietat picual, els valors més baixos (145 mg/kg).

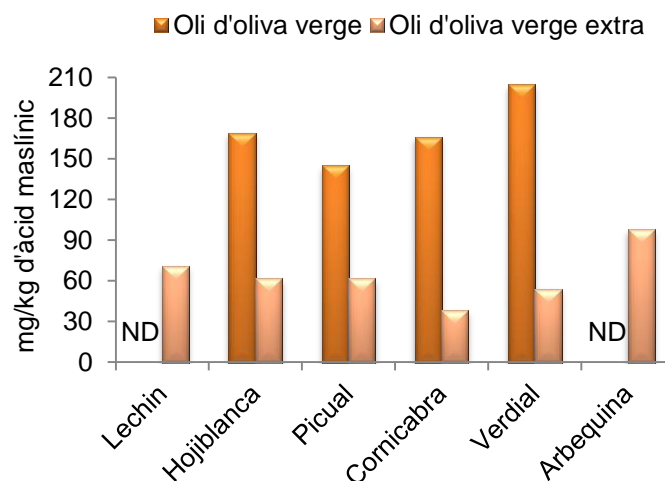


Figura 1.5. Contingut d'àcid maslínic segons els tipus d'oli i la varietat de l'oliva procedent (Adaptat de A: Pérez-Camino i Cert, 1999). ND: no determinat.

Com es pot observar en la figura 1.5, els olis d'oliva verge presenten una concentració d'àcid maslínic superior a la que es troba en els olis d'oliva verge extra. El procés hidrolític que té lloc durant l'obtenció de l'oli d'oliva verge afavoreix l'alliberació d'àcid maslínic de la pell de l'oliva (Pérez-Camino i Cert, 1999), on aquest triterpè es troba en major quantitat (Bianchi *et al.*, 1992). Allouche *et al.* (2009) van determinar les concentracions d'àcid maslínic en l'oli d'oliva verge procedent de les varietats verdial i picual, trobant concentracions d'àcid maslínic de 5,72 mg/kg i 17,03 mg/kg, respectivament. Aquests autors van trobar concentracions inferiors a les obtingudes per

Pérez-Camino i Cert (1999). Les diferències entre aquests dos estudis poden ser atribuïbles als diferents mètodes analítics emprats, però també al procés d'obtenció de l'oli. Així, cal considerar que el sistema d'extracció de l'oli, el nivell de maduració del fruit o la qualitat del mateix fruit abans de ser premsat són variables que poden afectar el nivell de triterpens pentacíclics presents al producte final (Pérez-Camino i Cert, 1999).

c) Vegetals, fruites i condiments

A més a més de les olives i l'oli d'oliva, l'àcid maslínic també es troba en altres vegetals presents a la dieta mediterrània. Lin *et al.* (2011) van determinar el contingut d'aquest triterpè en els espinacs i les albergínies (Taula 1.3), trobant quantitats del mateix ordre que les diferents varietats d'olives de taula indicades anteriorment (Romero *et al.*, 2010). A la pastanaga també es va detectar però no quantificar ja que presentava valors molt baixos (Lin *et al.*, 2011). El seu contingut en diferents fruites també ha estat estudiat. El rang de concentracions trobat en fruites com la magrana, la mandarina, la llimona o el kiwi va ser de 1,2 a 17,3 mg/kg d'àcid maslínic (Li *et al.*, 2011). En canvi en la poma, la pera, el caqui o el raïm, les quantitats d'àcid maslínic van ser inexistents o molt baixes (Jäger *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014a).

Estudi	Aliment	Àcid maslínic (mg/kg pes sec)
Li <i>et al.</i> , 2011	Magrana (polpa)	10,8 ± 0,2
	Mandarina (polpa)	1,2 ± 0,1
	Llimona (polpa)	3,7 ± 0,1
	Kiwi (polpa)	17,3 ± 0,3
Yin <i>et al.</i> , 2012	Alfàbrega	320 ± 50
	Mostassa oriental	330 ± 80
Lin <i>et al.</i> , 2011	Albergínia	840 ± 70
	Espinacs	1260 ± 110
Kalogeropoulos <i>et al.</i> , 2010	Cigrans	61,9*
	Llenties	39,5*

Taula 1.3. Contingut d'àcid maslínic en diferents vegetals frescos (Lin *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2012), fruites (Li *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2012) i llegums (Kalogeropoulos *et al.*, 2010). Els resultats s'expressen com la mitjana ± SD. *Resultats expressats com la mitjana en els quals la SD és menor al 15% (no es mostra).

La seva concentració també ha estat determinada en condiments com l'alfàbrega i la mostassa oriental, presentant valors aproximadament de 300 mg/kg (Lin *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2012). Per contra, en herbes aromàtiques com el romaní o el clau, l'àcid maslínic no ha estat detectat (Jäger *et al.*, 2009). La presència d'aquest triterpè també s'ha

confirmat en llegums com els cigrons o les lleties a concentracions de 61,9 i 39,5 mg/kg d'àcid maslínic, respectivament (Kalogeropoulos *et al.*, 2010).

1.2.2. Plantes medicinals

Tot i que l'àcid maslínic ha estat determinat en diversos vegetals i fruites, la seva presència també ha estat estudiada en plantes emprades en la medicina tradicional. L'*Arctostaphylos uva-ursi* L., també anomenat "boixerola", és un arbust originari de les zones muntanyoses de Nord-amèrica, emprat tradicionalment per al tractament de les infeccions urinàries (Yarnell, 2002; EMEA, 2012). Actualment es pot trobar arreu del món, sent freqüent a la serralada pirinenca catalana, en les muntanyes del sistema mediterrani i a les muntanyes del País Valencià (Bolòs *et al.*, 1993). La concentració d'àcid maslínic en les fulles d'aquest arbust va ser determinada per Caligiani *et al.* (2013), presentant 11 ± 3 mg/kg del triterpè.

La presència d'àcid maslínic a les flors de *Crataegus monogyna* L., conegut com "arç blanc", va ser molt més elevada, de 927 ± 71 mg/kg (Caligiani *et al.*, 2013). L'extracte d'aquest arbust ha estat emprat com a teràpia alternativa per tractar malalties cardiovasculars tant a Europa com a la Xina (Salehi *et al.*, 2009). Les flors, més concretament, s'han utilitzat per tractar afeccions respiratòries i del sistema circulatori així com desordres del sistema nerviós i insomni (Barros *et al.*, 2011). Una de les concentracions més elevades d'àcid maslínic, 4958 ± 130 mg/kg, s'ha trobat en les fulles de *Lagerstroemia speciosa* L., un arbre petit originari del sud-est d'Àsia també anomenat "banaba" (Stohs *et al.*, 2012; Caligiani *et al.*, 2013). L'extracte de les seves fulles ha demostrat inhibir les α -glucosidases, actuant així en el tractament de la diabetis de tipus 2 (Hou *et al.*, 2009). Una altra de les plantes medicinals que també conté àcid maslínic és l'*Ortosiphon stamineus* L., popularment conegut com "te de java", emprat tradicionalment a la Indonèsia, Malàisia, Tailàndia, Vietnam i Birmània (Adnyana *et al.*, 2013). La concentració d'àcid maslínic en les parts aèries d'aquesta planta és de 845 ± 64 mg/kg (Caligiani *et al.*, 2013). Dins dels efectes biològics atribuïts a l'*Ortosiphon stamineus* L. es troben els d'antioxidant, antitumoral, diürètic, antidiabètic, antihipertensiu, antiinflamatori, antibacterià i hepatoprotector (Adnyana *et al.*, 2013).

L'àcid maslínic també s'ha trobat a l'escorça i l'arrel del *Punica granatum* L., l'arbre magraner (Caligiani *et al.*, 2013). A diferència de la concentració trobada en la fruita esmentada anteriorment, en aquesta matriu l'àcid maslínic es troba en majors quantitats, 102 ± 10 mg/kg. Les activitats presentades pel *Punica granatum* L. són diverses però les més estudiades han estat les d'antioxidant, antitumoral i antiinflamatori (Jurenka, 2008). Per últim, un dels arbustos emprats en la medicina tradicional Xinesa i que conté àcid

maslínic a les fulles (470 ± 194 mg/kg) és el *Ziziphus jujuba*, també anomenat “Ginjoler”, emprat en medicina tradicional com antimicrobià, antiinflamatori i antitumoral (Guo *et al.*, 2011).

1.3. PROPIETATS BIOLÒGIQUES DE L'ÀCID MASLÍNIC

Diversos estudis sobre l'àcid maslínic i els seus efectes biològics han permès atribuir-li les següents propietats beneficioses per a la salut.

1.3.1. Antitumoral

L'efecte antitumoral de l'àcid maslínic és una de les activitats biològiques més estudiades del triterpè. Aquest efecte s'ha demostrat tant majoritàriament *in vitro* en diverses línies cel·lulars tumorals (He i Liu, 2007; Juan *et al.*, 2008; Allouche *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2012), com en experiments *in vivo* utilitzant diferents models murins de càncer (Li *et al.*, 2010; Sánchez-Tena *et al.*, 2013).

a) Càncer de còlon

L'activitat quimiopreventiva de l'àcid maslínic s'ha demostrat en les línies cel·lulars HT-29 i Caco 2 en observar que aquest compost presenta activitat antiproliferativa i proapoptòtica sense citotoxicitat (Juan *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2006; Juan *et al.*, 2008). Tant a les cèl·lules HT-29 com a les cèl·lules Caco 2, l'àcid maslínic és capaç d'induir l'apoptosi per la via intrínseca o mitocondrial (Reyes-Zurita *et al.*, 2009; Reyes-Zurita *et al.*, 2011; Reyes-Zurita *et al.*, 2013) i en les cèl·lules Caco 2, també s'ha demostrat la implicació de la via extrínseca, mitjançant l'activació dels receptors de mort cel·lular (Reyes-Zurita *et al.*, 2013). L'efecte quimiopreventiu envers el càncer colorectal també s'ha demostrat *in vivo* amb ratolins *Apc*^{Min/+}, els quals presenten una tumorigènesi intestinal espontània, reduint la mida i existència de pòlips intestinals així com suprimint-ne la formació (Sánchez-Tena *et al.*, 2013).

b) Càncer de fetge

S'ha estudiat el paper quimiopreventiu de l'àcid maslínic en les línies cel·lulars d'adenocarcinoma hepàtic humà Hep3B, Huh7 i HA22T, i s'ha observat com aquest compost mitiga la invasió i migració cel·lular (Lin *et al.*, 2011) i posseeix capacitat antiproliferativa en la línia cel·lular d'adenocarcinoma hepàtic humà HepG2 (He i Liu, 2007). A més, s'ha estudiat el paper que presenta l'àcid maslínic en l'angiogènesi, un procés important de creixement de tumors i metàstasi que es dona de forma massiva en el càncer hepàtic (Pang i Poon, 2006). Diferents factors, anomenats factors angiogènics, com ara el factor de creixement endotelial vascular, la interleucina 8, el factor induïble

d'hipòxia o el factor de creixement bàsic de fibroblasts s'han descrit en persones amb aquest tipus de tumor i són els responsables de la promoció d'aquest procés. S'ha demostrat que l'àcid maslínic suprimeix l'expressió d'ARNm de certs factors angiogènics, a més de reduir l'estrès oxidatiu mantenint els nivells de glutatió i disminuint la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i òxid nítric (NO), coneguts per potenciar aquest estrès (Lin *et al.*, 2011).

c) Càncer de mama

L'activitat antitumoral de l'àcid maslínic en la línia cel·lular de càncer de mama MCF-7 s'ha demostrat en prevenir el dany a l'ADN induït pel tractament d'aquestes cèl·lules amb H₂O₂ i en el fet que posseeix la capacitat de disminuir els nivells de ROS, protegint les cèl·lules enfront el dany oxidatiu (Allouche *et al.*, 2011). En canvi, no s'ha observat cap efecte de l'àcid maslínic relacionat amb la supervivència cel·lular, la proliferació cel·lular i el cicle cel·lular en aquesta línia cel·lular (Allouche *et al.*, 2011; He i Liu, 2007).

d) Càncer de pròstata

L'estudi de l'activitat de l'àcid maslínic en cèl·lules d'adenocarcinoma humà de pròstata DU145 ha demostrat el paper inhibidor d'aquest triterpè enfront la migració, invasió i adhesió induïda pel factor de creixement basal i epidermal. Park *et al.* (2012) indiquen que l'àcid maslínic inhibeix la capacitat de metàstasi de la línia tumoral DU145, fet que atribueixen a la supressió de l'activació del factor induïble d'hipòxia.

e) Astrocitomes

L'astrocitoma és el tumor d'encèfal més comú i un dels més malignes que es coneixen. L'àcid maslínic ha demostrat inhibir la proliferació cel·lular de forma depenent de la dosi i provocant alteracions morfològiques importants en les cèl·lules (Martín *et al.*, 2007). L'exposició d'aquestes cèl·lules a l'àcid maslínic resulta en un augment intracel·lular de ROS seguit d'una pèrdua de la integritat de la membrana mitocondrial. Per tant, mitjançant la inducció de l'apoptosi a través de la via mitocondrial induïda per l'àcid maslínic, es provoquen alteracions en el cicle cel·lular i el citoesquelet d'aquestes cèl·lules (Martín *et al.*, 2007).

1.3.2. Antioxidant

L'oxidació pot tenir un paper important en la patogènesi de diverses malalties degeneratives i en processos biològics com ara l'envelliment. La susceptibilitat d'un organisme envers el dany oxidatiu està influenciat pel balanç entre la capacitat antioxidant i prooxidant. L'àcid maslínic ha demostrat prevenir l'estrès oxidatiu participant

en aquest equilibri com a antioxidant (Montilla *et al.*, 2003). Per una banda, es capaç de modular l'alliberament de les citocines proinflamatòries interleucina 6 i TNF- α (Márquez-Martín *et al.*, 2006), i de ROS, com l'NO i el peròxid d'hidrogen (Allouche *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011). De l'altra, posseeix la capacitat de quelar coure en les partícules de LDL aïllades i de neutralitzar el radical peroxil (Allouche *et al.*, 2010). A més, també s'ha demostrat que augmenta l'activitat de la paraoxonasa, un enzim que forma part del sistema antioxidant del plasma (Hussain-Shaik *et al.*, 2012). Per últim, en un experiment *in vivo* s'ha vist que l'àcid maslínic augmenta els nivells de glutatió, un potent antioxidant, i disminueix la producció de disulfur de glutatió i malondialdehid, marcadors de l'estrès oxidatiu (Yin *et al.*, 2012).

1.3.3. Antidiabètic

L'efecte beneficiós que provoca l'àcid maslínic en el metabolisme de la glucosa, el qual es troba implicat en el metabolisme energètic, ha estat demostrat en diferents estudis. L'activitat inhibidora d'aquest triterpè sobre l' α -glicosilasa i la glicogen fosforilasa evita la hidròlisi dels hidrats de carboni de la dieta i controla l'alliberament de glucosa a nivell hepàtic, respectivament (Wen *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2009). També ha demostrat disminuir les concentracions de glucosa en sang en estudis *in vivo* amb rates hiperglucèmiques (Guan *et al.*, 2011) i amb ratolins que reproduïen la diabetis de tipus 2 humana (Liu *et al.*, 2007a). A més, aquest triterpè augmenta els nivells de glicogen present en les cèl·lules hepàtiques (Liu *et al.*, 2007a) i en els astròcits del sistema nerviós central (Guan *et al.*, 2009). En aquestes mateixes cèl·lules, l'àcid maslínic provoca la inhibició de la degradació de glicogen i la reducció de la producció de lactat (Guan *et al.*, 2009). L'estimulació de la glicòlisi i la gluconeogènesi per part d'aquest triterpè també s'ha vist en experiments *in vivo* a causa d'un augment de les fosfoglucosa isomerasas, demostrant la capacitat reguladora de l'àcid maslínic en l'acumulació i degradació del glicogen (Rufino-Palomares *et al.*, 2011). Així mateix, s'ha demostrat que aquest triterpè normalitza els nivells d'adiponectina (Liu *et al.*, 2007a), una hormona sintetitzada pels adipòcits que sensibilitza les cèl·lules a l'acció de la insulina (Yamauchi *et al.*, 2001).

1.3.4. Antiinfecció

La capacitat antiinfecciosa de l'àcid maslínic envers diferents paràsits, virus i bacteris ha estat demostrada en diversos estudis, que han avaluat el seu efecte protector enfront de la malària, la toxoplasmosi o la síndrome d'immunodeficiència adquirida (Moneriz *et al.*, 2011a; De Pablos *et al.*, 2010a; Xu *et al.*, 1996). L'acció parasitostàtica d'aquest triterpè enfront del *Plasmodium yoelii*, un paràsit que és capaç de reproduir la malaltia de la malària, ha estat demostrada per tal com la supervivència dels animals infectats amb

aquest paràsit i tractats augmenta entre un 20 i un 80% (Moneriz *et al.*, 2011a). A més, en cultius cel·lulars d'eritròcits infectats amb *Plasmodium falciparum*, la presència d'àcid maslínic provoca la inhibició del seu creixement de forma depenent de la dosi (Moneriz *et al.*, 2011b). Així mateix, aquest triterpè pentacíclic evita la transmissió de la toxoplasmosi impedit que el protozou del *Toxoplasma gondii* s'introdueixi dins la cèl·lula (De Pablos *et al.*, 2010a). A l'àcid maslínic també se li atribueix la propietat d'actuar com a coccidiostàtic, disminuint l'índex de lesió i l'índex d'òocits de la *Eimeria tenella* (De Pablos *et al.*, 2010b). Aquest paràsit causa la Coccidiosis, una de les principals infeccions responsable de l'impacte econòmic en la producció d'aus de corral (De Pablos *et al.*, 2010b). També, a partir d'un experiment *in vitro*, s'ha demostrat la capacitat inhibidora de l'àcid maslínic sobre la proteasa del virus de la immunodeficiència humana-1 (Xu *et al.*, 1996) i aquesta propietat s'ha confirmat posteriorment a partir de cèl·lules infectades amb clons virals (Parra *et al.*, 2009). Per últim, l'àcid maslínic és un dels triterpens més actius contra el bacteri gram-positiu *Enterococcus faecalis*, amb una concentració mínima inhibidora de 16 µg/mL (Acebey-Castellon *et al.*, 2011).

1.3.5. Cardioprotector

L'activitat cardioprotectora de l'àcid maslínic s'ha avaluat en estudiar l'efecte d'aquest compost sobre diferents factors de risc, com ara, el perfil lipídic, l'estrès oxidatiu, la disfunció endotelial, la hipertensió o la inflamació (Lou-Bonafonte *et al.*, 2012). L'àcid maslínic exerceix un potent efecte antioxidant sobre la peroxidació de les LDL (Allouche *et al.*, 2010), a banda d'augmentar l'activitat de la paraoxonasa (Hussain-Shaik *et al.*, 2012), un enzim relacionat amb la severitat de l'aterosclerosi coronària (Tartan *et al.*, 2007). També ha demostrat posseir propietats antioxidants envers la peroxidació lipídica *in vitro*, a més de reduir la generació de peròxid d'hidrogen en macròfags estimulats (Márquez-Martín *et al.*, 2006). En aquest mateix estudi, es va demostrar que l'àcid maslínic pot controlar l'alliberament de citocines proinflamatòries com ara l'interleucina 6, el TNF- α i la I-309, provocant un efecte antiinflamatori molt beneficiós per evitar cardiopaties (Márquez-Martín *et al.*, 2006). Un altra activitat que posseeix aquest triterpè és la capacitat vasodilatadora demostrada en un estudi *in vivo* amb rates hipertenses (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2006) i en un estudi *in vitro* emprant anells aòrtics aïllats de rata (Dongmo *et al.*, 2011). Aquest efecte vasodilatador està mediat principalment per la producció de NO mitjançant la sintasa endotelial d'òxid nítric (Dongmo *et al.*, 2011), una de les isoformes constitutives de la sintasa d'òxid nítric (Mayer i Hemmens, 1997). El NO és crític per al manteniment de la funció endotelial i la homeòstasi dels teixits. Per últim, l'àcid maslínic exerceix un efecte hipolipemiant per tal com pot disminuir els nivells de colesterol total i de triglicèrids (Liu *et al.*, 2007b). Aquesta mateixa activitat també se li ha

conferit a l'extracte de l'oli de pinyolada, el qual té una quantitat d'àcid maslínic determinada (Liu *et al.*, 2011).

1.3.6. Neuroprotector

L'activitat neuroprotectora de l'àcid maslínic s'ha observat en tant que regula la concentració extracel·lular de glutamat, neurotransmissor del cervell que pot actuar com una neurotoxina molt potent en cas d'acumulació (Qian *et al.*, 2011a). Així mateix, en cèl·lules neuronals danyades per una privació de glucosa i oxigen, un pretractament amb àcid maslínic disminueix l'expressió del gen Bax i la sortida de lactat deshidrogenasa intracel·lular (Huang *et al.*, 2013), augmentant la viabilitat d'aquestes cèl·lules. Cal fer esment que el gen Bax és un gen de la família Bcl-2 encarregat de promoure l'apoptosi i que la sortida de la cèl·lula de l'enzim lactat deshidrogenasa es dona en cas de dany tissular i per tant, és un bon indicador de la integritat de la membrana cel·lular i la viabilitat de les cèl·lules (Legrand *et al.*, 1992; Oltval *et al.*, 1993). També s'ha demostrat en un estudi *in vitro* que l'àcid maslínic disminueix el dany neuronal i l'apoptosi mitjançant la supressió de l'activació de la sintasa d'òxid nítric (Qian *et al.*, 2011b).

1.4. FARMACOCINÈTICA

La farmacocinètica és l'estudi de la trajectòria dels fàrmacs dins l'organisme viu des que són administrats fins que s'eliminen. Per tant, inclou l'absorció o procés d'entrada del fàrmac dins l'organisme, la distribució del mateix en el medi intern (sang, limfa, secrecions) i els diferents òrgans, el metabolisme i l'excreció del fàrmac i dels metabòlits que en resulten. Aquests processos anomenats ADME (absorció, distribució, metabolisme i excreció) es donen de forma simultània dins l'organisme i són els responsables de l'evolució temporal de les concentracions plasmàtiques dels fàrmacs (Van de Waterbeemd i Gifford, 2003).

1.4.1. Absorció

Es considera com absorció el procés del pas d'una molècula des del lloc d'administració fins al lloc de mesura dins de l'organisme (Benedetti *et al.*, 2009). Durant aquest procés es pot produir una pèrdua de fàrmac o retard en la seva absorció depenent de les característiques del compost i de la via d'administració. Aquesta última pot ser parenteral, en què s'inclou l'administració intravenosa, subcutània, intramuscular i intraarterial, o no parenteral, com la oral, sublingual i rectal entre d'altres. La via oral és la forma d'administració no parenteral més comuna a la pràctica clínica diària. Tot i així, els compostos administrats per aquesta via han de superar diverses barreres per tal d'evitar pèrdues durant la seva absorció gastrointestinal (Benedetti *et al.*, 2009). Primer de tot, és

necessari que el compost pugui disgregar-se de la seva formulació i, posteriorment, cal que es dissolgui en els diferents fluids del tracte gastrointestinal, on es troba amb diferents pH i enzims (gàstriques i intestinals), i la presència o no d'aliment (Calvo Dúo *et al.*, 2010). Tot això pot condicionar l'absorció del compost afectant tant la velocitat d'absorció com la quantitat absorbida.

Quan el compost arriba a l'estómac, a mesura que augmenta el temps de permanència dins d'aquest òrgan, el percentatge d'absorció del compost per part de la mucosa gàstrica també augmenta (Rowland i Tozer, 1995). Un cop es buida l'estómac, el compost arriba a l'intestí prim, on es produeix la major part de l'absorció donada la seva elevada superfície i vascularització. En aquest punt, l'absorció pot veure's modificada per factors propis del compost o dependents de l'organisme, destacant, entre aquests últims, el peristaltisme intestinal, així com la presència de proteïnes transportadores que poden tornar el compost a la llum intestinal (Calvo Dúo *et al.*, 2010).

Per últim, per tal que el compost arribi a la circulació sistèmica, és necessari que travessi la membrana de l'epiteli intestinal. Aquest pas es pot donar a través de dues vies: la paracel·lular i la transcel·lular. La ruta paracel·lular (Figura 1.6.A) és una via aquosa a través de l'espai intercel·lular que hi ha entre les cèl·lules adjacents a l'epiteli intestinal. Aquest espai està restringit per les unions estretes que es troben a la part més apical de les cèl·lules (Cano-Cebrián *et al.*, 2005). La contribució d'aquesta ruta en l'absorció és molt petita ja que l'espai intercel·lular a l'epiteli intestinal només ocupa un 0,1% de la seva superfície i la presència d'unions estretes dificulta el pas de substàncies (Cano-Cebrián *et al.*, 2005).

La ruta transcel·lular (a través de la cèl·lula) (Figura 1.6) es basa en el pas de compostos a través de l'enteròcit mitjançant dues membranes plasmàtiques, compostes per la membrana apical, que separa el líquid luminal del citoplasma cel·lular, i la membrana basolateral, que separa el citoplasma del líquid intersticial (Chan *et al.*, 2004). Aquest pas es pot realitzar mitjançant difusió passiva a favor de gradient (B) o per transport mediat, és a dir, emprant proteïnes que actuen com a transportadors de membrana (Sugano *et al.*, 2010). Quan el transport mediat és actiu (C), es necessita energia (ATP) per tal que el procés tingui lloc. Quan aquesta energia s'aconsegueix de forma directa, s'anomena transport actiu primari i quan s'aconsegueix de forma indirecta, es tracta del transport actiu secundari (Sugano *et al.*, 2010). En els casos que no es requereix energia, es parla de transport facilitat (D) en què s'empra una proteïna transportadora i el pas de les molècules es realitza a favor de gradient.

També pot passar que les molècules transportades a l'interior de l'enteròcit siguin retornades a la llum intestinal per part de transportadors de membrana (E), o que les substàncies absorbides siguin metabolitzades dins l'enteròcit i aquestes passin al torrent sanguini (F), o surtin a la llum intestinal (G). En qualsevol cas, es produeix una limitació de la seva absorció (Calvo Dúo *et al.*, 2010).

A més de les vies d'absorció explicades anteriorment, existeixen altres formes d'absorció de compostos, com ara la transcitosi, en què s'engloba l'endocitosi i l'exocitosi. Per últim, pot succeir que compostos que es troben en la circulació sistèmica surtin a la llum intestinal (H).

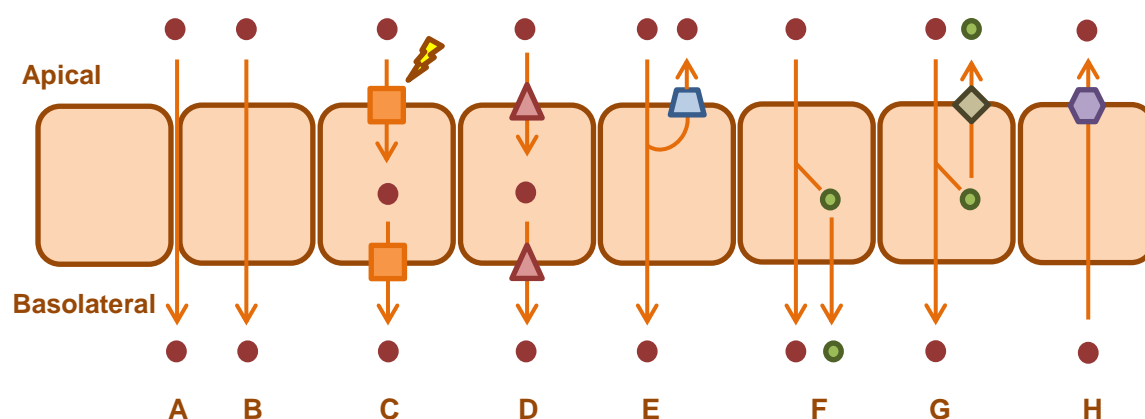


Figura 1.6. Absorció de compostos a través de l'epiteli intestinal (modificat de Chan *et al.*, 2004). A) Ruta paracel·lular. Via transcel·lular: B) difusió passiva; C) transport actiu; D) transport facilitat; E) retorn a la llum intestinal de compostos mitjançant transportadors de membrana; F) metabolisme a l'enteròcit i absorció de metabòlits; i, G) retorn a la llum intestinal de metabòlits mitjançant transportadors de membrana. H) Pas d'una molècula des del torrent sanguini a la llum intestinal.

1.4.2. Distribució

Aquest procés correspon al pas, reversible, dels compostos d'una localització a una altra de l'organisme i es dona de forma concomitant amb l'absorció i l'excreció (Roberts i Buckley, 2007). El grau de distribució ve determinat per diversos factors, com la fixació a proteïnes, la fixació a teixits i els volums dels diferents components de l'aigua corporal, com ara el plasma, el líquid intersticial i el líquid intracel·lular (Calvo Dúo *et al.*, 2010).

Quan els compostos passen a la sang, poden circular en forma lliure, però la majoria de vegades ho fan fixats a proteïnes plasmàtiques o eritròcits. Dins d'aquestes proteïnes s'inclouen l'albumina, l' α -glicoproteïna àcida (AGA), les lipoproteïnes i les α -, β - i γ -globulines, tot i que l'albumina i l'AGA són les proteïnes majoritàries en plasma responsables de la fixació de molts compostos (Fan i de Lannoy, 2014). L'AGA es fixa a

compostos per interaccions hidrofòbiques no específiques i en general, l'afinitat de fixació per l'AGA és major que per l'albumina (Fan i de Lannoy, 2014).

El grau de fixació d'un compost a proteïnes plasmàtiques pot variar considerablement entre diferents espècies mentre que el grau de fixació a teixits presenta resultats similars entre espècies diferents (Kwon, 2001; Di *et al.*, 2011). Generalment la forma lliure dels compostos és la que arriba en concentracions majors o menors als diferents teixits, després de patir processos de difusió passiva i/o transport actiu. Aquells teixits més perfosos (com el cor, el fetge, els ronyons o l'encèfal) s'enriquiran abans del compost a causa del seu elevat flux sanguini regional (Calvo Dúo *et al.*, 2010). També cal tenir en compte que la presència de transportadors en els diferents teixits afectarà a la distribució del compost (Roberts i Buckley, 2007).

1.4.3. Metabolisme

El metabolisme comprèn un seguit de reaccions de transformació a les quals pot ser sotmès un xenobiòtic, que són molècules alienes a l'organisme sense cap paper fisiològic com per exemple, els fàrmacs o molècules naturals com l'àcid maslínic, per tal de convertir-lo en una substància més polar de forma que es facilita la seva eliminació (Testa i Krämer, 2006; Benedetti *et al.*, 2009).

Les reaccions que formen part del metabolisme implicat en la biotransformació de xenobiòtics es classifiquen en reaccions de fase I i de fase II. Les primeres són reaccions que comprenen oxidacions, reduccions i hidròlisis que donen lloc a la formació de metabòlits que poden ser farmacològicament actius, inactius o tòxics (Benedetti *et al.*, 2009; Calvo Dúo *et al.*, 2010). Els enzims de fase I permeten la introducció de grups funcionals (-OH, -COOH, -SH, -O- o NH₂) sent la reacció més comuna l'addició d'un àtom d'oxigen per la formació d'un grup hidroxil (oxidació) (Gavhane i Yadav, 2012). El sistema enzimàtic del citocrom P450 és el que porta a terme la majoria de reaccions de fase I (Paine *et al.*, 2006). D'altra banda, les reaccions de fase II realitzen reaccions de conjugació que, en general, donen lloc a substàncies més hidròfiles que els compostos pare. Aquestes reaccions inclouen la glucuronització, la sulfatació, la metilació, l'acetilació i conjugacions amb aminoàcids i glutatió (Jancova *et al.*, 2010), que impliquen l'actuació d'enzims, majoritàriament transferases, en què s'inclouen la uridin-difosfat-glucuronosil-transferases, sulfotransferases, N-acetiltransferases, glutatió S-transferases i metiltransferases (Gavhane i Yadav, 2012). Aquests enzims, a més d'estar implicats en la biotransformació de compostos endògens i xenobiòtics per tal de facilitar la seva excreció, participen en la inactivació metabòlica de compostos farmacològicament actius (Jancova *et al.*, 2010).

A part de les reaccions de transformació de fase I i de fase II, cal tenir en compte els processos de transport implicats en el metabolisme ja que juguen un paper molt important en l'eliminació de xenobiòtics. Les anomenades reaccions de fase 0 i fase III són les que engloben aquests processos, transportant la molècula sense alterar la seva fórmula química. Les reaccions de fase 0 s'encarreguen de reduir el pas de xenobiòtics a l'interior de la cèl·lula mentre que les reaccions de fase III s'encarreguen d'eliminar els productes resultants del metabolisme (Dietrich *et al.*, 2003).

El principal òrgan de biotransformació de compostos és el fetge, on accedeixen els xenobiòtics a través de la vena porta i es poden metabolitzar fins a ser degradats, en part o en la seva totalitat, pels enzims hepàtics abans d'arribar a la circulació sistèmica. L'intestí prim també posseeix competències metabòliques importants contribuint a la limitació de l'absorció del compost (Kaminsky i Zhang, 2003; Thelen i Dressman, 2009). La pèrdua que es produeix d'aquests compostos a l'intestí i al fetge s'anomena "efecte de primer pas" (Benedetti *et al.*, 2009) i condiona la fracció de xenobiòtic disponible.

A més del metabolisme de xenobiòtics que es produeix dins els òrgans, cal tenir en compte les biotransformacions que poden tenir lloc donada l'activitat metabòlica de la microbiota intestinal. El metabolisme produït per la flora bacteriana sobre els compostos es pot veure modificat segons la varietat d'espècies i el nombre que la representen i factors ambientals, com ara la dieta o l'administració d'antibiòtics. Així com succeeix en els òrgans a causa de les biotransformacions produïdes pels enzims, la microbiota intestinal també pot activar o desactivar els metabòlits resultants del seu metabolisme (Kang *et al.*, 2013).

La flora bacteriana pot catalitzar reaccions de diferents tipus com ara reduccions, deshidroxilacions, acetilacions, trencament d'anells i desalquilacions i hidrolitzar glicòsids, glucurònids, sulfats, amides i esters (Sousa *et al.*, 2008).

1.4.4. Excreció de l'organisme

Quan els compostos inalterats o els metabòlits originats han arribat a la circulació sistèmica i han estat distribuïts, l'organisme activa diferents mecanismes per tal d'eliminar-los. Els principals òrgans encarregats d'aquest procés són el ronyó i el fetge, encara que altres com el pulmó, la suor, la saliva o la llet materna poden exercir la mateixa funció amb substàncies concretes (Benedetti *et al.*, 2009; Calvo Dúo *et al.*, 2010). Per una banda, l'excreció renal és la principal via d'eliminació de compostos i metabòlits de l'organisme, que es caracteritzen per ser hidrosolubles i tenir un baix pes molecular (Calvo Dúo *et al.*, 2010; Fan i de Lannoy, 2014). Per l'altra banda, l'excreció

biliar s'encarrega d'eliminar els xenobiòtics i els seus derivats dels hepatòcits. Els compostos excretats per aquesta via tenen un pes molecular superior a 500, com els metabòlits conjugats amb glucurònid (Fan i de Lannoy, 2014). Atès que el flux biliar és relativament lent (0,06 i 0,008 mL/min/kg en rates i humans, respectivament), l'excreció biliar no és una ruta majoritària d'eliminació. A més, els compostos excretats dins del tracte gastrointestinal per la via biliar poden ser reabsorbits i retornats a la circulació sistèmica. Per a metabòlits conjugats excretats dins la bilis, es pot donar la desconjugació i reabsorció intestinal com a compostos intactes. A aquest cicle se l'anomena recirculació enterohepàtica, que està normalment associada amb l'aparició de diversos pics de concentració en el plasma al llarg del temps (Fan i de Lannoy, 2014).

1.4.5. Anàlisi farmacocinètic

Per tal de poder estimar els paràmetres farmacocinètics que permetran descriure i interpretar els processos ADME d'un compost es poden emprar diferents mètodes d'anàlisi farmacocinètic (Benedetti *et al.*, 2009; Doménech i Martínez., 2013; Fan i de Lannoy, 2014). A grans trets es poden classificar en mètodes no compartimentals i mètodes compartimentals. L'aproximació no compartimental és la més senzilla i no precisa ajustar les dades experimentals a un model determinat per poder estimar els paràmetres farmacocinètics (Doménech *et al.*, 2013a). Per contra, el mètode compartimental es basa en considerar l'organisme com un sistema d'un o més compartiments de distribució homogènia, en què les dades experimentals s'ajusten a un model farmacocinètic o equació matemàtica (Fan i de Lannoy, 2014; Doménech i Martínez, 2013). A nivell pràctic, els models compartimentals més emprats són els formats per un o dos compartiments anomenats monocompartimentals i bicompartimentals (Doménech i Martínez, 2013).

a) Model monocompartimental. Administració per bolus intravenós

En aquest model lineal i obert, es considera que tots els teixits i fluids de l'organisme es troben en un únic compartiment (Figura 1.7) i s'assumeix que el compost es distribueix de forma instantània i homogènia per tot l'organisme (Dhillon i Gill, 2006; Calvo Dúo *et al.*, 2010). El fet de considerar lineal el model implica que el procés d'eliminació del compost es regeix per una cinètica d'ordre 1. Així mateix, s'anomena obert perquè el compost entra i surt del mateix compartiment (Peraire *et al.*, 2013).



Figura 1.7. Esquema representatiu del model monocompartimental intravenós.

L'administració intravenosa permet estimar tots els paràmetres farmacocinètics a excepció dels derivats del procés d'absorció, que s'obtenen mitjançant els perfils plasmàtics d'una via extravascular (Rowland i Tozer, 1995).

El model monocompartimental es caracteritza per tres paràmetres: el volum de distribució (V_d), l'aclariment (CL) i la k_e (Calvo Dúo *et al.*, 2010).

❖ Volum de distribució (V_d)

El volum de distribució es podria definir com el factor de proporcionalitat entre la quantitat de compost present en l'organisme i la concentració plasmàtica observada (Toutain i Bousquet-Mélou, 2004a; Peraire *et al.*, 2013). Aquest paràmetre posseeix una propietat important: per a cada compost, a unes condicions biològiques donades (salut, patologia, edat, embaràs), el valor del V_d és constant, per tant, en cada una d'aquestes condicions les concentracions plasmàtiques són proporcionals a la quantitat administrada. Per tal de calcular el V_d , es divideix la dosi administrada entre la concentració inicial del compost mesurada en el plasma (C_0) (Peraire *et al.*, 2013). S'assumeix que en aquest primer moment no hi ha eliminació del compost (Toutain i Bousquet-Mélou, 2004a; Calvo Dúo *et al.*, 2010).

$$V_d = \text{Dosi} / C_0$$

❖ Aclariment (CL)

Aquest paràmetre mesura la capacitat que té l'organisme per eliminar de forma irreversible un compost de la circulació sistèmica (Toutain i Bousquet-Mélou, 2004b; Calvo Dúo *et al.*, 2010). El CL s'expressa com el volum de sang o plasma que està depurat de compost per unitat de temps per kg de pes viu (Peraire *et al.*, 2013). La majoria de compostos estan aclarits per un mínim de dues vies. Per una banda, el fetge és el principal òrgan on es produeix la biotransformació de compostos; per l'altra, el ronyó és l'òrgan encarregat de l'eliminació i excreció de molècules (Armijo, 1997; Dhillon i Gill, 2006; Benedetti *et al.*, 2009). Tot i així, altres òrgans també posseeixen la capacitat de biotransformació en menor mesura i l'eliminació del compost també es pot donar per altres vies. En aquestes situacions, l'aclariment total (CL_T) és la suma dels valors parcials d'aclariment (Benedetti *et al.*, 2009). Per tal de calcular CL_T , es divideix la dosi

administrada per via intravenosa per l'àrea sota la corba de les concentracions plasmàtiques (AUC), que dóna la següent relació (Benedetti *et al.*, 2009):

$$CL_T = \text{Dosi}_{iv} / \text{AUC}_{iv}$$

❖ Constant d'eliminació (k_e) o semivida d'eliminació d'un compost ($t_{1/2\beta}$)

Es tracta d'un sol paràmetre expressat de dues formes diferents (Calvo Dúo *et al.*, 2010). La k_e és una constant de velocitat expressada en unitats de temps inverses i indica el percentatge de compost eliminat per unitat de temps. El temps de semivida ($t_{1/2\beta}$) es defineix com el temps que triga una determinada concentració plasmàtica de compost en reduir-se a la meitat; s'expressa en unitats de temps (Toutain i Bousquet-Mélou, 2004c; Calvo Dúo *et al.*, 2010). En un model monocompartimental, el procés d'eliminació comença en el moment en què el compost ingressa a la circulació general. Per tal de poder calcular la k_e , cal dividir el logaritme neperià de 2 (0,693) entre la $t_{1/2\beta}$, la qual s'obté de la multiplicació de 0,693 pel V_d i la posterior divisió pel CL (Toutain i Bousquet-Mélou, 2004c; Dhillon i Gill, 2006; Calvo Dúo *et al.*, 2010).

$$k_e = 0,693 / t_{1/2} \quad t_{1/2} = (0,693 \cdot V_d) / CL$$

b) Model monocompartimental. Administració extravascular

En l'administració extravascular s'engloben totes aquelles administracions que no són administrades directament en el torrent sanguini. Una de les més emprades per la seva comoditat és l'administració oral (Calvo Dúo *et al.*, 2010). Per tal de poder obtenir els paràmetres després de l'administració per aquesta via, cal tenir en compte una sèrie de premisses. En primer lloc, s'assumeix que l'entrada a l'organisme es realitzarà seguint les lleis de la difusió passiva, és a dir, d'ordre 1, i que la distribució i eliminació tenen lloc de la mateixa manera que si el compost s'hagués administrat per via intravenosa (Calvo Dúo *et al.*, 2010; Doménech *et al.*, 2013b). En segon lloc, cal tenir en compte que es produeixen tres fenòmens al mateix temps: la desaparició del compost del lloc d'absorció, l'ingrés del mateix al compartiment central, des d'on es distribueix als diferents teixits i òrgans, per posteriorment reingressar a la circulació general, on simultàniament és eliminat (Calvo Dúo *et al.*, 2010; Doménech *et al.*, 2013b) (Figura 1.8).

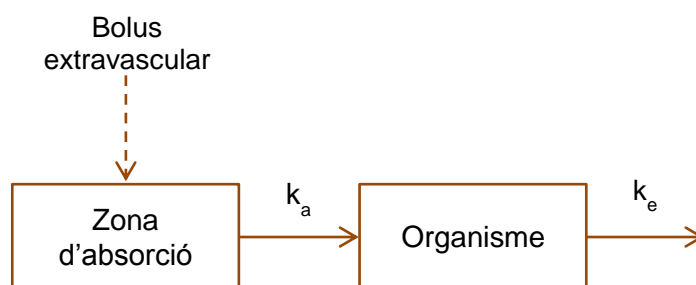


Figura 1.8. Esquema representatiu del model monocompartimental extravascular (oral) (Adaptat de Doménech *et al.*, 2013b).

Els paràmetres farmacocinètics a obtenir després d'una administració oral són la constant d'absorció (k_a), la màxima concentració plasmàtica (C_{max}) i el temps en què es dona el paràmetre anterior (T_{max}) (Calvo Dúo *et al.*, 2010; Doménech *et al.*, 2013b).

❖ Constant d'absorció (k_a)

Aquest paràmetre indica la fracció de compost present en el lloc d'absorció que s'absorbeix per unitat de temps (Armijo, 1997; Calvo Dúo *et al.*, 2010). Si k_a és major que 1, indica que en una unitat de temps, la pràctica totalitat del compost s'haurà absorbit en aquest interval de temps. Un valor elevat de k_a (>1 1/h) indica una ràpida absorció (Calvo Dúo *et al.*, 2010). Aquest paràmetre dependrà de les propietats fisicoquímiques del compost, de la forma farmacèutica emprada o de les característiques del lloc d'absorció (Calvo Dúo *et al.*, 2010; Fan i de Lannoy, 2014).

❖ Màxima concentració plasmàtica (C_{max})

Aquest paràmetre es dona quan la velocitat d'absorció s'iguali a la d'eliminació i permet avaluar de forma subjectiva tant la quantitat com la velocitat de compost absorbit (Doménech *et al.*, 2013b). La quantitat absorbida es pot avaluar ja que el valor de C_{max} és proporcional a la quantitat de compost introduït a la circulació general. Com més lenta sigui la velocitat d'absorció, el valor de C_{max} serà menor i apareixerà més tard (Rosenbaum, 2011a) (Figura 1.9).

❖ Temps estimat en què s'assoleix la màxima concentració (T_{max})

Aquest paràmetre és un indicador de la velocitat del procés d'absorció (Rosenbaum, 2011a). Quan el compost s'absorbeix ràpidament, el valor de T_{max} és molt petit, mentre que si la velocitat d'absorció és molt lenta, el temps al qual es produeix C_{max} és més elevat (Rosenbaum, 2011a) (Figura 1.9).

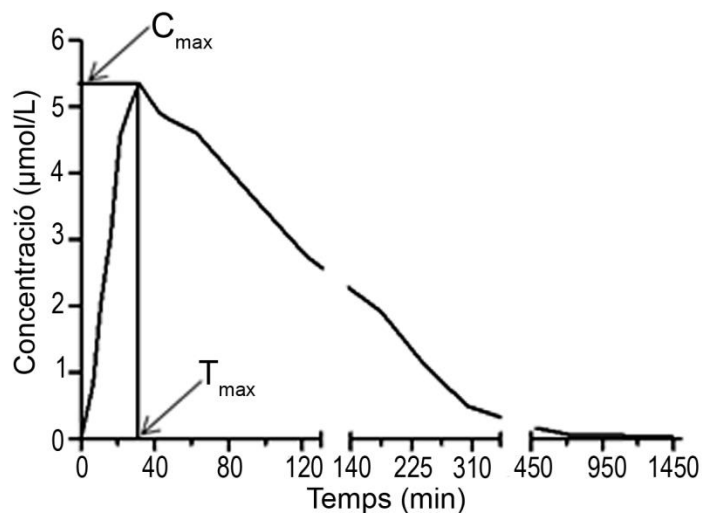


Figura 1.9. Representació gràfica dels paràmetres farmacocinètics C_{max} i T_{max} (adaptat de Doménech *et al.*, 2013b)

❖ Biodisponibilitat (F)

És un paràmetre que permet definir la fracció de compost administrat que arriba a la circulació sistèmica i que, per tant, està en disposició d'arribar al lloc on ha de fer la seva acció (Calvo Dúo *et al.*, 2010; Rosenbaum, 2011a). La biodisponibilitat s'expressa com una proporció de l'AUC d'una via d'administració (ex. oral) envers la intravenosa. En no haver procés d'absorció, la via intravenosa representa la biodisponibilitat màxima (100%). Per tal de poder calcular la biodisponibilitat se segueix la següent relació (Benedetti *et al.*, 2009):

$$F = (AUC_{oral} / AUC_{iv}) \cdot (Dosi_{iv} / Dosi_{oral})$$

Una de les causes de pèrdua de biodisponibilitat en l'administració oral és l'efecte de primer pas, en què part del compost pot ser metabolitzat pel fetge i per tant, no està disponible per ser distribuït als teixits (Fan i de Lannoy, 2014). De vegades, la biodisponibilitat és baixa perquè, per les seves característiques, el compost no s'absorbeix en la seva totalitat (Rowland i Tozer, 1995).

c) Model bicompartimental. Administració per bolus intravenós

Els models monocompartimentals no sempre serveixen per predir l'evolució de les concentracions plasmàtiques en funció del temps. De vegades, són necessaris models més complexos, anomenats models multicompartimentals (Calvo Dúo *et al.*, 2010; Peraire *et al.*, 2013).

En aquest tipus de models es consideren dos o més compartiments, l'anomenat "compartiment central" on s'inclouen el plasma o sang i els teixits més irrigats, i els

“compartiments perifèrics” compostats per aquells teixits i òrgans menys perfosos però amb un flux i afinitat amb el compost semblant entre ells (Calvo Dúo *et al.*, 2010; Rosenbaum, 2011b; Peraire *et al.*, 2013).

El model més habitual dins d'aquest tipus és el model bicompartimental (Figura 1.10) format per un compartiment anomenat “central” dins el qual es distribueix el compost amb un volum central anomenat “ V_c ”, i un compartiment “perifèric” amb un volum perifèric anomenat “ V_p ” (Peraire *et al.*, 2013). L'equilibri entre ambdós compartiments es regula per microconstants de transferència (k_{12} i k_{21}) i es considera, generalment, que els compostos surten del compartiment central amb una velocitat d'eliminació reeixida per la k_e (Calvo Dúo *et al.*, 2010; Peraire *et al.*, 2013). Tant la transferència del compost del compartiment central al perifèric com la seva eliminació des del compartiment central, es realitza per processos d'ordre 1 (Peraire *et al.*, 2013).

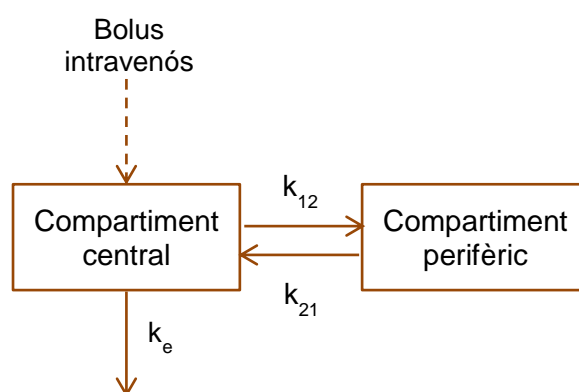


Figura 1.10. Esquema representatiu del model bicompartimental intravenós (Adaptat de Peraire *et al.*, 2013).

Si es representen les concentracions plasmàtiques segons aquest model fent servir una escala semilogarítmica es poden distingir dues fases (Figura 1.11). En la primera, anomenada fase α o fase ràpida predomina el procés de distribució i es regula el pas del compost del compartiment central al perifèric, així com també intervenen el retorn del perifèric al central i l'eliminació (Calvo Dúo *et al.*, 2010). En la segona fase, anomenada fase β o fase lenta, predomina el procés d'eliminació, en què ja s'ha arribat a un equilibri entre la distribució del compartiment central i el perifèric (Calvo Dúo *et al.*, 2010).

Aquestes dues fases estan regides per dues macroconstants de disposició anomenades α i β (Peraire *et al.*, 2013). La constant de velocitat de disposició ràpida (α) regeix la fase α i la constant de velocitat de disposició lenta (β) regeix la fase β (Peraire *et al.*, 2013). Ambdues macroconstants de disposició depenen tant de la k_e com de les microconstants de transferència k_{12} i k_{21} (Calvo Dúo *et al.*, 2010). Per tant, una modificació en qualsevol d'aquestes constants produirà que el valor d' α i β canviï.

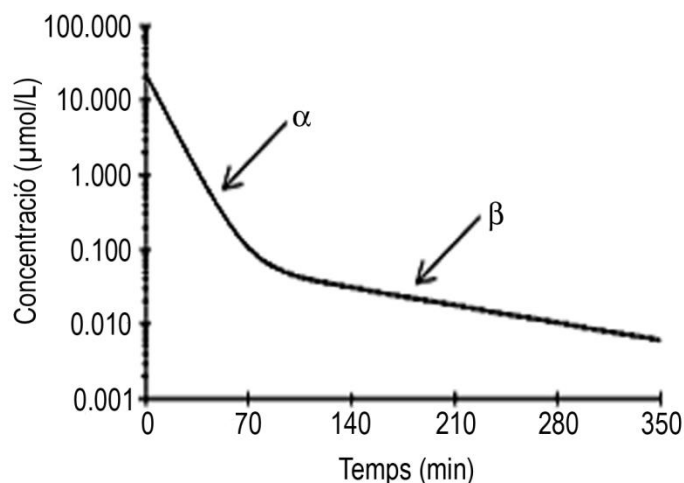


Figura 1.11. Evolució temporal de les concentracions plasmàtiques d'un compost amb escala semilogarítmica després d'una administració intravenosa de dosi única seguint un model bicompartimental.

Cal tenir en compte que, igual que en el model monocompartimental, en aquest també es pot estimar la semivida aparent de distribució i eliminació ($t_{1/2\alpha}$ i $t_{1/2\beta}$) segons les següents relacions (Peraire *et al.*, 2013):

$$t_{1/2\alpha} = 0.693 / \alpha \quad t_{1/2\beta} = 0.693 / \beta$$

És important destacar que CL és un paràmetre independent del model i, per tant, és fàcil d'estimar amb relativa precisió a partir de l'AUC (Calvo Dúo *et al.*, 2010). En canvi, el càlcul dels volums de distribució és més complex. El V_c es pot estimar mitjançant el quocient entre la dosi administrada i la concentració plasmàtica a temps zero com es presenta a continuació (Rosenbaum, 2011b; Peraire *et al.*, 2013):

$$V_c = \text{Dosi} / C_0$$

D'altra banda, el V_p és difícil d'estimar ja que es refereix al volum dels teixits (Calvo Dúo *et al.*, 2010). Per tant, se sol determinar de forma indirecta calculant primer el volum quan s'ha establert l'equilibri entre el compartiment central i el perifèric (V_{ss} , volum de distribució a l'estat estacionari). Per al seu càlcul es necessiten altres paràmetres estimats mitjançant anàlisi farmacocinètica compartimental com s'observa en la següent equació (Rosenbaum, 2011b; Peraire *et al.*, 2013):

$$V_{ss} = V_c \cdot (1 + (k_{12} / k_{21}))$$

Tenint en compte que el V_{ss} és la suma dels volums de distribució dels dos compartiments, només cal fer la diferència entre el V_{ss} i el V_c i s'obindrà el V_p (Calvo Dúo *et al.*, 2010).

En resum, un model bicompartimental es defineix per cinc paràmetres: CL , V_c , V_p , k_{12} i k_{21} (Calvo Dúo *et al.*, 2010; Rosenbaum, 2011b).

d) Model bicompartimental. Administració extravascular

L'administració extravascular en els models de dos compartiments inclou el procés d'absorció i els paràmetres farmacocinètics descrits per l'administració intravenosa (Doménech *et al.*, 2013b) (Figura 1.12). El procés d'absorció segueix una cinètica d'ordre 1 amb una constant d'absorció k_a , de la mateixa manera que en un model monocompartimental (Doménech *et al.*, 2013b).

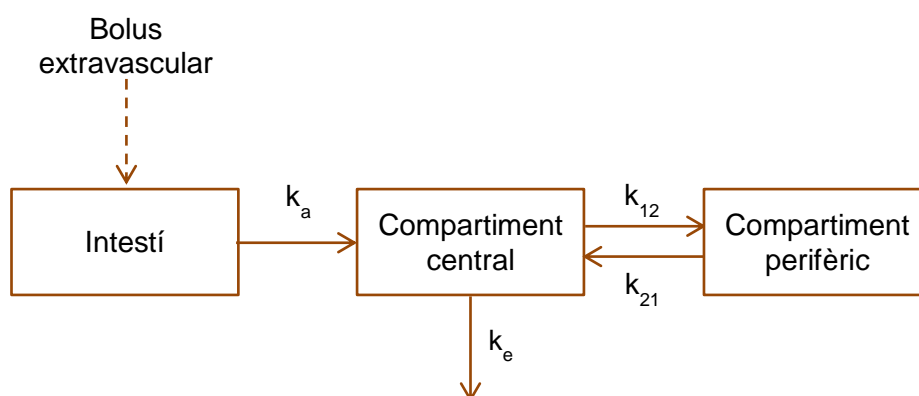


Figura 1.12. Esquema representatiu del model bicompartimental extravascular (oral) (Adapat de Doménech *et al.*, 2013b).

1.4.6. Farmacocinètica poblacional

La farmacocinètica poblacional pot definir-se com l'estudi de les característiques bàsiques d'un compost disponible en la població, considerant la influència de diversos factors fisiopatològics i la magnitud de la variabilitat inter i intraindividual (Barranco-Garduño *et al.*, 2011). Per tant, permet analitzar tota la informació disponible de tots els individus de forma simultània, quantificant tant la magnitud de la variabilitat dins de la població com l'estudi de la contribució de determinades característiques, demogràfiques, fisiopatològiques o terapèutiques en aquesta variabilitat (Fernández *et al.*, 2013).

En el moment de dissenyar un estudi farmacocinètic poblacional cal tenir en compte les possibles limitacions pràctiques del disseny, com ara el temps d'extracció de mostra, el nombre de mostres per individu i el nombre d'individus participants (FDA, 1999). Així doncs, es poden emprar tres dissenys de mostreig per tal d'obtenir informació sobre la variabilitat farmacocinètica (FDA, 1999):

1. *Obtenció d'una mostra per a cada individu.* Aquest mètode estima la variabilitat de les concentracions plasmàtiques o sèriques d'un compost i permet realitzar en forma qualitativa una correlació de covariables, identificant diferències entre subpoblacions. Tot i així, aquest disseny requereix una gran quantitat de pacients per tal que els resultats puguin ser representatius (Barranco-Garduño *et al.*, 2011).
2. *Obtenció de dos o tres mostres per a cada individu obtingudes en estat estable.* Aquest disseny relaciona la concentració plasmàtica observada amb les característiques pròpies de l'individu, obtenint així els paràmetres farmacocinètics (FDA, 1999). A més, permet separar la variabilitat inter i intraindividual mitjançant un model no lineal d'efectes mixtos (NONMEM). Atès que els pacients s'estudien en major detall, el disseny requereix menys individus i la relació entre les característiques dels pacients i les concentracions plasmàtiques s'avaluen amb major precisió (FDA, 1999). Per aquest disseny es requereix un mínim de 50 pacients/animals (Barranco-Garduño *et al.*, 2011).
3. *Obtenció de més de tres mostres.* Aquest disseny també s'anomena disseny farmacocinètic poblacional experimental. En aquest tipus de disseny es prenen mostres a diferents temps d'extracció fins a un màxim de 6 després de l'administració del compost (FDA, 1999). L'objectiu és obtenir diverses concentracions del compost a temps d'extracció diferents per tal de descriure el perfil farmacocinètic poblacional. Aquest tipus de disseny permet l'estimació de paràmetres farmacocinètics poblacionals d'un compost i l'obtenció d'una explicació de la variabilitat emprant l'aproximació NONMEM. Així mateix, aquest disseny explora la relació entre la seva farmacocinètica i les característiques demogràfiques i fisiopatològiques (FDA, 1999).

Els models poblacionals són eines que permeten, per una banda, descriure observacions i per l'altra, predir i explicar el comportament de compostos en una població determinada, per poder aplicar finalment, a un determinat individu, els resultats obtinguts per la població (Calvo Dúo *et al.*, 2010). D'aquesta manera sorgeix el concepte de *farmacocinètica poblacional*, que intenta sintetitzar la informació sobre la cinètica de disposició del compost en grups d'individus i té com a objectius fonamentals els resumits a continuació (Calvo Dúo *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2013):

- ❖ Determinar el valor mitjà dels paràmetres farmacocinètics en diferents grups de població.
- ❖ Avaluar la variabilitat interindividual i intraindividual del comportament farmacocinètic que existeix entre els individus que componen la població.
- ❖ Estimar la variabilitat residual associada a les concentracions experimentals.

- ❖ Identificar i avaluar les relacions quantitatives que existeixen entre els diferents factors demogràfics, fisiopatològics i de tractament amb els paràmetres farmacocinètics.

Un altre dels objectius de la farmacocinètica poblacional és la identificació dels factors responsables de la variabilitat interindividual (Calvo Dúo *et al.*, 2010). L'obtenció del màxim nombre de covariables dels individus permet una millor caracterització de les fonts de variabilitat en els paràmetres. La inclusió d'aquestes covariables en el model de regressió final comporta una reducció de la variabilitat interindividual en els paràmetres farmacocinètics (Calvo Dúo *et al.*, 2010).

Aquests models poblacionals utilitzen mètodes matemáticoestadístics que permeten la integració de diverses dades. D'aquesta manera, s'obtenen estudis farmacocinètics poblacionals que són de gran utilitat per al disseny de la pauta posològica del pacient, per al desenvolupament d'un medicament i per a l'establiment de dosificacions en l'etiquetatge dels fàrmacs (Ette i Williams, 2004).

Tot i que s'han desenvolupat diferents mètodes matemàtics per a la construcció d'un model poblacional, els més utilitzats en l'estimació de paràmetres de població són: el mètode en dos fases i el model d'efectes mixtos no lineals (Barranco-Garduño *et al.*, 2011).

a) Mètode en dos fases

Es basen en l'estimació preliminar dels paràmetres individuals. En la primera fase s'obtenen suficients dades de concentració plasmàtica del compost de cada individu per tal d'estimar els paràmetres farmacocinètics de cada un d'ells (Calvo i Benítez, 2004). En la segona etapa, a partir dels estimats obtinguts en l'apartat anterior, es calculen els valors mitjans poblacionals, així com la variabilitat interindividual dels paràmetres (Calvo i Benítez, 2004; Calvo Dúo *et al.*, 2010). Tot i així, l'assumpció que els valors estimats en la primera etapa són iguals als valors reals dels paràmetres pot induir a una estimació inadequada de la variabilitat dels paràmetres de la població. Per superar aquesta limitació de l'estimació en dos etapes, es requereix un elevat nombre d'experiments amb un mínim error en les mesures (Calvo Dúo *et al.*, 2010).

b) Model d'efectes mixtos no lineals

Aquests models calculen simultàniament el conjunt de paràmetres fixos (paràmetres farmacocinètics) i aleatoris (variabilitat interindividual i residual) que tenen major probabilitat de produir-se (Barranco-Garduño *et al.*, 2011). Per poder realitzar aquest càlcul s'han d'emprar els següents components:

❖ Model estructural

El model estructural descriu el comportament farmacocinètic mitjà del compost en la població d'estudi. En una primera etapa s'identifica el model estructural base que és aquell que millor descriu les observacions en absència de covariables (Fernández *et al.*, 2013). Normalment s'escull un model farmacocinètic compartimental (veure apartat 1.4.5) d'acord amb criteris estadístics, precisió en els paràmetres i mitjançant l'exploració de gràfics de bondat de l'ajust. Un cop seleccionat el model base, es desenvolupa el model de covariables que consisteix en incloure aquells factors de pronòstic que puguin tenir una influència clínica i estadísticament significativa en algun dels paràmetres farmacocinètics del model base (Fernández *et al.*, 2013). Cal recordar que el model estructural, que pot incorporar o no covariables, proporciona els paràmetres d'efectes fixos els quals quantifiquen els paràmetres cinètics del compost per a tota la població de l'estudi.

❖ Model estadístic

El model estadístic descriu els dos nivells de variabilitat o efectes aleatoris, és a dir, la variabilitat interindividual i l'error residual, encara que també inclou la descripció de la variabilitat interocasió quan les dades ho permeten (Fernández *et al.*, 2013). Els paràmetres d'efectes aleatoris interindividuals descriuen els valors dels paràmetres individuals en relació al valor típic poblacional (Figura 1.13). La diferència entre els paràmetres per a un individu i el valor típic d'aquest paràmetre per a la població s'anomena " η " i la distribució de η per a tots els individus dins la població pot ser descrita pel valor mitjà i la variància de la distribució anomenada " ω " (Barranco-Garduño *et al.*, 2011). Per contra, els paràmetres d'efectes aleatoris residuals quantifiquen la magnitud de la variabilitat residual, inclosa la variabilitat cinètica intraindividual, l'error de la tècnica analítica i l'error d'especificació del model, entre altres (Barranco-Garduño *et al.*, 2011).

En l'anàlisi poblacional d'efectes mixtos, totes les dades de tots els pacients que integren l'estudi s'analitzen simultàniament, encara que preservant la seva individualitat (Barranco-Garduño *et al.*, 2011). És a dir, s'estimen els paràmetres farmacocinètics típics (mitjanes) de la població, la forma en què diferents factors afecten o no les concentracions d'un compost, com els fixos, i els valors de variabilitat interindividual i de variabilitat residual (Figura 1.14).

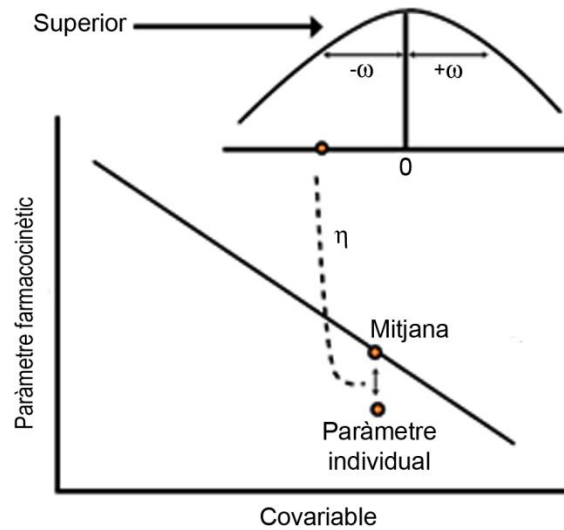


Figura 1.13. Variabilitat interindividual en els paràmetres farmacocinètics. η : diferència entre el paràmetre per a un individu i el valor mitjà d'aquest paràmetre en la població. ω : variància de la distribució (Modificat de Barranco-Garduño *et al.*, 2011).

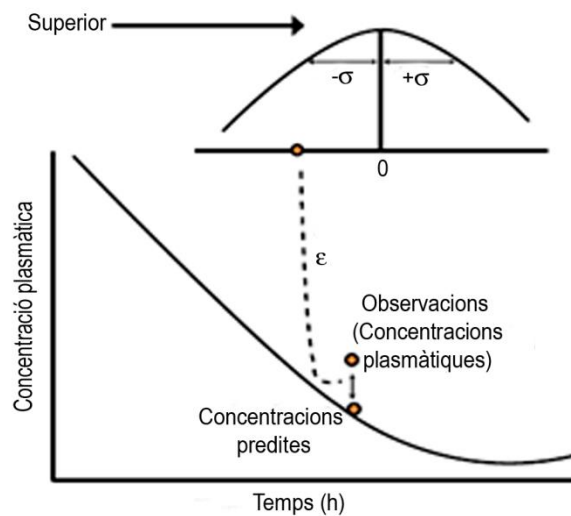


Figura 1.14. Variabilitat residual o intraindividual en un model poblacional. ϵ : diferència entre les concentracions observades i les predites. σ : variància de la distribució (Modificat de Barranco-Garduño *et al.*, 2011).

Les diferències entre les concentracions observades i les predites pel model es defineixen per ϵ . La distribució d' ϵ per a totes les concentracions en tots els individus de la població pot ser descrita pel valor mitjà i la variància de distribució σ (Barranco-Garduño *et al.*, 2011).

Introducció

Els mètodes matemàtics per a la construcció de models poblacionals han estat implantats en programes informàtics, com per exemple el NONMEM, que utilitza models d'efectes mixtos no lineals (Calvo Dúo *et al.*, 2010).

En resum, es pot concloure que la farmacocinètica poblacional emprà mètodes no lineals paramètrics per tal d'estimar constants farmacocinètiques, variabilitat inter i intraindividual i la influència de múltiples factors quan només es disposa de dades escasses, tant en poblacions homogènies com heterogènies (Barranco-Garduño *et al.*, 2011).

II. PLANTEJAMENT I OBJECTIUS

L'àcid maslínic (2 α , 3 β -dihidroxi-olean-12-en-28òic) és un triterpè pentacíclic biològicament actiu que s'ha aïllat de diferents espècies de plantes, tant comestibles com medicinals (Romero *et al.*, 2010; Caligiano *et al.*, 2013; Uto *et al.*, 2013). Aquest compost minoritari ha estat recentment descrit en vegetals frescos (Lin *et al.*, 2011), fruites (Li *et al.*, 2011) i llegums (Kalogeropoulos *et al.*, 2010), sent especialment freqüent en les fulles i els fruits de l'olivera. L'àcid maslínic ha demostrat exercir diferents activitats relacionades en la promoció de la salut, com ara els seus efectes antiinflamatori (Huang *et al.*, 2011), vasodilatador (Dongmo *et al.*, 2011), antioxidant (Allouche *et al.*, 2010), hipoglucemiant (Liu *et al.*, 2014; Mkhwanazi *et al.*, 2014) i antitumoral (Juan *et al.*, 2008; Reyes-Zurita *et al.*, 2011; Sánchez-Tena *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014b).

La majoria d'aquestes activitats biològiques s'han descrit *in vitro* i pocs són els treballs realitzats en models animals, dificultant la possibilitat d'extreure conclusions sobre els efectes de l'àcid maslínic en l'ésser viu. D'aquí l'interès del grup de Fisiologia i Nutrició Experimental (2009-SGR-471) per desenvolupar el projecte de recerca titulat *Estudio del ácido maslínico: absorción intestinal y biodisponibilidad* (AGL2009-12866), en el qual s'emmarca la present tesi doctoral i que planteja els objectius següents:

1. Posar a punt i validar un mètode per a la determinació de l'àcid maslínic en plasma

Per poder realitzar estudis sobre els efectes biològics de l'àcid maslínic en els éssers vius, és un requisit bàsic disposar d'un mètode analític validat que permeti determinar aquest compost en plasma per tal de poder establir la seva rellevància fisiològica. Per aquest motiu, el primer objectiu va consistir en posar a punt i validar un mètode que permetés detectar i quantificar l'àcid maslínic en plasma per HPLC-MS.

2. Estudiar la toxicitat de l'àcid maslínic en ratolí

Els aliments funcionals han de ser segurs per al consum. La falta d'estudis sobre la toxicitat de l'àcid maslínic va permetre plantejar el segon objectiu en el qual es va estudiar la presència o absència d'efectes adversos de l'àcid maslínic en ratolí. Poder demostrar la innocuïtat d'aquest triterpè pentacíclic és un resultat de gran importància per al seu possible ús com a ingredient funcional.

3. Desenvolupar un model farmacocinètic de l'àcid maslínic seguint una aproximació poblacional

Un primer pas en l'avaluació de l'àcid maslínic com a ingredient funcional consisteix en conèixer si aquest compost apareix en sang i arriba als teixits diana on pot exercir les seves activitats biològiques. En la bibliografia no s'ha descrit cap estudi de biodisponibilitat de l'àcid maslínic que permeti conèixer el seu comportament dins l'organisme viu. Per aquest motiu, el tercer objectiu del present treball ha consistit en

investigar la farmacocinètica poblacional d'aquest triterpè pentacíclic. Aquesta aproximació ofereix avantatges respecte a la farmacocinètica clàssica atès que permet superar la limitació del mostreig de sang en estudis amb animals d'experimentació i al mateix temps preservar la individualitat dels animals.

4. Identificar i quantificar els metabòlits de l'àcid maslínic en plasma i orina de rata

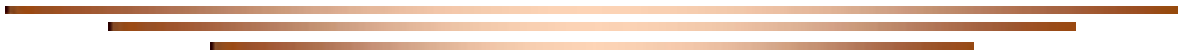
La identificació dels metabòlits té un paper important en la investigació dels components bioactius dels aliments. El metabolisme no només pot afectar la biodisponibilitat en influir en la distribució i l'eliminació, sinó que també cal ser considerat en l'avaluació de l'activitat protectora sobre la salut, atès que els metabòlits podrien contribuir a les activitats biològiques del compost original. A més, conèixer els principals derivats dels fitoquímics és important per tal com podrien ser emprats com a biomarcadors d'ingesta en estudis d'intervenció dietètica. En conseqüència, el quart objectiu ha consistit a identificar els metabòlits en plasma i en orina mitjançant HPLC-MS-ORBITRAP. Aquest espectròmetre d'elevada resolució permet identificar de forma inequívoca els derivats de l'àcid maslínic atès que proporcionen la massa exacta dels anàlits.

III. RESULTATS



L'apartat de Resultats d'aquest treball es troba subdividit en quatre capítols, cadascun dels quals correspon a un dels objectius plantejats. La introducció, el material i mètodes, els resultats, la discussió i les conclusions dels capítols I, II i III es troben recollits en articles publicats entre els anys 2013-2014 i en el capítol IV es troben recollits en format article.

Resultats: Capítol 1



3.1. CAPÍTOL 1. POSADA A PUNT I VALIDACIÓ D'UN MÈTODE PER A LA DETERMINACIÓ DE L'ÀCID MASLÍNIC EN PLASMA

Els resultats d'aquest capítol es troben recollits a l'article 1:

Liquid chromatography-mass spectrometry determination in plasma of maslinic acid, a bioactive compound from Olea europea L.

Marta Sánchez-González, Glòria Lozano-Mena, M. Emília Juan, Andrés García-Granados, Joana M. Planas.

Food Chem. 2013, 141, 4375-4381

Els resultats obtinguts han donat lloc a la següent comunicació en congrés:

- ❖ *Determination by HPLC-MS of plasmatic maslinic acid, a bioactive compound from Olea europaea L.*

Marta Sánchez-González, Glòria Lozano-Mena, M. Emília Juan, Andrés García-Granados, Joana M. Planas.

Presentada com a pòster en el congrés:

World Forum for Nutrition Research Conference
Reus, Espanya, 20 – 21 de maig de 2013

Liquid chromatography-mass spectrometry determination in plasma of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L.

Determinació en plasma per cromatografia líquida d'alta eficàcia acoblada a espectrometria de masses de l'àcid maslínic, un component bioactiu de l'*Olea europaea* L.

M. Sánchez-González, G. Lozano-Mena, M.E. Juan, A. García-Granados, J.M. Planas

Food Chem. 2013, 141(4), 4375-4381

3.1.1. Resum de l'article 1

Objectius. L'àcid maslínic és un triterpè pentacíclic present a la pell del fruit de l'*Olea europea* L. amb activitat antitumoral, antioxidant i cardioprotectora. Malgrat els diferents efectes beneficiosos descrits, el coneixement sobre la biodisponibilitat d'aquest compost és limitat a causa de l'absència d'una tècnica sensible per mesurar la seva concentració en plasma. Per aquest motiu, es va posar a punt i validar un mètode per determinar l'àcid maslínic per cromatografia líquida d'alta eficàcia acoblada a espectrometria de masses (HPLC-MS).

Material i mètodes. L'anàlisi de l'àcid maslínic en plasma (200 µL) es realitza mitjançant una doble extracció líquid-líquid amb acetat d'etil amb posterior evaporació del solvent a sequedat i reconstitució en 100 µL de metanol 80%. Seguidament, 20 µL de mostra s'injecten a un HPLC-MS, en què l'àcid maslínic se separa en una columna Luna C18 (150 mm x 2,0 mm, 5 µm) i elució en gradient emprant aigua i acetonitril, com a fase mòbil, a un flux de 0,8 mL/min. La detecció per MS es realitza en un quadrupol senzill amb font d'ionització química a pressió atmosfèrica (APCI) a 500°C. Les dades es van adquirint en mode de seguiment d'un únic ió (SIM) utilitzant les relacions massa/càrrega (*m/z*) de 471,3 per a l'àcid maslínic i 455,3 per a l'àcid betulínic (patró intern). La validació del mètode analític va incloure la determinació de la linealitat, precisió, recuperació, exactitud, sensibilitat, selectivitat i efecte matriu en mostres de plasma blanc de rata fortificades amb àcid maslínic a diferents concentracions (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5 i 10 µM).

Resultats. El procediment analític és lineal al llarg del rang de concentracions de 0,005 a 10 µM amb coeficients de correlació superiors a 0,997. L'àcid maslínic es recupera en un 99,0 ± 0,9% a les 8 concentracions estudiades, amb una precisió intra-dia que oscil·la entre 1,44 i 5,45%, mentre que la precisió inter-dia va estar entre 2,49 i 8,38%. El mètode és exacte ja que la desviació obtinguda entre les concentracions nominals i les calculades

per a l'àcid maslínic estava compresa entre 0,10% i 4,82%. A més, el mètode és selectiu per al triterpè en evitar la interferència amb altres pics; també és sensible, atès que el límit inferior de quantificació (LLOQ), determinat amb una precisió del 6,22% i una exactitud del 0,50%, va ser de 5 nM. Finalment, per tal de verificar el mètode, es va determinar la concentració d'àcid maslínic en plasma de rata després de l'administració oral de les dosis 10, 25 i 50 mg/kg. Els resultats obtinguts van ser de 10,8; 20,2 i 39,3 nM respectivament, sent tots ells superiors al límit de quantificació.

Conclusions. S'ha posat a punt un mètode analític que permet la determinació d'àcid maslínic en plasma de rata per HPLC-MS, de forma sensible, precisa, exacta, selectiva i reproducible. A més, els resultats obtinguts a la verificació del mètode en detectar aquest triterpè 24 h després de la seva administració oral, demostren la idoneïtat per al seu ús en futurs estudis farmacocinètics.



Analytical Methods

Liquid chromatography–mass spectrometry determination in plasma of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L.Marta Sánchez-González^a, Glòria Lozano-Mena^a, M. Emília Juan^{a,*}, Andrés García-Granados^b, Joana M. Planas^{a,*}^a Departament de Fisiologia and Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona (UB), Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain^b Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus Fuentenueva, 18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 February 2013

Received in revised form 28 June 2013

Accepted 3 July 2013

Available online 12 July 2013

Keywords:

Maslinic acid

LC-MS

Rat plasma

Olives

Pentacyclic triterpenes

ABSTRACT

Maslinic acid, a pentacyclic triterpene from *Olea europaea* L., exerts hypoglycemic, antioxidant, cardioprotective and antitumoral activities. Here, an LC-APCI-MS method to determine this compound in plasma is presented as a first step in pharmacokinetic studies. Maslinic acid was extracted from plasma with ethyl acetate and separated on a C18 column using a gradient elution of water and acetonitrile. The target ions were m/z 471.3 for maslinic acid and m/z 455.3 for I.S. The method was validated by the analysis of spiked plasma samples obtaining a linear correlation, a recovery of $99.0 \pm 0.9\%$ and a quantification limit of 5 nM. The precision and accuracy were $\leq 8.38\%$ and $\leq 4.82\%$, respectively. Finally, the method was verified by measuring the rat plasmatic concentrations 24 h after the single oral administration of 10, 25 and 50 mg/kg of maslinic acid, thereby ensuring that the procedure is appropriate for its use in bioavailability studies.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Maslinic acid ([$2\alpha,3\beta$]-2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, Fig. 1) is the main pentacyclic triterpene found in the leaves and fruits of *Olea europaea* L. (Romero et al., 2010; Sánchez-Avila, Priego-Capote, Ruiz-Jiménez, & de Castro, 2009) where it acts as insect antifeedant and antimicrobial agent (Pungitore, García, Gianello, Sosa, & Tonn, 2005). This compound is regularly consumed in the form of olives and olive oil. In these foods, its concentration ranges from 287.1 ± 66.6 to 1318.4 ± 401.0 mg/kg in commercial olives (Romero et al., 2010) and from 64.2 ± 8.1 to 193.9 ± 14.0 mg/kg in olive oils, depending on the variety and the method of processing (Pérez-Camino & Cert, 1999). Recently, maslinic acid is getting much attention as a bioactive compound since several biological effects have been attributed to this pentacyclic triterpene, such as antitumoral (Juan, Planas, Ruiz-Gutiérrez, Daniel, & Wenzel, 2008; Park et al., 2013), antidiabetic (Liu, Sun, Duan, Mu, & Zhang, 2007), cardioprotective (HussainShaik et al., 2012) and neuroprotective (Guan et al., 2011). Notwithstanding the beneficial activities described *in vitro*, little is known about its effects in both animals and humans. Recent assessment of the

safety in mice of maslinic acid has evidenced that it is well tolerated without harmful effects (Sánchez-González, Lozano-Mena, Juan, García-Granados, & Planas, 2013). Therefore, this compound is gaining acceptance as a potential nutraceutical.

The determination of maslinic acid has been previously performed in olives, olive oil and different plants using gas chromatography (GC) (Bianchi, Pozzi, & Vlahov, 1994; Caligiani et al., 2013; Guinda, Rada, Delgado, Gutiérrez-Adán, & Castellano, 2010; Kalogeropoulos et al., 2010; Pérez-Camino & Cert, 1999) and high-performance liquid chromatography (HPLC) (Guo et al., 2011; Li et al., 2011; Romero et al., 2010). However, its application to biological samples presents several drawbacks. In GC, the low volatility and high molecular weight of maslinic acid prevents its direct injection to the chromatograph and a derivatization step is mandatory prior to GC analysis. The use of HPLC hampers the detection of the compound because it has a saturated skeleton that shows no fluorescence and very low UV absorption. Moreover, these techniques have not enough sensibility for pharmacological studies. The latter problem also occurs with the recent HPLC-DAD and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS) methods published using rat and mice plasma, respectively (Lozano-Mena, Juan, García-Granados, & Planas, 2012; Yin, Lin, Mong, & Lin, 2012). In both cases, the reported limits of detection (20 nM and 210 nM, respectively) indicate that the methods are not sensitive enough to allow a reliable quantification of this triterpene after administration of low doses of

* Corresponding authors. Tel.: +34 934024505; fax: +34 934035901.

E-mail addresses: marta_sanchez@ub.edu (M. Sánchez-González), gloria.lozano@ub.edu (G. Lozano-Mena), mejua@ub.edu (M.E. Juan), agarcia@ugr.es (A. García-Granados), jmplanas@ub.edu (J.M. Planas).

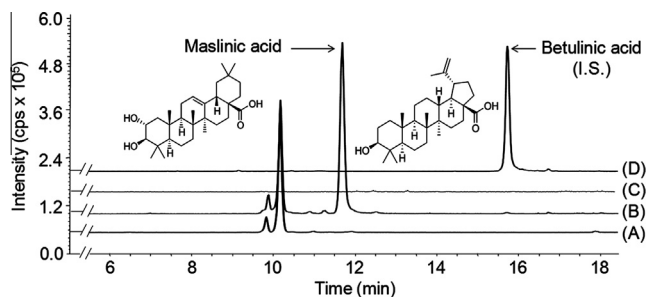


Fig. 1. LC-MS chromatograms obtained in the APCI negative mode using the selected ion monitoring (SIM) at m/z 471.3 (A, B) for maslinic acid and at m/z 455.3 (C, D) for betulinic acid (I.S.). Representative chromatograms of rat blank plasma (A, C) as well as rat blank plasma spiked with 0.5 μ M of maslinic acid (B) and 2.5 μ M of betulinic acid (I.S.) (D).

maslinic acid. Consequently, we have developed a liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC-APCI-MS) method to determine maslinic acid in plasma as a first step in *in vivo* pharmacokinetic studies and its evaluation on health impact. This technique is suitable to determine this compound, since it does not depend on the presence of a particular chromophore in the molecule and allows direct injection avoiding the time and reagent consuming step of derivatization. In addition, LC-APCI-MS is a widely used analytical tool that not only allows a highly specific detection of compounds from complex biological matrices such as plasma but also lets to distinguish between the parent molecule and its metabolites without the need for long chromatographic separations. The method was validated according to the US Food and Drug Administration (FDA) guidelines for *Bioanalytical Method Validation* (2011) and the European Medicines Agency (EMA), *Guideline on Bioanalytical Method Validation* (2011). To assess the performance of the method, maslinic acid was administered to Sprague-Dawley rats at 10, 25 and 50 mg/kg and plasma samples were collected at 24 h to verify its adequacy in pharmacokinetic studies.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Maslinic acid was obtained from olive pomace according to the patented method from García-Granados (2002). Betulinic acid (3 β -3-hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid, internal standard, I.S., Fig. 1) was purchased from Extrasynthèse (Genay, France). Sodium carboxymethylcellulose and (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile was from Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Spain). Ethyl acetate and methanol, employed during sample preparation, were supplied by J.T Baker (Deventer, Netherlands). All the solvents utilized were HPLC grade. Other chemicals were of analytical grade and obtained from Sigma-Aldrich. Water used in all experiments was passed through a Milli-Q water purification system (18 m Ω) (Millipore, Milan, Italy).

2.2. Animals

Male adult Sprague-Dawley rats (275–300 g) were housed in cages ($n = 2/\text{cage}$) under controlled conditions, which were 12 h light/12 h dark cycle, temperature of 22 ± 2 °C and relative humidity of $50 \pm 10\%$. They received a standard diet (2014 Teklad Global 14%, Harlan, Barcelona, Spain) and water *ad libitum*. Handling and killing of the rats were in full accordance with the European Community guidelines for the care and management of laboratory animals. The studies were approved by the Ethic Committee of Animal

Experimentation of the Universitat de Barcelona. Rats were fasted overnight and anesthetized by intraperitoneal injection of 90 mg/kg of ketamine (Imalgene 1000, Meril Laboratorios S.A., Barcelona, Spain) and 10 mg/kg of xylazine (Rompun 2%, Química Farmacéutica Bayer S.A., Barcelona, Spain). All animal manipulations were carried out in the morning to minimize the effects of circadian rhythms.

2.3. Stock solutions, working standards and calibration standards

Maslinic acid and I.S. stock solutions were prepared in methanol 80% to give a final concentration of 250 and 100 μ M, respectively. They were kept in amber bottles at 4 °C and were brought to room temperature before use. Working standards with concentrations of 0.1, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 and 200 μ M of maslinic acid were obtained by serial dilution with methanol 80% of the stock solution and were used for the preparation of the calibration standards. The stock solution of the I.S. was further diluted with methanol 80% to yield a working standard of 50 μ M.

The calibration standards were prepared using different pools of plasma obtained from fasted rats that had never received maslinic acid (blank plasma). Aliquots of the pooled plasma were stored at -20 °C until analysis. 190 μ L of blank plasma were spiked with 10 μ L of working standard solutions in order to obtain the calibration standards at the concentrations of 0.005, 0.05, 0.1, 0.25, 1, 2.5, 5 and 10 μ M. The spiked samples were stirred in the vortex for 1 min before being extracted. Working standards and calibration standards were freshly prepared before use.

2.4. Sample preparation

Blood was collected in EDTA-K₂ tubes and plasma was separated by centrifugation at 1500 \times g for 15 min at 4 °C. A 200 μ L aliquot of rat plasma or calibration standard was added with 10 μ L of I.S. working solution (50 μ M) and 2 mL of ethyl acetate in glass tubes. The mixture was vigorously vortex-mixed for 3 min and centrifuged at 1500 \times g for 15 min at 4 °C (Centrifuge Megafuge 1.0R, Heraeus, Boadilla, Spain). The supernatant was transferred to another tube and a second extraction of the pellet was performed. Both supernatants were combined and evaporated to dryness in a Concentrator 5301 (Eppendorf Ibérica S.L., San Sebastián de los Reyes, Spain) at 45 °C. The residue was reconstituted in 100 μ L of methanol-water (80:20, v/v) and was vortex-mixed for 5 min. Samples were introduced in an ultrasonic bath for 1 min and centrifuged at 25,000 \times g for 15 min at 4 °C (Centrifuge 5417R, Eppendorf Ibérica S.L.). Then, the supernatant was transferred to an amber vial for LC-MS analysis.

2.5. Liquid chromatography-mass spectrometry system

2.5.1. Equipment

LC analyses were performed using a Perkin-Elmer series 200 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) equipped with a quaternary pump and a refrigerated auto sampler plate. A PE Sciex API 150 EX single quadrupole mass spectrometer (AB SCIEX Spain S.L., Alcobendas, Spain) equipped with an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) heated nebulizer ion source was used for compound detection. Chromatographic data acquisition and peak integration was performed using 1.4.2 Analyst software supplied by Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). The LC-MS equipment was available at the Scientific and Technological Centers of the Universitat de Barcelona.

2.5.2. Chromatography

Chromatographic separation of maslinic acid and the I.S. was performed on a reversed-phase Luna C18 column

(150 mm × 2.0 mm, 5 μm) that was kept at 40 °C and preceded by a security guard cartridge of the same material, both purchased from Phenomenex (Torrance, CA, USA). The autosampler was maintained at 10 °C and the injection volume was held constant at 20 μL. The mobile phase consisting of water (A) and 100% acetonitrile (B) was delivered at a flow rate of 0.8 mL/min. The applied gradient elution was as follows: 0 min, 95% A and 5% B; 4 min, 50% A and 50% B; 8 min, 40% A and 60% B; 12 min, 25% A and 75% B; 15 min, 0% A and 100% B; 19 min, 0% A and 100% B. Finally, the gradient was set back to initial conditions and the system was equilibrated during 8 min before the next injection.

2.5.3. Mass spectrometry

The system was operated in negative ionization mode using an APCI source maintained at 500 °C. Nitrogen served as curtain gas (12 au) and as nebulizer gas (10 au) with a nebulizing flow set at –3 au. Optimization of the compound-dependent MS parameters was performed by infusing standard solutions of maslinic acid at 50 μM into the mass spectrometer at a constant flow rate of 5 μL/min using a Model 11 syringe pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). The optimal values were those that gave maximum signal-to-noise ratios, and were as follows: declustering potential of –30 V, focusing potential of –100 V and entrance potential of –5 V. Quantitation was performed using the selected ion monitoring (SIM) mode to monitor the [M–H][–] ions for maslinic acid (*m/z* 471.3) and betulinic acid (*m/z* 455.3) as I.S. with a dwell time of 165 ms. Maslinic acid concentrations in plasma samples were calculated from the ratio of the peak area of the analyte and I.S. interpolated on an external calibration curve. Within each analytical run, a full set of calibration standards including a blank plasma sample and a reagent blank were analyzed.

2.6. Method validation

The developed method was validated according to the FDA guidelines for *bioanalytical method validation* (2011) and the generally accepted recommendations described by *Matuszewski, Constanzer, and Chavez-Eng* (2003). The EMEA Guideline on *Bioanalytical Method Validation* was also considered (2011).

2.6.1. Matrix effect, recovery and process efficiency

Quantitative evaluation of these parameters was assessed according to *Matuszewski et al.* (2003) at eight different concentrations of maslinic acid corresponding to 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 and 10 μM and using different batches of blank plasma. Matrix effect was assessed by comparing the peak areas of maslinic acid and I.S. spiked in extracted blank plasma samples at the concentration expected at the final volume of 100 μL to those generated at the same concentration of maslinic acid spiked in methanol 80% and expressed as a percentage. Recoveries of the analyte and I.S. were determined as the percentage of the peak areas of blank plasma samples spiked with the working standards of maslinic acid and I.S. prior to extraction compared to the peak areas obtained for blank plasma samples that were spiked after extraction with standards at the corresponding concentrations. The process efficiency (%) was calculated as the ratio of the peak areas obtained in blank plasma samples spiked with the working standards prior to liquid-liquid extraction with those generated at the expected concentrations of maslinic acid and I.S. in methanol 80%.

2.6.2. Calibration curve

The linearity of the method was assessed by processing calibration standards of maslinic acid at the concentrations of 0.005, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 and 10 μM. Calibration curves were constructed by plotting the peak area ratio of maslinic acid to the I.S. (*y*) against the analyte concentration (*x*). A linear regression

analysis by the least square method was used to determine slopes, intercepts and coefficient of correlation. A new calibration curve was generated to assay samples within each analytical run and was used to calculate the concentration of maslinic acid in the unknown samples in that run.

2.6.3. Sensitivity

The limit of detection (LOD) was defined as the concentration of maslinic acid that produced a signal three times above the noise level of a blank plasma sample. The lowest point of the calibration curve was considered as the lowest limit of quantification (LLOQ) of the method and was required to fulfill the criteria of a signal-to-noise ratio of 10:1 in the SIM chromatogram, precision (%RSD) no greater than 20% and accuracy within the ±20% limit. In addition, the analyte peak of the LLOQ in plasma samples should be identifiable, discrete, with acceptable chromatographic retention time and peak shape. The LLOQ was established and validated by performing the analysis of six blank plasma samples spiked with the theoretical concentration.

2.6.4. Precision and accuracy

The intra-day and inter-day precisions were assessed by determining a sufficient number of plasma samples (*n* = 3–6) at eight different concentrations, ranging from 0.05 to 10 μM, that were prepared within a day and on two different days, respectively. Accuracy was estimated based on the mean percentage of error of the measured concentration (*Con_M*) to the theoretical concentration (*Con_T*) according to the equation:

$$\text{Bias (\%)} = [(Con_T - Con_M) / Con_T] \times 100$$

Precision and accuracy should be within the ±15% limit.

2.6.5. Selectivity

The selectivity of the method towards endogenous plasma matrix components was assessed in six independent double blank plasma samples (no analyte, no I.S.) including hemolyzed plasmas that were compared with those spiked with maslinic acid and I.S.

2.6.6. Carry-over

The carry-over of one sample to another on the LC-MS instrument was evaluated 6 times in each analytical run by sequentially injecting the highest calibration standard followed by methanol 80% at intervals based on the total number of samples per batch. Furthermore, as a measure of precaution the analyses of 2 blank plasma samples were programmed prior to the first analysis of samples.

2.7. Method application

Maslinic acid was administered orally by gavage to overnight fasted rats. Given that this pentacyclic triterpene is sparingly soluble in water it was solubilized into (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin at 40% and sodium carboxymethylcellulose at 0.5%, as indicated in the patented procedure described for betulinic acid (*Jaggi, Rajendran, Ramadoss, & Siddiqui, 2002*). Maslinic acid was administered at three different doses of 10, 25 and 50 mg/kg. Blood was collected 24 h after the oral administration from the saphenous vein and was placed into Microvette CB300 tubes (Sarstedt, Granollers, Spain) with EDTA-K₂ as anticoagulant. Plasma was immediately obtained by centrifugation at 1500×*g* for 15 min at 4 °C and was stored at –20 °C until analysis.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of liquid chromatography-mass spectrometry conditions

The performances of APCI and electrospray ionization (ESI) were evaluated in negative mode in order to select the source that provided the most sensitive method for quantification. The composition of the mobile phase not only influences the chromatographic peak shapes and resolution but also the MS performance. Therefore, in the optimization of the mobile phase, the modifiers were selected taking into account the characteristics of the MS ion source that was being evaluated. Acetonitrile was selected as organic solvent instead of methanol since the latter could not prevent a carryover effect. ESI was tested because it has been used in the determination of maslinic acid in olive leaves (Sánchez-Avila et al., 2009) as well as other pentacyclic triterpenes in plasma samples such as oleanolic acid (Jeong et al., 2007; Song et al., 2006) and ursolic acid (Chen, Luo, Zhang, & Chen, 2011; Xia, Wei, Si, & Liu, 2011). Ammonium acetate (5 mM) at pH 8.3 was used as modifier of the aqueous phase of the LC system in order to enhance the ionization efficiency of the ESI source. APCI has been reported to be adequate for the analysis of apolar compounds and has been suggested to be more appropriate than ESI source for a sensitive ionization of pentacyclic triterpenes (Rhourri-Frih et al., 2009). Moreover, APCI has been employed for the analysis of boswellic acids in brain and plasma (Reising et al., 2005) and ursolic acid in plasma (Liao et al., 2005). Different modifiers of the mobile phase were assayed with APCI. The aqueous phase was either adjusted with the addition of acetic acid (0.05, 0.025 and 0.01%), formic acid (0.05 and 0.01%), ammonium acetate (5 mM) or without modifier. The results showed that solvent variation with acetic acid or ammonium acetate induced the formation of adduct ions and decreased MS sensitivity. The addition of formic acid significantly delayed the retention time of maslinic acid and gave the lowest signal intensities. Taken together the results obtained with both ionization sources and different solvents, the best sensitivity along with an improved peak shape and fewer chromatographic interferences were achieved using APCI with the mobile phase consisting of a gradient elution of water and acetonitrile.

The influence of temperature (300 °C and 500 °C) on the ion intensity was analyzed in an attempt to increase the sensitivity of the APCI source. Temperature of 300 °C gave an incomplete vaporization of maslinic acid that was reflected in low signal intensity. The ionization rate increased with the temperature and the best signal intensity was achieved when it was raised to 500 °C. A temperature of 450 °C was also used for APCI analysis of oleanolic, betulinic and ursolic acids in fruits (Rhourri-Frih et al., 2009).

Analyses of maslinic acid with different acquisition modes (SIM and multiple reaction monitoring or MRM) were assayed using a triple quadrupole. Maslinic acid could not be collided into fragments and no dominant product ions were detected, which indicated that routine MRM with different parent and product ion was not suitable for maslinic acid quantitation. This lack of fragmentation of maslinic acid has also been described for oleanolic acid, whose chemical structure differs from maslinic acid by the lack of the hydroxyl group at the 2-carbon position (Song et al., 2006; Jeong et al., 2007) and ursolic acid (Chen et al., 2011; Liao et al., 2005; Xia et al., 2011). After comparing the signal-to-noise ratio of maslinic acid obtained either by MRM or SIM acquisition modes, the best LLOQ was achieved in SIM mode. Therefore, analyses of the pentacyclic triterpene were performed instead, in a single quadrupole with SIM acquisition mode which provided the best sensitivity.

The chromatographic conditions were optimized in order to obtain a better separation and sharper peaks. Different flow rates (0.6, 0.7, 0.8, 0.9 and 1 mL/min) were evaluated and 0.8 mL/min was chosen because it provided the best signal intensity within the working flow rate range of the APCI system (0.5–2 mL/min). The analysis of blank plasma samples from different batches in SIM mode at m/z 471.3 revealed the co-elution of an endogenous compound at the same retention time that maslinic acid. Given that the gradient markedly influences the running of chromatographic separation of compounds, different elution profiles were assayed until both molecules were properly separated. Using the gradient system described in the experimental section, the endogenous compound eluted at 9.8 min and maslinic acid at 11.7 min whereas betulinic acid, used as I.S., had a retention time of 15.5 min (Fig. 1). Once a satisfactory separation was achieved, the final run time was set at 19 min which included a washing step of 4 min at 100% acetonitrile that was established in order to prevent the memory effect occasionally observed in the initial set-up of the method. The rinsing was followed by a reconditioning step with the initial solvent composition.

3.2. Selection of I.S.

The use of I.S. is necessary to minimize any differences in recovery due to sample pre-treatment or to obtain high accuracy when an HPLC is equipped with a mass spectrometer as detector. Glyzyrrhetic acid and betulinic acid, both pentacyclic triterpenes were assayed as I.S. given their similar chemical and physical properties as the studied analyte. Glyzyrrhetic acid with m/z of 469.7 was rejected because it presented an isotopic contribution at m/z of 471.3 that overlapped maslinic acid, thus interfering peak integration. Betulinic acid, which had been previously used as I.S. in analytical assays to quantify maslinic acid in vegetable oils (Pérez-Camino & Cert, 1999) and olive leaves (Sánchez-Avila et al., 2009) was selected.

Table 1

Recovery, matrix effect and process efficiency data for maslinic acid and internal standard in spiked rat blank plasma samples.

	Matrix effect (%) ^a	Recovery (%) ^b	Process efficiency (%) ^c
Maslinic acid (μM)			
0.05	134 ± 2 (n = 3)	92.7 ± 2.9 (n = 3)	131 ± 10 (n = 3)
0.1	124 ± 2 (n = 3)	98.5 ± 5.1 (n = 3)	122 ± 4 (n = 3)
0.25	115 ± 5 (n = 6)	95.1 ± 4.8 (n = 5)	110 ± 4 (n = 6)
0.5	106 ± 2 (n = 6)	96.9 ± 3.5 (n = 6)	102 ± 3 (n = 6)
1	133 ± 4 (n = 6)	92.4 ± 1.4 (n = 6)	123 ± 2 (n = 6)
2.5	126 ± 13 (n = 3)	99.6 ± 3.1 (n = 3)	126 ± 4 (n = 3)
5	122 ± 5 (n = 6)	94.4 ± 3.7 (n = 4)	116 ± 7 (n = 6)
10	131 ± 3 (n = 6)	95.0 ± 3.9 (n = 5)	117 ± 6 (n = 6)
Internal standard (μM)			
1	86.8 ± 1.7 (n = 35)	95.2 ± 1.5 (n = 35)	78.9 ± 2.8 (n = 35)

^a Absolute matrix effect expressed as the ratio of the peak area of an analyte spiked post-liquid-liquid extraction to the peak area of the same analyte standards multiplied by 100.

^b Recovery calculated as the ratio of the peak area of analyte spiked before liquid-liquid extraction to the peak area of analyte spiked after liquid-liquid extraction multiplied by 100.

^c Process efficiency expressed as the ratio of the peak area of the analyte spiked before liquid-liquid extraction to the area of the same analyte standards multiplied by 100.

3.3. Method validation

Once the liquid chromatography and mass spectrometry were optimized, based on the experimental conditions that provided higher recovery and sensitivity, the method was validated at eight different concentrations, from 0.05 to 10 μM , in order to cover the whole range that might be encountered in its future use in pharmacokinetic studies.

3.3.1. Matrix effect, recovery and process efficiency

Matrix effect (Table 1) was assessed following the post-extraction spike method proposed by Matuszewski et al. (2003). The average matrix effect obtained was $23.6 \pm 3.6\%$ for maslinic acid and $-13.2 \pm 1.7\%$ for the I.S. In the development of a reliable analytical method, the variability observed in the matrix effect is more important than the values themselves. Therefore, the variability, expressed as RSD, was found to be 8.29% for maslinic acid and 11.1% for the I.S. These values were under the maximum 15% recommended by the EMEA Guideline on Bioanalytical Method Validation (2011), thus indicating that the effect was consistent and did not compromise the quantification of the analyte. Hence, the results demonstrate that the proposed extraction procedure is able, if not to eliminate, at least to normalize and standardize the matrix effect.

Recovery could be influenced by matrix effect, and thereby an incorrect estimation of the efficiency of the whole analytical procedure could be performed. Using the strategy suggested by Matuszewski et al. (2003) we have calculated the “true recovery” which is unaffected by the matrix as it is calculated by comparing the area of samples spiked before extraction to those that were spiked after extraction. The recovery for maslinic acid, without normalization by I.S., remained very consistent at low and high concentrations (Table 1) with a mean value of $95.0 \pm 1.2\%$ ($n = 31$) and RSD of 7.10%. In addition, the mean recovery for I.S. followed a similar pattern being $95.2 \pm 1.5\%$ ($n = 35$) with an RSD of 8.60%. These results indicate that the extraction procedure was appropriate for both the analyte and I.S. Therefore, when the analytical recovery was calculated with normalization by the I.S., that is, considering the peak area ratio of maslinic acid to I.S., the mean recovery increased to $99.0 \pm 0.9\%$ ($n = 49$) with an RSD of 6.10%.

Finally, the process efficiency, which takes into account the extraction recovery and the matrix effect, averaged 118% with an RSD of 10.6% for maslinic acid and 78.9% with an RSD of 11.0% for I.S. Overall these results suggest that matrix components do influence the process efficiency. However, the fact that the variability for both analyte and I.S. does not exceed the 15% indicates that the proposed method is fairly robust.

3.3.2. Linearity

The reproducibility of the assay was evaluated by comparing the linear regressions of the three standard plots prepared at three different days. The analytical procedure was linear over the concentration range of 0.005–10 μM in plasma samples (Fig. 2). A straight-line fit was made through the data points by least square regression analysis to give the mean linear equation $y = 6.32x + 0.30$. The correlation coefficient of the calibration curves exceeded 0.99.

3.3.3. Sensitivity

The LOD of maslinic acid was 2 nM. This concentration is 100 times lower than the one reported by Yin et al. (2012) in mice plasma that was 0.21 μM (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The concentration with a signal-to-noise ratio of 10 was 5.03 ± 0.13 nM and was quantified with a precision of 6.22% and an accuracy of 0.50%, thus qualifying as LLOQ of the assay. Our LC-MS method yields higher sensitivity than the LC-MS-MS with MRM method for the quantification of maslinic

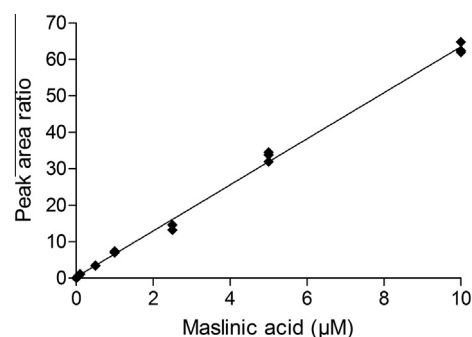


Fig. 2. Representative calibration curve of maslinic acid in rat plasma. Individual values were represented. Regression line was calculated by the least squares method, and the equation and correlation coefficient (r) was $y = 6.32x + 0.30$; $r = 0.9986$.

acid in olive leaves that reports a LOQ of 184 nM (Sánchez-Avila et al., 2009). In addition, the LLOQ is lower than the ones obtained for similar pentacyclic triterpenic acids in plasma samples that were 11 nM (5 ng/mL) for boswellic acids (Reising et al., 2005) and 22 nM (10 ng/mL) for ursolic acid (Xia et al., 2011).

3.3.4. Precision and accuracy

The performance data of the assay is summarized in Table 2. The intra- and inter-day precision (RSD) of maslinic acid were less than 5.45% and 8.38%, respectively. The accuracy of the method was also acceptable at each concentration level. The deviation obtained between the nominal concentrations and calculated concentrations for maslinic acid were comprised between 0.10% and 4.82%. These results were within the acceptable criteria according to the FDA (2011) and EMEA (2011) validation guidelines and indicated that the method was accurate, reliable and reproducible.

3.3.5. Selectivity

In order to verify the selectivity, blank plasma samples from six different animals were analyzed and compared with plasma that was spiked with the analyte and I.S. (Fig. 1). The method was selective toward the matrix, as no interference compound was observed at the retention time of maslinic acid (11.7 min) and I.S. (15.5 min).

3.3.6. Carry-over

No enhancement in the response was observed neither in the blank plasma nor in the reagent blank processed after the highest

Table 2

Intra-day and inter-day precision and accuracy of maslinic acid in spiked rat blank plasma.

Maslinic acid (μM)	Precision (% RSD)		Accuracy (% bias)
	Intra-day	Inter-day	
0.05	3.63 (n = 3)	8.38 (n = 6)	2.58 (n = 5)
0.1	4.88 (n = 3)	4.51 (n = 6)	1.17 (n = 4)
0.25	2.34 (n = 3)	2.49 (n = 6)	1.59 (n = 6)
0.5	3.74 (n = 3)	3.73 (n = 6)	0.63 (n = 9)
1	1.44 (n = 3)	3.77 (n = 6)	0.10 (n = 8)
2.5	3.87 (n = 3)	3.48 (n = 6)	0.21 (n = 6)
5	5.45 (n = 3)	5.61 (n = 6)	4.82 (n = 6)
10	5.19 (n = 3)	5.30 (n = 6)	0.70 (n = 6)

calibration standard at the retention time of maslinic acid and I.S. respectively. These results indicate that the needle wash procedure after the injection of the sample that consisted of 9 washings at the end of the run with acetonitrile:water (90:10) was sufficient to remove potential residues of maslinic acid. In addition, the carry-over effect could also be avoided by programming a 4 min flush of 100% of acetonitrile at the end of the elution program. Therefore, the absence of carry-over or memory effect ensures the accuracy at low concentrations.

3.4. Verification of the method

To demonstrate the applicability of the developed LC-MS method for future pharmacokinetic studies, rats were orally administered with 10, 25 and 50 mg/kg of maslinic acid and blood was collected at 24 h post-administration. This time was chosen because the concentration in plasma of this analyte would be very low, thus ensuring that the procedure was appropriate. The validated procedure allowed a highly sensitive and selective determination of the pentacyclic triterpene in plasma, as shown in Fig. 3. Maslinic acid was accurately measured and the plasmatic concentrations increased accordingly with the dose administered (Fig. 4). The results obtained were above the lower limit of quantification even at 10 mg/kg that gave a value of 10.8 ± 2.2 nM.

These data indicate that we have developed a reliable and reproducible procedure that can be easily applied to accurately measure trace concentrations of maslinic acid in small plasma volumes. In addition, the high sensitivity of the method confirms its

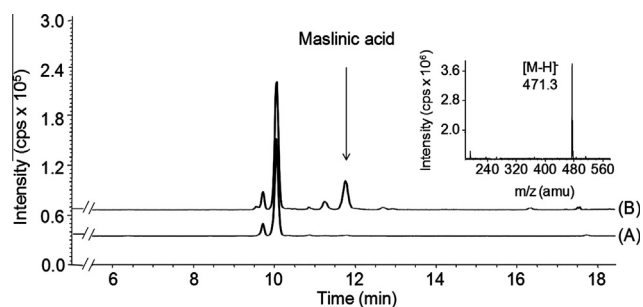


Fig. 3. LC-MS chromatograms of maslinic acid obtained in the APCI negative mode using the selected ion monitoring (SIM) at m/z 471.3. Representative chromatograms of rat blank plasma (A) and plasma collected 24 h after oral administration of 50 mg/kg of maslinic acid (B). The insert depicts the mass spectrum of maslinic acid.

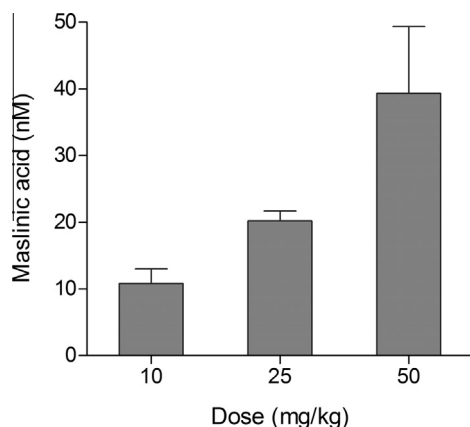


Fig. 4. Concentrations of maslinic acid in plasma samples collected 24 h after the oral administration of 10, 25 and 50 mg/kg of the triterpene. Values are represented as means + S.E.M ($n = 3$).

suitability to perform the pharmacokinetic analysis of the pentacyclic triterpene. The existing procedures described for the analysis of maslinic acid in plasma would have failed to address this issue (Lozano-Mena et al., 2012; Yin et al., 2012). The HPLC method that we have recently developed, although rendering satisfactory separation, identification and quantification of maslinic acid, would not have allowed to detect this compound at 24 h, since the limits of detection and quantification were 20 nM and 320 nM, respectively (Lozano-Mena et al., 2012). The same lack of sensitivity would also have taken place with the LC-MS method used by Yin et al. (2012), since the reported limit of detection was 210 nM (0.1 $\mu\text{g/mL}$).

4. Conclusions

In summary, we have developed a selective, sensitive and accurate LC-MS procedure for a reliable determination of maslinic acid in plasma. The liquid-liquid extraction enables the removal of endogenous interfering substances from the matrix, while the LC-MS method permits the quantification of maslinic acid over the wide concentration range encountered when performing pharmacokinetic studies. The results obtained in the validation assessment indicate that the procedure is suitable for the analysis of plasma samples given its adequate linearity, recovery, precision, sensitivity and selectivity. Moreover, the bioanalytical method offers significant advantages in terms of low sample requirement for analysis, simplicity of extraction and overall analysis time. Finally, the developed LC-MS method has been verified by measuring the rat plasmatic concentration 24 h after the single oral administration of 10, 25 and 50 mg/kg of maslinic acid, ensuring that it could be successfully applied to pharmacokinetic studies. The application of the method would allow to elucidate which circulating levels of this compound have to be reached in plasma to reproduce the *in vitro* health protecting effects described for maslinic acid.

Conflict of interest statement

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgements

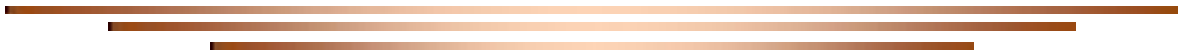
This work was supported by grants AGL2009-12866 from the Ministerio de Ciencia e Innovación and 2009SGR471 from the Generalitat de Catalunya, Spain. MS-G was a recipient of a fellowship from project 2009SGR471 and GL-M of Ajuts de Personal Investigador en Formació (APIF) de la Universitat de Barcelona. The authors thank Drs. Isidre Casals and Olga Jáuregui from Scientific and Technological Centers of the Universitat de Barcelona for technical assistance and advice.

References

- Bianchi, G., Pozzi, N., & Vlahov, G. (1994). Pentacyclic triterpene acids in olives. *Phytochemistry*, 37(1), 205–207.
- Caligiani, A., Malavasi, G., Palla, G., Marseglia, A., Tognolini, M., & Bruni, R. (2013). A simple GC-MS method for the screening of betulinic, corosolic, maslinic, oleanolic and ursolic acid contents in commercial botanicals used as food supplement ingredients. *Food Chemistry*, 136(2), 735–741.
- Chen, Q., Luo, S., Zhang, Y., & Chen, Z. (2011). Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of ursolic acid in rat plasma and tissue: Application to the pharmacokinetic and tissue distribution study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(8), 2877–2884.
- European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). (2011). Guideline on Bioanalytical Method Validation, London.
- García-Granados, A. (2002) Process for the industrial recovery of oleanolic and maslinic acids contained in the olive milling by products. Patent No. 6,037,492.
- Guan, T., Qian, Y., Tang, X., Huang, M., Huang, L., Li, Y., et al. (2011). Maslinic acid, a natural inhibitor of glycogen phosphorylase, reduces cerebral ischemic injury in

- hyperglycemic rats by GLT-1 up-regulation. *Journal of Neuroscience Research*, 89(11), 1829–1839.
- Guinda, A., Rada, M., Delgado, T., Gutiérrez-Adán, P., & Castellano, J. M. (2010). Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9685–9691.
- Guo, S., Duan, J. A., Tang, Y., Qian, Y., Zhao, J., Qian, D., Su, S., & Shang, E. (2011). Simultaneous qualitative and quantitative analysis of triterpenic acids, saponins and flavonoids in the leaves of two *Ziziphus* species by HPLC–PDA–MS/ELSD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(2), 264–270.
- Hussain Shaik, A., Rasool, S. N., Abdul Kareem, M., Krushna, G. S., Akhtar, P. M., & Devi, K. L. (2012). Maslinic acid protects against isoproterenol-induced cardiotoxicity in albino Wistar rats. *Journal of Medicinal Food*, 15(8), 741–746.
- Jaggi, M., Rajendran, P., Ramadoss, S., & Siddiqui, M. J. A. (2002). Betulinic acid derivatives having antiangiogenic activity, processes for producing such derivatives and their use for treating tumor associated angiogenesis. Patent No. 6,403,816 B1.
- Jeong, D. W., Kim, Y. H., Kim, H. H., Ji, H., Yoo, S. D., Choi, W. R., Lee, S. M., Han, C. K., & Lee, H. S. (2007). Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 28(2), 51–57.
- Juan, M. E., Planas, J. M., Ruiz-Gutiérrez, V., Daniel, H., & Wenzel, U. (2008). Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of maslinic and oleanolic acids, two pentacyclic triterpenes from olives, on HT-29 colon cancer cells. *British Journal of Nutrition*, 100(1), 36–43.
- Kalogeropoulou, N., Chiou, A., Ioannou, M., Karathanos, V. T., Hassapidou, M., & Andrikopoulos, N. K. (2010). Nutritional evaluation and bioactive microconstituents (phytosterols, tocopherols, polyphenols, triterpenic acids) in cooked dry legumes usually consumed in the Mediterranean countries. *Food Chemistry*, 121(3), 682–690.
- Li, G. L., You, J. M., Song, C. H., Xia, L., Zheng, J., & Suo, Y. R. (2011). Development of a new HPLC method with precolumn fluorescent derivatization for rapid, selective and sensitive detection of triterpenic acids in fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2972–2979.
- Liao, Q., Yang, W., Jia, Y., Chen, X., Gao, Q., & Bi, K. (2005). LC-MS determination and pharmacokinetic studies of ursolic acid in rat plasma after administration of the traditional chinese medicinal preparation Lu-Ying extract. *Yakugaku Zasshi*, 125(6), 509–515.
- Liu, J., Sun, H., Duan, W., Mu, D., & Zhang, L. (2007). Maslinic acid reduces blood glucose in KK-A^y mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(11), 2075–2078.
- Lozano-Mena, G., Juan, M. E., García-Granados, A., & Planas, J. M. (2012). Determination of maslinic acid, a pentacyclic triterpene from olives, in rat plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(41), 10220–10225.
- Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., & Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(13), 3019–3030.
- Park, S. Y., Nho, C. W., Kwon, D. Y., Kang, Y. H., Lee, K. W., & Park, J. H. (2013). Maslinic acid inhibits the metastatic capacity of DU145 human prostate cancer cells: Possible mediation via hypoxia-inducible factor-1 α signaling. *British Journal of Nutrition*, 109(2), 210–222.
- Pérez-Camino, M. C., & Cert, A. (1999). Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1558–1562.
- Pungitore, C. R., García, M., Gianello, J. C., Sosa, M. E., & Tonn, C. E. (2005). Insecticidal and antifeedant effects of *Junelliaaspera* (Verbenaceae) triterpenes and derivatives on *Sitophilusoryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 41(4), 433–443.
- Reising, K., Meins, B., Bastian, B., Eckert, G., Mueller, W. E., Schubert-Zsilavec, M., et al. (2005). Determination of boswellic acids in brain and plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 77(20), 6640–6645.
- Rhourri-Frih, B., Chaimbault, P., Claude, B., Lamy, C., André, P., & Lafosse, M. (2009). Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS: A comparative study between APCI and APPI. *Journal of Mass Spectrometry*, 44(1), 71–80.
- Romero, C., García, A., Medina, E., Ruiz-Méndez, M. V., de Castro, A., & Brenes, M. (2010). Triterpenic acids in table olives. *Food Chemistry*, 118(3), 670–674.
- Sánchez-Avila, N., Priego-Capote, F., Ruiz-Jiménez, J., & de Castro, M. D. (2010). Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction. *Talanta*, 78(1), 40–48.
- Sánchez-González, M., Lozano-Mena, G., Juan, M. E., García-Granados, A., & Planas, J. M. (2013). Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L.. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(2), 339–346.
- Song, M., Hang, T. J., Wang, Y., Jiang, L., Wu, X. L., Zhang, Z., et al. (2006). Determination of oleanolic acid in human plasma and study of its pharmacokinetics in Chinese healthy male volunteers by HPLC tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40(1), 190–196.
- US Department of Health and Human Services, Food, and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). (2011). Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, Rockville, MD.
- Xia, Y., Wei, G., Si, D., & Liu, C. (2011). Quantitation of ursolic acid in human plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 879(2), 219–224.
- Yin, M. C., Lin, M. C. M., Mong, M. C., & Lin, C. Y. (2012). Bioavailability, distribution, and antioxidative effects of selected triterpenes in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(31), 7697–70701.

Resultats: Capítol 2



3.2. CAPÍTOL 2. ESTUDI TOXICOLÒGIC DE L'ÀCID MASLÍNIC

Els resultats d'aquest capítol es troben recollits a l'article 2:

Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from Olea europaea L.

Marta Sánchez-González, Glòria Lozano-Mena, M. Emília Juan, Andrés García-Granados, Joana M. Planas.

Mol Nutr Food Res. 2013, 57(2), 339-346

Els resultats obtinguts han donat lloc a la següent comunicació en congrés:

- ❖ *Evaluation of the subchronic oral toxicity of a high dose of maslinic acid in mice*

Marta Sánchez-González, Glòria Lozano-Mena, Irene Alfaras, Andrés García-Granados, M. Emília Juan, Joana M. Planas.

Presentada com a pòster en el congrés:

22nd IUBMB & 37th FEBS Congress

Sevilla, Espanya, 4 – 9 de setembre de 2012

Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L.

Avaluació de la seguretat de l'àcid maslínic, un component bioactiu de l'*Olea europaea* L.

M. Sánchez-González, G. Lozano-Mena, M.E. Juan, A. García-Granados, J.M. Planas

Mol. Nutr. Food Res. 2013, 57(2), 339-346

3.2.1. Resum de l'article 2

Objectius. L'àcid maslínic és un triterpè pentacíclic detectat a *Olea europaea* L. i present a la dieta en les olives i a l'oli que se'n deriva. Recentment, també ha estat descrit en altres aliments com espinacs, albergínies, cigrons, llenties i magrana. Malgrat els efectes biològics que se li han atribuït, com ara antitumoral, hipoglucemiant i neuroprotector, entre d'altres, no s'han avaluat els seus possibles efectes adversos. En conseqüència, s'ha investigat si l'administració de dosis elevades d'àcid maslínic tenen efectes nocius mitjançant l'estudi de la toxicitat aguda i subaguda seguint les normes OCDE (2008).

Material i mètodes. La toxicitat aguda es va avaluar mitjançant l'administració d'una dosi única d'1 g/kg d'àcid maslínic per via oral mitjançant sonda intragàstrica a ratolins mascle Swiss CD-1. Durant un període d'observació de dues setmanes, es va controlar l'estat de l'animal així com el pes corporal i el consum de pinso i aigua. Al final del període de seguiment, els animals es van sacrificar i es va realitzar un examen macroscòpic dels òrgans vitals. A l'anàlisi de la toxicitat subaguda, els ratolins van rebre diàriament i per via oral àcid maslínic a una dosi de 50 mg/kg durant 28 dies. Al mateix temps, es va administrar l'excipient a un grup de ratolins control. Diàriament es va mesurar el pes corporal i cada dos dies es va registrar el consum d'aigua i pinso. Al final del període d'administració, i després d'un dejuni previ, els animals van ser anestesiats amb ketanima i xilacina i es va obtenir, per punció cardíaca, mostres de sang per avaluar magnituds hematològiques i bioquímiques. Seguidament, es van extreure els òrgans vitals, que van ser pesats abans de realitzar un estudi histopatològic.

Resultats. No es van registrar signes de morbiditat ni de mortalitat a l'estudi de la toxicitat aguda. La necròpsia realitzada al final de l'experiment no va revelar cap alteració en els òrgans vitals derivada del tractament amb el triterpè. L'avaluació de la toxicitat subaguda no va mostrar cap signe nociu al llarg del tractament. Tampoc es van observar diferències entre el pes corporal dels animals tractats i de control. Les magnituds hematològiques i bioquímiques analitzades no van presentar diferències entre el grup control i el grup

d'àcid maslínic. La necròpsia va evidenciar que no hi havia diferències entre la mida, el color i la textura dels diferents òrgans vitals extrets dels dos grups estudiats. Per últim, en l'estudi histopatològic no es van observar anomalies ni lesions atribuïbles a l'àcid maslínic.

Conclusions. Els resultats obtinguts tant a l'estudi de la toxicitat aguda com subaguda indiquen que l'àcid maslínic no exerceix cap efecte nociu sobre les variables estudiades en ratolins. Aquesta absència d'efectes adversos, juntament amb les activitats beneficioses sobre la salut, fan de l'àcid maslínic un prometedor nutricional.

RESEARCH ARTICLE

Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L.

Marta Sánchez-González^{1*}, Glòria Lozano-Mena^{1*}, M. Emília Juan¹, Andrés García-Granados² and Joana M. Planas¹

¹Departament de Fisiologia and Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain

²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada, Spain

Scope: Maslinic acid, the main pentacyclic triterpene of the cuticle of *Olea europaea* L. fruit, has multiple beneficial effects on health, most notably antitumor and hypoglycemic properties. Notwithstanding the biological activities, there is a lack of knowledge about its safety. Therefore, the purpose of this study was to evaluate whether high doses of maslinic acid have harmful effects on Swiss CD-1 male mice.

Methods and results: The single oral administration of the pentacyclic triterpene at 1000 mg/kg to mice did not produce any signs of morbidity or mortality. The repeated daily oral administration of 50 mg/kg of maslinic acid for 28 days did not induce any sign of toxicity during the experimental period. Body weight did not differ between mice that received the triterpene and the control group. Similarly, hematological and biochemical variables were not affected by the treatment. Histopathologic examination of the organs revealed that there were no differences between the control and the treated mice.

Conclusion: Taken together the results obtained from the acute and the repeated intake of maslinic acid indicate that the compound does not exert any adverse effects on the variables tested in mice, thus suggesting a sufficient margin of safety for its putative use as a nutraceutical.

Keywords:

Maslinic acid / Mice / Olives / Pentacyclic triterpene

Received: July 24, 2012
Revised: September 3, 2012
Accepted: September 27, 2012

1 Introduction

Maslinic acid, also named crategolic acid or (2 α ,3 β)-2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid (Fig. 1), is a phytochemical found in olive fruit [1, 2] and leaf [3] of *Olea europaea* L. It is the main pentacyclic triterpene of the surface waxes of the drupe [1], where it plays a protective role given its insecticidal and antifeedant activities [4, 5]. Olives and olive oil, the principal derivative of the fruit, are regular dietary components in the Mediterranean region. While olive oil is used for cooking and seasoning, table olives, which are found in a wide range of styles, are frequently consumed both alone as appetizer and as an essential ingredient in a myriad of recipes. The amount of maslinic acid in table olives depends both on the

variety and the method of processing and therefore ranges from 287 ± 67 to 1318 ± 401 mg/kg [2]. In contrast, the concentration of the triterpene in olive oil is generally lower, with differences arising from the quality of the oil. In virgin olive oils, the amount of maslinic acid is higher than in extra virgin olive oils, while in chemically refined oils maslinic acid is absent [6].

Recently, interest for maslinic acid has increased because of its beneficial effects on health, which include antitumoral [7–9], antidiabetic [10, 11], and antioxidant [9, 12] activities. Moreover, it has been attributed to anti-HIV [13] and antiparasitic [14] effects as well as vasorelaxant [15] and stimulant of growth and protein-turnover [16] properties. In spite of the health-enhancing actions described for maslinic acid, to our knowledge its safety has never been assessed. For this reason, the purpose of the present study was to evaluate the effects of the triterpene in Swiss CD-1 mice. Hence, preclinical acute and subacute toxicological evaluations using the Organisation for Economic Cooperation and Development guidelines [17]

Correspondence: Professor Joana M. Planas, Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona (UB), Av. Joan XXIII s/núm, 08028 Barcelona, Spain

E-mail: jmplanas@ub.edu

Fax: +34-93-4035901

Abbreviation: ALT, alanine aminotransferase

*These authors contributed equally to this work.

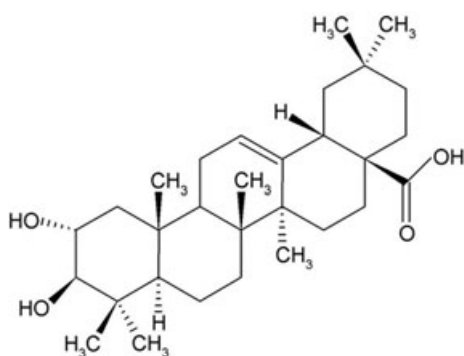


Figure 1. Chemical structure of maslinic acid.

have been undertaken to establish its safety profile. The dose evaluated in the repeated oral administration for 28 days of maslinic acid was 50 mg/kg, which corresponds to approximately 125 times the amount that may be consumed by a person eating 40 g or 10-medium sized olives and 33 g of olive oil a day.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and dose preparation

Maslinic acid was obtained from olive pomace according to the patented method from García-Granados [18]. On account of its low solubility in water, maslinic acid was dissolved in an aqueous solution of (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin at 40% and sodium carboxymethylcellulose at 0.5% following a patented procedure described for betulinic acid [19]. All other reagents were commercially available, analytical grade chemicals.

2.2 Animals and diets

Young adult Swiss CD-1 male mice (8-week old), weighting 32–41 g, were from Harlan Laboratories S.A. (Castellar del Vallès, Barcelona, Spain). Mice were randomly distributed in cages ($n = 3$ –4/cage), housed in standard environmental conditions, and kept at a temperature of $22 \pm 3^\circ\text{C}$ with relative humidity of 40–70% and a 12 h light/12 h dark cycle. Animals received a standard diet (2018 Teklad Global 18%, Harlan, Barcelona, Spain) and water, both freely available. Handling and killing of mice were in full accordance with the European Community guidelines for the care and management of laboratory animals. The studies were approved by the Ethic Committee of Animal Experimentation of the Universitat de Barcelona (ref. 562/12). All animal manipulations were performed in the morning to minimize the effects of circadian rhythms.

2.3 Acute toxicity evaluation

A group of two male adult mice received a single oral dose of 1000 mg/kg of maslinic acid, and a group of two animals received only the solvent. Body weight was recorded daily and the general behavior of the animals was also observed for 15 days. Moreover, food and water consumption were checked every 2 days during the same period. Food conversion efficiency was calculated as the body weight gain divided by the food consumption every 3 days. At the end of this period, mice were anesthetized i.p. with ketamine/xylazine (100 and 10 mg/kg, respectively) and their organs excised to perform a gross pathological examination.

2.4 Subacute toxicity evaluation

Mice were randomly divided into two groups, a maslinic acid group ($n = 9$) and a control group ($n = 6$). Mice in the first group were orally administered by gavage 50 mg/kg of maslinic acid every day for 28 days, while mice in the second group received only the solvent, an aqueous solution of (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin at 40% and sodium carboxymethylcellulose at 0.5% during the same period. The dose was adjusted considering the animal weight in order to ensure a constant supply of maslinic acid and was administered at a volume of 10 mL/kg body weight.

Daily monitoring of body weight and general behavior of the animals was performed. Mice were carefully examined for any signs of toxicity, such as piloerection, abnormal mucosal secretion, and alterations in respiratory and locomotor systems. Food and water consumption were recorded every 2 days. Food conversion efficiency was calculated as the weekly body weight gain divided by the weekly food consumption.

At the end of the treatment, animals were anesthetized i.p. with ketamine/xylazine (100 and 10 mg/kg, respectively) before proceeding to blood extraction by cardiac puncture (0.5 mL into EDTA-K₃ for hematology and 0.5 mL into a tube without anticoagulant for clinical chemistry). Serum for clinical chemistry was obtained after centrifugation of blood samples at $1500 \times g$ (Microcentrifuge 5417R, Eppendorf Ibérica S.L., San Sebastián de los Reyes, Spain) for 15 min. All samples were processed within 4–6 h.

2.4.1 Hematology and clinical chemistry

Hematologic variables were determined in a Cell-Dyn blood analyzer (Abbott Diagnostics Division, Santa Clara, CA, USA). These were erythrocyte count, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, total and differential leukocyte count, platelet count, and mean platelet volume. The biochemical constituents glucose, total cholesterol, triglycerides, HDL, alanine aminotransferase (ALT), bilirubin, creatinine, sodium, potassium,

and chloride were determined with a Roche/Itachi 747 clinical analyzer (Mannheim, Germany) with reagents from Roche Diagnostics.

2.4.2 Gross necropsy

Gross necropsy was performed in both experimental groups, consisting of careful exploration of the body external surface, orifices and cranial, thoracic and abdominal cavities and their contents. Brain, lungs, spleen, heart, liver, kidneys, testicles, and thymus were excised, trimmed of any adherent tissue and their wet weights immediately recorded. Based on the organ weight and the body weight of mouse on the day of sacrifice the relative organ weight (%) was calculated as follows:

$$\text{Relative organ weight (\%)} = \frac{\text{weight of organ (g)}}{\text{body weight (g)}} \times 100$$

2.4.3 Histopathology

The excised organs in the subacute toxicity evaluation were submitted to a histopathologic study, performed in the Serveis Integrats de l'Animal de Laboratori (Universitat Autònoma de Barcelona, Spain). For this reason, organs were fixed in 10% neutral buffered formalin before being embedded in paraffin. Sections (5 μm) were prepared from blocks and stained with hematoxylin and eosin to examine tissue damage under a light microscope.

2.5 Statistics

Results are presented as the mean \pm SEM. All data evaluation and analyses were performed using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical differences between groups were compared by Student's *t* test or Mann–Whitney test. Differences between groups over time were established by 2-way ANOVA followed by Bonferroni post-test. For all tests, $p < 0.05$ was considered significant.

3 Results

3.1 Acute toxicity evaluation

The oral administration of a single dose of 1000 mg/kg of maslinic acid to mice did not have any negative effects on the animals over the following 15-day observation period. Body weight was not different from the control group (Fig. 2A) as well as food conversion efficiency (Fig. 2B). The food and water consumption per animal in the control group were 4.25 ± 0.05 g/day and 4.75 ± 0.05 mL/day, respectively. In

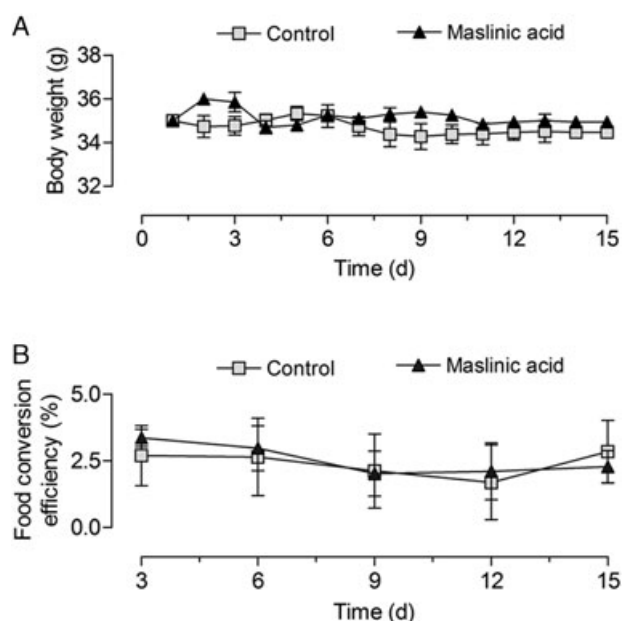


Figure 2. Body weight of Swiss CD-1 male mice (A) and food conversion efficiency (B) after the single oral administration of 1000 mg/kg of maslinic acid ($n = 2$) compared with control mice ($n = 2$). Results are expressed as mean \pm SEM. Groups did not differ, $p > 0.05$.

maslinic acid treated mice these values were 4.82 ± 0.08 g/day and 5.54 ± 0.20 mL/day. No deaths or hazardous signs of toxicity were recorded. The necropsy performed at the end of the experiment did not reveal any alteration derived from the treatment with the triterpene.

3.2 Subacute toxicity

3.2.1 Body weight, food and water consumption

No adverse effects or mortality were recorded during the experimental period after the daily oral administration of maslinic acid at a dose of 50 mg/kg. Body weight was constant during the treatment and there were no statistically significant differences between control and maslinic acid groups (Fig. 3A). At the end of the experiment, body weight was 35.1 ± 0.3 g ($n = 6$) for control mice and 35.5 ± 0.6 g ($n = 9$) for the treated group. Water consumption did not differ between both groups but there were statistically significant differences in food consumption ($p = 0.0004$), being 13% lower in the treated group with respect to the control animals. When food conversion efficiency was calculated, no differences between control and maslinic acid treated mice were observed (Fig. 3B).

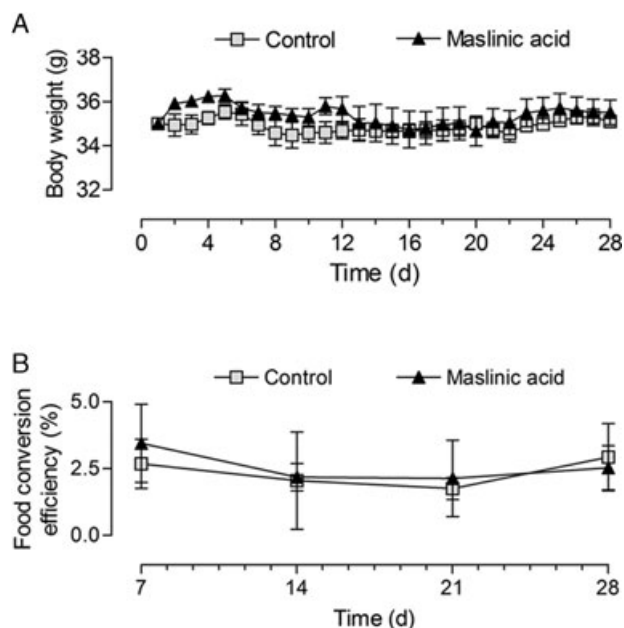


Figure 3. Body weight of Swiss CD-1 male mice (A) and food conversion efficiency (B) after oral administration of 50 mg/kg of maslinic acid ($n = 9$) compared with control mice ($n = 6$). Results are expressed as mean \pm SEM. Groups did not differ, $p > 0.05$.

3.2.2 Hematology and clinical chemistry

The results of the hematologic analyses did not show statistically significant differences between control and maslinic acid groups (Table 1). Red blood cells, white blood cells, and platelets did not differ between both experimental groups. Similarly, biochemical parameters were not affected by the administration of 50 mg/kg of maslinic acid (Table 2). Lipid metabolism was not altered in the treated mice, as shown by the lack of differences in HDL, triglycerides, and total cholesterol levels compared to the control mice. Glucose concentrations did not differ between both experimental groups; creatinine, bilirubin, and ALT concentrations were also comparable, which indicates that kidney and liver functions were not modified by maslinic acid treatment. The concentration of serum electrolytes sodium, potassium, and chloride did not show statistically significant differences between control and treated animals (Table 2).

3.2.3 Gross necropsy

Postmortem examination of internal organs was performed at the end of the experimental period. No macroscopic differences were observed in size, color, or texture between control and maslinic acid groups. The repeated oral administration of the triterpene did not alter the final relative weights of lungs, spleen, heart, liver, kidneys, thymus, or testicles (Table 3). However, relative brain weight was greater in the treated mice than in the control mice ($p = 0.009$) (Table 3).

Table 1. Hematological variables of control and maslinic acid treated mice

Hematological variables	Control ^{a)}	Maslinic acid ^{a)}
Red blood cells		
Erythrocytes ($10^{12}/L$)	8.08 \pm 0.13	8.55 \pm 0.39
Hemoglobin (mmol/L)	7.76 \pm 0.12	8.25 \pm 0.37
Hematocrit (%)	37.6 \pm 0.8	40.0 \pm 1.6
Mean corpuscular volume (fL)	46.2 \pm 0.7	46.8 \pm 0.3
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	15.4 \pm 0.2	15.5 \pm 0.1
Mean corpuscular hemoglobin concentration (mmol/L)	20.6 \pm 0.06	20.6 \pm 0.19
White blood cells		
Leukocytes ($10^9/L$)	3.52 \pm 0.48	5.28 \pm 1.03
Neutrophils (%)	13.6 \pm 2.1	12.9 \pm 2.2
Lymphocytes (%)	83.5 \pm 2.4	85.0 \pm 2.6
Monocytes (%)	2.24 \pm 0.74	1.52 \pm 0.41
Eosinophils (%)	0.22 \pm 0.16	0.20 \pm 0.18
Basophils (%)	0.40 \pm 0.11	0.32 \pm 0.09
Platelets		
Platelets ($10^9/L$)	929 \pm 102	980 \pm 79
Mean platelet volume (fL)	5.88 \pm 0.68	5.32 \pm 0.26

a) Values are mean \pm SEM, $n = 5$ (control) or 6 (maslinic acid). Groups did not differ, $p > 0.05$.

Table 2. Clinical biochemistry variables of control and maslinic acid treated mice

Clinical biochemistry	Control ^{a)}	Maslinic acid ^{a)}
Glucose (mmol/L)	10.2 \pm 1.6	9.20 \pm 1.02
Cholesterol (mmol/L)	3.58 \pm 0.22	3.38 \pm 0.14
Triglycerides (mmol/L)	0.84 \pm 0.11	1.20 \pm 0.15
HDL (mmol/L)	3.23 \pm 0.17	2.96 \pm 0.15
ALT ^{b)} (IU/L)	190 \pm 58	206 \pm 92
Bilirubin (μ mol/L)	2.13 \pm 0.18	2.08 \pm 0.14
Creatinine (μ mol/L)	17.3 \pm 1.8	12.9 \pm 1.4
Sodium ^{c)} (mmol/L)	154 \pm 1	154 \pm 1
Potassium ^{c)} (mmol/L)	3.75 \pm 0.16	4.34 \pm 0.22
Chloride ^{c)} (mmol/L)	112 \pm 2	112 \pm 1

a) Values are mean \pm SEM, $n = 6$ (control) or 9 (maslinic acid). Groups did not differ, $p > 0.05$.

b) ALT, alanine aminotransferase.

c) Values are mean \pm SEM, $n = 2$ (control) or 5 (maslinic acid). Groups did not differ, $p > 0.05$.

3.2.4 Histopathology

A histopathologic study of the vital organs was carried out at the end of the 28-day administration period. Figure 4 shows representative microphotographs of different organs from control and maslinic acid treated mice. Hematoxylin-eosin staining of liver sections showed normal hepatic architecture, hepatocytes, portal triad, and central vein. Kidney sections of maslinic acid treated mice presented a normal renal cortex with a normal appearance of the glomerulus and tubules.

Table 3. Relative organ weight of Swiss CD-1 male mice after the oral administration of 50 mg/kg of maslinic acid for 28 days compared with control animals

Organ	Control ^{a)}	Maslinic acid ^{a)}
Liver (%)	3.82 ± 0.17	4.04 ± 0.11
Kidney (%)	0.63 ± 0.02	0.66 ± 0.02
Lungs (%)	0.86 ± 0.03	0.89 ± 0.03
Brain (%)	1.37 ± 0.02	1.52 ± 0.04 ^{b)}
Heart (%)	0.49 ± 0.02	0.48 ± 0.01
Testicle (%)	0.38 ± 0.01	0.41 ± 0.01
Spleen (%)	0.23 ± 0.02	0.25 ± 0.02
Thymus (%)	0.17 ± 0.01	0.14 ± 0.02

a) Results are expressed as mean ± SEM, $n = 6$ (control) or 9 (maslinic acid). Values indicate % organ weight/body weight.

b) Different from control, $p < 0.05$.

Histological evaluation of the heart revealed normal endocardium and myocardium, as well as normal cardiac muscle architectures. Assessment of the spleen displayed normal appearance with normal lymphoid follicles and sinuses in the mice that received 50 mg/kg of maslinic acid with respect to the controls. Taken together, the analysis revealed that none of the organs had significant lesions attributable to maslinic acid.

4 Discussion

Among the triterpenic components of olives and olive oils, maslinic acid is one that has recently received great attention by the scientific community [20]. Early research was focused on antitumor effects [21–24]. More recently, increasing data were found showing that maslinic acid acts as antioxidant [25], cardiovascular protector [15,26], and antidiabetic [11, 27, 28]. However, to date no safety evaluation of this promising compound has been performed. Therefore, we studied the toxicity of maslinic acid to determine whether there were any harmful effects attributed to this triterpene. To this end, we assessed the effects on health of maslinic acid after the oral administration of a single high dose (1000 mg/kg) as well as those of 50 mg/kg to mice for 28 days. The latter dose was selected taking into account that olives and olive oil are the main dietary sources of this compound. Assuming that the average concentration in commercial table olives and virgin olive oils is 553 mg/kg [2] and 194 mg/kg [6], respectively, and that daily consumption of these foods is 10 medium-sized olives and 33 g olive oil, the mean daily intake of maslinic acid under these conditions is approximately 0.4 mg/kg. Thus, we chose a dose that is near 125 times higher than this estimate to provide a sufficiently large margin of safety.

The acute toxicity study was conducted in order to investigate whether the administration of a single high dose of maslinic acid exerted any adverse effects on the animals over the immediately consecutive days. The lack of negative effects on growth, the absence of symptoms, and the normal

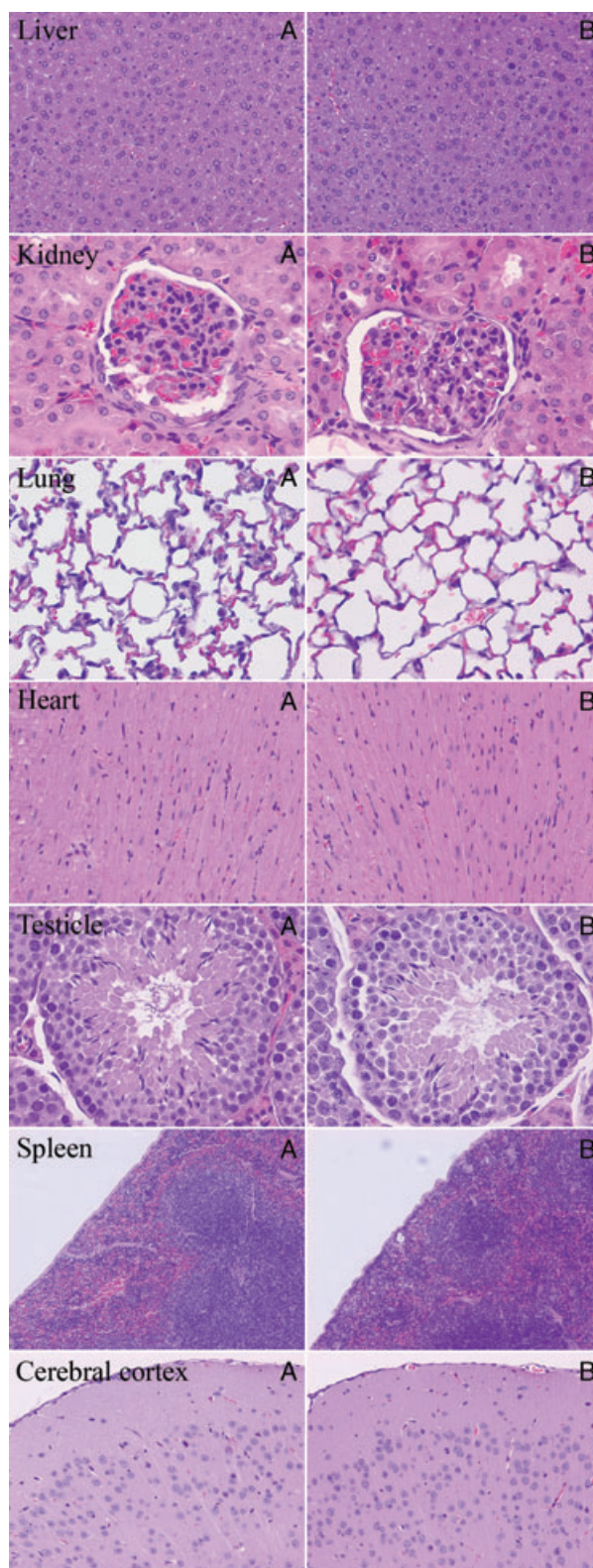


Figure 4. Photomicrographs of liver ($\times 20$), kidney ($\times 40$), lung ($\times 40$), heart ($\times 10$), testicle ($\times 40$), spleen ($\times 10$), and brain ($\times 10$) sections of control (A) and maslinic acid treated mice (B) stained with hematoxylin and eosin.

appearance of the vital organs in the gross necropsy suggested that maslinic acid is practically nontoxic under these conditions. Subsequently, the subacute toxicity of maslinic acid was evaluated following the Organisation for Economic Cooperation and Development guidelines [17] at the dose of 50 mg/kg during a period of 28 days. The daily oral administration of the pentacyclic triterpene did not induce any sign of toxicity such as piloerection, alteration in locomotor activity, or mortality. Our results show that the food intake in Swiss CD-1 mice treated with maslinic acid was 13% lower than the control group, in agreement with previous studies [11, 29]. In KK-A^y mice, an animal model of genetic type-2 diabetes, the oral administration of maslinic acid at 10 or 30 mg/kg during 2 weeks reduced the food intake in 28% and 34% with respect to the control [11]. In gilthead sea bream, the relative intake of diet was 18% lower in the fish fed during 210 days with 100 mg/kg of maslinic acid than in the control group [29]. Despite the lower feed consumption observed in the maslinic group, the body weight of the treated mice did not differ from the observed in the control mice. In the literature, there is no information about the effect on body growth of maslinic acid in healthy mice, and the only data that exist correspond to animal models in which body weight is a variable [11, 23]. By contrast, maslinic acid has been described to stimulate body growth in healthy fish thus being proposed as a feed additive in aquaculture [16, 29]. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with 25 and 250 mg/kg of maslinic acid in the diet during 225 days increased body weight, compared to the control group, in 19.3% and 29.2%, respectively. This effect was attributed to a higher growth rate of white muscle, which was correlated with hyperplasia and hypertrophy in the tissue [16]. The stimulating effect on growth was also observed in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) that received 100 mg/kg for 210 days, but to a lesser extent, since the final body weight of the maslinic acid group was only a 5% higher than in the control group [29]. In addition, no effect on body weight was observed after the administration of 20, 40, and 80 mg/kg to juvenile dentex (*Dentex dentex*) during 49 days [30].

The oral administration of maslinic acid at 50 mg/kg for 28 days does not exert any harmful hematological effect, as indicated by the absence of differences between the treated and control groups in the evaluation of erythrocytes, leukocytes, and platelets. Clinical chemistry was determined in order to assess the overall health status of mice, as well as target organs and alterations in metabolic processes that could be associated with the intake of the pentacyclic triterpene. The present results indicate that maslinic acid did not have any significant effect on blood glucose as previously reported in normal mice [27]. The oral administration of 25, 50, and 100 mg/kg of maslinic acid during 7 days did not induce any significant differences in fasting blood glucose between the control and the treated groups [27]. Conversely, maslinic acid has been reported to exert hypoglycemic effects in different animal models of hyperglycemia [11, 27]. In the KK-A^y mice that mimics obesity-induced diabetes this triterpene at daily dosages of 10 mg/kg and 30 mg/kg for 2 weeks significantly

decreased blood glucose concentration [11]. The reduction of food intake and fat weight by maslinic acid as well as the normalization of plasma adiponectin concentration were the mechanisms suggested to be involved in the improvement of glucose metabolism levels and insulin resistance [11]. In addition, maslinic acid diminished blood glucose concentration in mouse models of hyperglycemia set up by either subcutaneous injection of adrenaline or intragastric administration of glucose [27]. The hypoglycemic effect observed after the oral administration of the pentacyclic triterpene at 50 and 100 mg/kg for 7 days was attributed to an inhibition of glycogen phosphorylase that reduced hepatic glucose production [27]. Noteworthy, the hypoglycemic effect elicited by maslinic acid in mice has not been observed in normal physiological conditions thus avoiding the side effects caused by anti-diabetic drugs.

Clinical chemistry analysis showed that treatment with maslinic acid at 50 mg/kg for 28 days did not modify the serum concentration of cholesterol, triglycerides, and HDL with respect to the control group. Thus, the results suggest that this compound does not modify the lipid profile in healthy animals. However, the daily oral administration of maslinic acid at a dose of 100 mg/kg for 15 days to Sprague-Dawley rats fed with a high cholesterol diet for 30 days normalized the values of total cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol, and LDL-cholesterol [26]. Maslinic acid was reported to lower acyl-CoA cholesterol acyltransferase gene expression thus decreasing intestinal absorption, synthesis, or storage of exogenous and endogenous cholesterol.

Liver function was evaluated with the measurement of ALT, which is an enzyme considered as a valid marker of hepatocellular integrity in mice [31]. The absence of differences between control and treated mice observed in our study indicates the lack of liver damage induced by maslinic acid. Our findings are consistent with the study of Liu et al. [11], in which the serum concentrations of aspartate aminotransferase, ALT, lactate dehydrogenase, and alkaline phosphatase were not altered by the daily oral administration of maslinic acid. Serum concentrations of creatinine and urea measured as markers of kidney integrity showed the absence of adverse effects of maslinic acid in renal function. In addition, the values obtained in the analysis of blood electrolytes were not different between both experimental groups.

The subacute toxicity study was completed with a gross necropsy that included the measurement of the organ weights as well as the histopathologic examination of the tissues, in order to assess the effects of maslinic acid on specific organs. Relative weight of liver, kidneys, heart, lungs, and spleen excised from the mice treated with 50 mg/kg of maslinic acid for 28 days was not significantly different from controls. The liver hyperplasia of 52% and 40% with respect to the controls described in rainbow trout fed with 25 and 250 mg/kg of maslinic acid for 225 days [32], respectively, was not observed in our study. At the end of the experiment, an increase of 6% ($p > 0.05$) was found in the relative weight of the liver in the maslinic group. The brain of the treated animals

was 11% ($p < 0.05$) higher than the control group. However, changes in relative brain weight are rarely associated with neurotoxicity [33].

The absence of toxic effects of the treatment with 50 mg/kg of maslinic acid for 28 days was corroborated in the histopathologic evaluation. The normal hepatic architecture observed in the microscopic evaluation of hematoxylin-eosin staining liver sections combined with the serum concentrations of ALT suggests the lack of hepatocellular damage. Moreover, the evaluation of kidney sections as well as creatinine serum concentrations, which were 26% ($p > 0.05$) lower than the control group, indicate the absence of nephrotoxicity. Furthermore, the histological evaluation of the spleen of the maslinic acid group demonstrated normal architecture with normal lymphoid follicles and sinuses, corroborating that maslinic acid did not produce any hematologic alteration.

In summary, the lack of harmful effects found in the hematology, clinical biochemistry, and histopathology evaluation indicates that maslinic acid administered orally has a large safety margin. These results together with its multiple positive effects on health make maslinic acid as a promising nutraceutical.

This work was supported by grants AGL2009–12866 from the Ministerio de Ciencia e Innovación and 2009SGR471 from the Generalitat de Catalunya, Spain. M.S-G. was a recipient of a fellowship from project 2009SGR471 and G.L-M. of Ajuts de Personal Investigador en Formació (APIF) de la Universitat de Barcelona. The authors thank the staff of the Clinical Analysis of CAP Just Oliveras (Hospitalet de Llobregat, Spain) for excellent technical assistance and Dr. Irene Alfaras for help and advice.

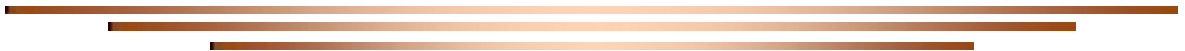
The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Bianchi, G., Pozzi, N., Vlahov, G., Pentacyclic triterpene acids in olives. *Phytochemistry* 1994, 37, 205–207.
- [2] Romero, C., García, A., Medina, E., Ruiz-Méndez, M. V. et al., Triterpenic acids in table olives. *Food Chem.* 2010, 118, 670–674.
- [3] Caputo, R., Mangoni, L., Monaco, P., Previtera, L., New triterpenes from the leaves of *Olea europaea*. *Phytochemistry* 1974, 13, 2825–2827.
- [4] Kombargi, W. S., Michelakis, S. E., Petrakis, C. A., Effect of olive surface waxes on oviposition by *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 1998, 91, 993–998.
- [5] Pungitore, C. R., García, M., Gianello, J. C., Sosa, M. E. et al., Insecticidal and antifeedant effects of *Junellia aspera* (Verbenaceae) triterpenes and derivatives on *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.* 2005, 41, 433–443.
- [6] Pérez-Camino, M. C., Cert, A., Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 1558–1562.
- [7] Juan, M. E., Planas, J. M., Ruiz-Gutiérrez, V., Daniel, H. et al., Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of maslinic and oleanolic acids, two pentacyclic triterpenes from olives, on HT-29 colon cancer cells. *Br. J. Nutr.* 2008, 100, 36–43.
- [8] Martín, R., Carvalho-Tavares, J., Ibeas, E., Hernández, M. et al., Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation. *Cancer Res.* 2007, 67, 3741–3751.
- [9] Allouche, Y., Warleta, F., Campos, M., Sánchez-Quesada, C. et al., Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic capacities of pentacyclic triterpenes found in the skin of olives on MCF-7 human breast cancer cells and their effects on DNA damage. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 121–130.
- [10] Wen, X., Sun, H., Liu, J., Wu, G. et al., Pentacyclic triterpenes. Part 1: the first examples of naturally occurring pentacyclic triterpenes as a new class of inhibitors of glycogen phosphorylases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 4944–4948.
- [11] Liu, J., Sun, H., Duan, W., Mu, D. et al., Maslinic acid reduces blood glucose in KK-Ay mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2007, 30, 2075–2078.
- [12] Montilla, M. P., Agil, A., Navarro, M. C., Jiménez, M. I. et al., Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Med.* 2003, 69, 472–474.
- [13] Xu, H. X., Zeng, F. Q., Wan, M., Sim, K. Y., Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *J. Nat. Prod.* 1996, 59, 643–645.
- [14] De Pablos, L. M., dos Santos, M. F., Montero, E., García-Granados, A. et al., Anticoccidial activity of maslinic acid against infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Parasitol Res.* 2010, 107, 601–604.
- [15] Rodríguez-Rodríguez, R., Perona, J. S., Herrera, M. D., Ruiz-Gutiérrez, V., Triterpenic compounds from “orujo” olive oil elicit vasorelaxation in aorta from spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 2096–2102.
- [16] Fernández-Navarro, M., Peragón, J., Amores, V., De La Higuera, M. et al., Maslinic acid added to the diet increases growth and protein-turnover rates in the white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 2008, 147, 158–167.
- [17] Organisation for Economic Cooperation and Development. Guidelines for testing chemicals. Repeated dose 28-d oral toxicity study in rodents, no. 407, 2008. OECD, Paris, France.
- [18] García-Granados, A., Process for the industrial recovery of oleanolic and maslinic acids contained in the olive milling by products. U.S. Patent 6,037,492, 2000.
- [19] Jaggi, M., Rajendran, P., Ramadoss, S., Siddiqui, M. J.A., Betulinic acid derivatives having antiangiogenic activity, processes for producing such derivatives and their use for treating tumor associated angiogenesis. U.S. Patent 6,403,816B1, 2002.
- [20] Lou-Bonafonte, J. M., Arnal, C., Navarro, M. A., Osada, J., Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development. *Mol. Nutr. Food Res.* 2012, 56, 1043–1057.
- [21] Juan, M. E., Wenzel, U., Ruiz-Gutiérrez, V., Daniel, H. et al., Olive fruit extracts inhibit proliferation and induce apoptosis

- in HT-29 human colon cancer cells. *J. Nutr.* 2006, *136*, 2553–2557.
- [22] Martín, R., Ibeas, E., Carvalho-Tavares, J., Hernández, M. et al., Natural triterpenic diols promote apoptosis in astrocytoma cells through ROS-mediated mitochondrial depolarization and JNK activation. *PLoS One* 2009, *4*, e5975.
- [23] Li, C., Yang, Z., Zhai, C., Qiu, W. et al., Maslinic acid potentiates the anti-tumor activity of tumor necrosis factor alpha by inhibiting NF-kappaB signaling pathway. *Mol. Cancer*. 2010, *9*, 73.
- [24] Lin, C. C., Huang, C. Y., Mong, M. C., Chan, C. Y. et al., Antiangiogenic potential of three triterpenic acids in human liver cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 2011, *59*, 755–762.
- [25] Allouche, Y., Beltrán, G., Gaforio, J. J., Uceda, M. et al., Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food Chem. Toxicol.* 2010, *48*, 2885–2890.
- [26] Liu, J., Sun, H., Wang, X., Mu, D. et al., Effects of oleanolic acid and maslinic acid on hyperlipidemia. *Drug Dev. Res.* 2007, *68*, 261–266.
- [27] Tang, X. Z., Guan, T., Qian, Y. S., Li, Y. M. et al., Effects of maslinic acid as a novel glycogen phosphorylase inhibitor on blood glucose and hepatic glycogen in mice. *Chin. J. Nat. Med.* 2008, *6*, 53–56.
- [28] Guan, T., Qian, Y., Tang, X., Huang, M. et al., Maslinic acid, a natural inhibitor of glycogen phosphorylase, reduces cerebral ischemic injury in hyperglycemic rats by GLT-1 up-regulation. *J. Neurosci. Res.* 2011, *89*, 1829–1839.
- [29] Rufino-Palomares, E., Reyes-Zurita, F. J., Fuentes-Almagro, C. A., de la Higuera, M. et al., Proteomics in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to elucidate the cellular response induced by the intake of maslinic acid. *Proteomics* 2011, *11*, 3312–3325.
- [30] Hidalgo, M. C., Skalli, A., Abellén, E., Arizcun, M. et al., Dietary intake of probiotics and maslinic acid in juvenile dentex (*Dentex dentex* L.): effects on growth performance, survival and liver proteolytic activities. *Aquacult. Nutr.* 2006, *12*, 256–266.
- [31] Smith, G. S., Hall, R. L., Walker, R. M., in: Haschek, W. M., Rousseaux, C. G., Wallig, M. A. (Eds.), *Handbook of Toxicologic Pathology*, Academic Press, London 2002, pp. 123–156.
- [32] Fernández-Navarro, M., Peragón, J., Esteban, F. J., de la Higuera, M. et al., Maslinic acid as a feed additive to stimulate growth and hepatic protein-turnover rates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 2006, *144*, 130–140.
- [33] Sellers, R. S., Morton, D., Michael, B., Roome, N. et al., Society of toxicologic pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicol. Pathol.* 2007, *35*, 751–755.

Resultats: Capítol 3



3.3. CAPÍTOL 3. DESENVOLUPAMENT D'UN MODEL FARMACOCINÈTIC DE L'ÀCID MASLÍNIC SEGUINT UNA APROXIMACIÓ POBLACIONAL

Els resultats d'aquest capítol es troben recollits a l'article 3:

Population pharmacokinetics of maslinic acid, a triterpene from olives, after intravenous and oral administration in rats

Marta Sánchez-González, Helena Colom, Glòria Lozano-Mena, M. Emília Juan, Joana M. Planas.

Mol. Nutr. Food Res. DOI: 10.1002/mnfr.201400147

Els resultats obtinguts han donat lloc a les següents comunicacions en congrés:

- ❖ *Plasma pharmacokinetics following intravenous administration of maslinic acid, a pentacyclic triterpene from olives*

Marta Sánchez-González, Glòria Lozano-Mena, Helena Colom, Andrés García-Granados, M. Emília Juan, Joana M. Planas.

Presentada com a pòster en el congrés:

IUNS 20th International Congress of Nutrition

Granada, Espanya, 15 – 20 de setembre de 2013

- ❖ *Estudio farmacocinético del ácido maslínico, un componente bioactivo de Olea europaea L.*

Marta Sánchez-González, Glòria Lozano-Mena, Tatiana Trebolento, Helena Colom, M. Emília Juan, Joana M. Planas.

Presentada com a pòster i seleccionada com a comunicació oral en el congrés:

XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

Granada, Espanya, 9 – 12 de setembre de 2014

Population pharmacokinetics of maslinic acid, a triterpene from olives, after intravenous and oral administration in rats

Farmacocinètica poblacional de l'àcid maslínic, un triterpè de les olives, després de l'administració intravenosa i oral a rata

M. Sánchez-González, H. Colom, G. Lozano-Mena, M.E. Juan, J.M. Planas

Mol. Nutr. Food Res. DOI: 10.1002/mnfr.201400147

3.3.1. Resum de l'article 3

Objectius. L'àcid maslínic és un component minoritari aïllat de diferents plantes i principalment de les fulles i els fruits de l'olivera. Malgrat que s'han descrit diferents activitats beneficioses per a la salut, com ara, anticancerígen, antidiabètic i cardioprotector, així com l'absència d'efectes adversos, encara es desconeix la seva biodisponibilitat. Per aquesta raó, s'ha estudiat la farmacocinètica d'aquest triterpè pentacíclic seguint una aproximació poblacional com a pas previ pel seu ús futur com a nutricional.

Material i mètodes. Rates mascle Sprague-Dawley van ser sotmeses a l'administració per via intravenosa (1 mg/kg) i oral (50 mg/kg) i es van obtenir mostres de sang en diferents temps durant 24 hores. El plasma es va processar mitjançant una doble extracció líquid-líquid amb acetat d'etil abans de ser analitzat per HPLC-MS. L'anàlisi farmacocinètica simultània de les concentracions plasmàtiques després de l'administració intravenosa i oral de l'àcid maslínic es va dur a terme emprant el modelatge no lineal d'efectes mixtos amb el programa NONMEM versió 7.2. Aquesta anàlisi va incorporar l'escalat entre espècies, que permet l'extrapolació en humans, seguint una aproximació al·lomètrica. Per això, es va integrar el pes corporal (70 kg) en el model base, juntament amb exponents al·lomètrics fixats. La selecció del model en cada etapa del procés es va basar en la bondat de l'ajust, la precisió dels paràmetres estimats i el valor mínim de la funció objectiva (MOFV). La validació del model final es va realitzar utilitzant la comprovació visual predictiva corregida per les prediccions típiques del model (pcVPC, acrònim en anglès de *prediction-corrected visual predictive check*).

Resultats. El model bicompartimental amb absorció de primer ordre i eliminació lineal va ser el que millor va descriure totes les concentracions plasmàtiques de l'àcid maslínic enfront del temps. Les gràfiques de la bondat de l'ajust van indicar que el model és capaç de descriure correctament les concentracions plasmàtiques de l'àcid maslínic ja que tant els valors observats com els predits es trobaven distribuïts aleatòriament al voltant de la

línia d'identitat. Els paràmetres de farmacocinètica poblacional van ser estimats amb una precisió adequada (<50%). La pcVPC va confirmar l'habilitat predictiva del model desenvolupat i la seva estabilitat. L'anàlisi de les constants farmacocinètiques indiquen que l'àcid maslínic té una absorció relativament ràpida ($k_a = 0,52 \text{ 1/h}$) amb una concentració màxima de $4,03 \mu\text{M}$ a les $0,51 \text{ h}$ i una biodisponibilitat del $5,13\%$. La distribució de l'àcid maslínic a teixits és extensa en tant que els volums de distribució central i perifèric van ser de $8,41 \text{ L/70 kg}$ i $63,6 \text{ L/70 kg}$, respectivament. L'aclariment de 8 L/h/70 kg suggereix que l'àcid maslínic presenta un metabolisme hepàtic i renal baix, sent excretat per orina de forma majoritàriament inalterada.

Conclusions. El model farmacocinètic poblacional amb escala al·lomètrica desenvolupat, descriu i prediu adequadament les concentracions plasmàtiques de l'àcid maslínic, sent un primer pas per a futurs estudis farmacocinètics/farmacodinàmics, que permetin establir les pautes d'administració eficaces per a aquest compost bioactiu de la dieta.

RESEARCH ARTICLE

Population pharmacokinetics of maslinic acid, a triterpene from olives, after intravenous and oral administration in rats

Marta Sánchez-González¹, Helena Colom², Glòria Lozano-Mena¹, M. Emília Juan¹ and Joana M. Planas¹

¹ Departament de Fisiologia and Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

² Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Scope: Maslinic acid is a bioactive minor component of *Olea europaea* L. with health-enhancing activities and no harmful effects. A pharmacokinetic (PK) study was conducted to determine its bioavailability for future studies of maslinic acid in humans.

Methods and results: Intravenous (1 mg/kg) and oral (50 mg/kg) administrations to Sprague-Dawley rats were performed. Blood was obtained several times over 24 h and PKs were analyzed with NONMEM 7.2, applying a population approach. Body weight was included a priori in the model with fixed allometric exponents, based on allometric principles. Plasma concentrations versus time were best characterized by a two-open compartment model with first-order absorption and linear elimination. Maslinic acid had a relative rapid oral absorption with a peak concentration after administration at 0.51 h and a bioavailability of 5.13%. Once in blood-stream, it distributed extensively into tissues, since the central and peripheral distribution volumes were 8.41 L/70 kg and 63.6 L/70 kg, respectively. The clearance (8 L/h/70 kg) was related to unaltered renal excretion. The prediction-corrected visual predictive check confirmed its stability and predictive ability.

Conclusion: An allometric population PK model was performed for maslinic acid, which adequately described and predicted plasma concentrations.

Keywords:

HPLC-MS / Maslinic acid / Oral bioavailability / Pentacyclic triterpenes / Rat plasma

Received: February 27, 2014

Revised: June 2, 2014

Accepted: June 27, 2014

1 Introduction

In *Olea europaea* L., maslinic acid ($[(2\alpha,3\beta)-2,3$ -dihydroxyolean-12-en-28-oic acid; Fig. 1), also named crategolic acid, is the principal pentacyclic triterpene. This compound is synthesized as a secondary plant metabolite that protects the fruits and leaves against insects and microorganisms [1]. Although table olives and their derived

oils constitute the main dietary source, this compound is also present in fresh vegetables [2], legumes [3], and fruits [4], as well as in several plants traditionally used as remedies for different diseases [5, 6]. Maslinic acid exerts many health-enhancing effects, such as hypoglycemic [7], cardioprotective [8], neuroprotective [9], and antitumoral [10, 11]. The latter has been extensively studied in different cell lines, including astrocytoma [12], breast [13], prostate [11], pancreatic [14], and colon cancer [10]. In addition to its biological activities, maslinic acid is well tolerated and no signs of adverse effects occur after repeated administration to mice [15]. Therefore, this pentacyclic triterpene is emerging as a potential nutraceutical.

To gain a better insight into the in vivo pharmacological properties of maslinic acid, it is important to have a comprehensive understanding of its oral bioavailability. Hence, it is necessary to know if the oral intake of maslinic acid yields adequate plasma concentrations to achieve in vivo the beneficial activities described for this compound. Therefore, the

Correspondence: Professor Joana M. Planas, Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

E-mail: jmplanas@ub.edu

Fax: +34-934035901

Abbreviations: **AUC**, area under the curve; **CL**, total plasma clearance; **IAV**, inter-animal variability; **MOFV**, minimum objective function value; **pcVPC**, prediction corrected visual predictive check; **PK**, pharmacokinetic; **Tmax**, time required to reach maximum plasma concentration; **WGT**, body weight

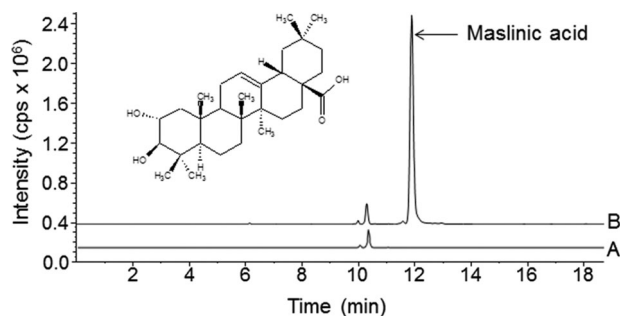


Figure 1. HPLC-MS chromatograms of maslinic acid obtained in the APCI negative mode using the SIM at m/z 471.3. Representative chromatograms of rat blank plasma (A) and plasma collected 30 min after the p.o. administration of 50 mg/kg of maslinic acid (B).

present study aims at assessing the PKs of maslinic acid after i.v. and p.o. administrations to Sprague-Dawley rats. Concentrations of the triterpene in plasma were evaluated following a population PK analysis that adequately models sparse data from different individuals. In addition, the nonlinear mixed effects modeling (NONMEM) enabled the development of an allometric model that may predict the PKs of maslinic acid in humans.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

Maslinic acid was extracted from olive pomace following a patented procedure [16] and was kindly provided by Dr. García-Granados. The internal standard (I.S.), betulinic acid (3 β -3-hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid), was purchased from Extrasynthèse (Genay, France). Sodium chloride, sodium carboxymethylcellulose, and (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin were analytical grade chemicals from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Spain) supplied ACN and J.T. Baker (Deventer, Netherlands), methanol and ethyl acetate, all of them HPLC grade. Purified water was obtained using a Milli-Q water purification system (18 m Ω) (Millipore, Milan, Italy).

2.2 Animals

Male rats of the Sprague-Dawley strain were maintained in the Animal House Facility of the Facultat de Farmàcia of the Universitat de Barcelona. The adult rats weighting an average of 278 ± 1 g were kept in groups of two per cage with free access to a commercial diet (2014 Teklad Global 14%, Harlan, Barcelona, Spain) and water. The animal rooms were at a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$, relative humidity of $50 \pm 10\%$ and a light-dark cycle of 12 h. Experiments were carried out in the morning to lessen the influence of circadian rhythms.

Maslinic acid was administered as a single i.v. or p.o. dose to rats deprived from food for 12 h before the experiments but with free access to water. The animal feed and the plasma were analyzed, prior to the bioavailability study, and no traces of maslinic acid were detected. All animal manipulations fulfilled the requirements established by the European Community guidelines for the care and management of laboratory animals. The approval of the Ethic Committee of Animal Experimentation of the Universitat de Barcelona has been provided for this research protocol (ref. 164/10).

2.3 Dose and sampling

2.3.1 Intravenous study

Maslinic acid was dissolved in (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (20%, w/v) prepared with NaCl (0.9%) due to its limited aqueous solubility [15]. The pentacyclic triterpene was administered to 31 rats through the caudal vein in the tail at a dose of 1 mg/kg as a single bolus (1 mL/kg). The dose was adjusted according to the rat's weight to ensure an accurate administration. Blood was withdrawn at 0.016, 0.042, 0.083, 0.13, 0.16, 0.25, 0.33, 0.42, 0.50, 0.67, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, and 24 h in order to cover the whole plasma concentrations versus time curve.

2.3.2 Oral study

In the p.o. study, 23 animals received maslinic acid at a dose of 50 mg/kg solubilized in (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (40%, w/v) with sodium carboxymethylcellulose (0.5%, w/v). The oral dosing was performed through a stainless steel animal feeding tube (18 gauge \times 76 mm, ref. FTSS-18S-76, Instech Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA, USA) and administration volume of 10 mL/kg. Blood was sampled at 0.16, 0.25, 0.33, 0.42, 0.50, 0.67, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, and 24 h.

2.3.3 Blood collection

Blood was withdrawn from the lateral saphenous veins [17], located subcutaneously in both rat hindlegs, following a sparse sampling design with three to six replicates for each time point. From a single rat, three to four samples were obtained, meaning one to two extractions from each vein. The collected volume was 0.45 mL/extraction, thus a maximum of 1.8 mL of blood was obtained from one animal. This volume represents 10% of the total circulating blood, an amount that can be safely withdrawn within 24 h without influencing the hematocrit [18]. The vein was punctured with a 21G needle and blood was collected directly into EDTA-K₂ coated tubes (Microvette CB300, Sarstedt, Granollers, Spain). Specimens were kept on ice until centrifugation at $1500 \times g$ (Centrifuge

MEGAFUGE 1.0R, Heraeus, Boadilla, Spain) for 15 min at 4°C. Then, plasma was separated from the blood cells and frozen at –20°C until analysis. Plasma samples were used for both noncompartmental analysis and population pharmacokinetic modeling.

2.4 Sample preparation

Prior to liquid–liquid extraction, 10 µL of betulinic acid 100 µM (I.S., stock solution prepared in methanol 80%, v/v), were mixed with 200 µL of plasma. Next, ethyl acetate (2 mL) was added to the samples, which were subjected to vigorous vortex-mixing for 3 min. After centrifugation at 1500 × g at 4°C for 15 min (Centrifuge MEGAFUGE 1.0R), the organic upper layer was placed into a clean tube and the residue was extracted again. The ethyl acetate extracts were gathered and placed in a Concentrator 5301 (Eppendorf Ibérica S.L., San Sebastián de los Reyes, Spain) for evaporation to dryness at a temperature of 45°C. Then, the residue was dissolved in 100 µL of methanol (80%, v/v), agitated in a vortex for 5 min and sonicated for 1 min. After centrifugation at 25 000 × g for 15 min at 4°C (Centrifuge 5417R, Eppendorf Ibérica S.L.), a clear supernatant was obtained for the subsequent analysis by HPLC-MS.

2.5 Equipment and HPLC-MS conditions

The analyses were performed on a Perkin-Elmer series 200 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) LC with a refrigerated autosampler, a quaternary pump, and a thermostated column compartment, coupled to a PE Sciex API 150 EX (AB SCIEX Spain S.L.) single quadrupole mass spectrometer with an atmospheric pressure chemical ionization source. The 1.4.2 Analyst software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used to acquire and analyze the data. The equipment was available at the Scientific and Technological Centers of the Universitat de Barcelona.

A Luna RP C18 column, 150 mm × 2.0 mm 5 µm (Phenomenex, Micron Analítica S.A., Madrid, Spain), maintained at a temperature of 40°C was used for the separation of maslinic acid and betulinic acid. A guard cartridge of identical packing material was used to protect the column (Phenomenex). The components of the mobile phase were water as solvent A and ACN as solvent B delivered at the following gradient elution: at 0 min with 95% solvent A (5% solvent B), at 4 min decreasing to 50% solvent A (50% solvent B), at 8 min with 40% solvent A (60% solvent B), a decline at 12 min to 25% solvent A (75% solvent B), and at 15 min to 0% solvent A (100% solvent B). This percentage was kept for 4 min. Finally, there was an 8 min delay before the next injection to ensure the re-equilibration of the system. The flow rate was 0.8 mL/min. Injections of 20 µL of each sample were carried out by an automated autosampler with the thermostated plate kept at 10°C.

The MS analysis was carried out in the negative ionization mode with the APCI source at 500°C. Nitrogen served as curtain gas (12 au) and as nebulizer gas (10 au) with a nebulizing flow of –3 au. The instrument parameters were as follows: declustering potential of –30 V, focusing potential of –100 V, and entrance potential of –5 V. The SIM mode was used for quantification of maslinic acid at an m/z of 471.3 and betulinic acid (I.S.) at an m/z of 455.3. The dwell time was set at 165 ms. Calibration standards and a blank plasma were prepared in parallel with the samples and later analyzed together with a reagent blank. For the quantification of maslinic acid in samples, the ratio of the peak areas of the analyte and I.S. were interpolated on the external calibration curve. The results were expressed in micromols of maslinic acid per liter of plasma (µM).

For the preparation of calibration standards, 190 µL of rat blank plasma were spiked with 10 µL of standard solutions of maslinic acid in order to obtain concentrations of 0.010, 0.05, 0.1, 0.5, 2.5, 5, 10, 15, and 20 µM. Plasma maslinic acid concentrations greater than 20 µM were diluted and reanalyzed. These calibration standards were extracted as the plasma samples coming from the administered rats. Validation of the method took into account linearity, precision, recovery, accuracy as well as the LODs and limits of quantification, in agreement with the United States Food and Drug Administration Bioanalytical Method Validation Guidance [19].

2.6 PK data analysis

2.6.1 Software

Initially, plasma concentrations of maslinic acid versus time were analyzed following a noncompartmental approach using the software Phoenix version 1.3 (Certara™, Pharsight Corporation). Then, the population PK analysis was carried out with the nonlinear mixed-effects approach with the use of the NONMEM software, version 7.2 (Icon Development Solutions, Ellicott City, MD, USA) [20]. The building of the population PK model was facilitated with the use of the Xpose program, version 4.1. (<http://xpose.sourceforge.net>) [21] implemented into R version 3.0 (<http://www.r-project.com>). The Perl-speaks for NONMEM (PsN) version 5.3.1 Tool-kit (<http://psn.sourceforge.net>) [22] was used for model evaluation purposes.

2.6.2 Noncompartmental analysis

For each administration route (i.v. and p.o.), the main PK parameters were estimated from the mean plasma concentrations versus time profiles by the noncompartmental approach. Plasma concentrations lower than the LOQ were not considered for the analysis. After i.v. administration, half-life ($t_{1/2\beta}$), initial distribution volume (V_i), distribution volume at steady-state (V_{ss}), distribution volume associated with the

terminal phase of the concentration-time curve (Vd_{area}), total plasma clearance (CL), area under the plasma concentrations versus time curve (AUC), and mean residence time (MRT) were calculated. The highest plasma concentration (C_{max}), the time to reach C_{max} (T_{max}), the AUC, the MRT, and the bioavailability (F) were estimated after the p.o. administration. The F was the result of the ratio between the AUC values, normalized by dose, after p.o. versus i.v. administrations.

2.6.3 Population PK modeling

A simultaneous PK analysis of all plasma maslinic acid concentrations versus time obtained from both administrations was performed. Different PK models, such as one-open compartment and two-open compartment, both parameterized in terms of absorption rate constant (K_a), apparent distribution volumes, distribution clearance (CL_D), and F with first order absorption, were used to fit the data. Linear and non-linear kinetics were assessed to characterize the elimination of maslinic acid. CL was the PK parameter evaluated for the linear elimination processes. On the other hand, maximal elimination rate (V_m) and the concentration of the drug at which elimination rate is half maximal (K_m), according to the Michaelis-Menten equation, were considered for non-linear elimination processes.

The first order conditional estimation method with interaction was employed for parameter estimation in the modeling process. Interanimal variability (IAV) assuming a log-normal distribution was tested in all the PK parameters. Additive, proportional, and combined (additive + proportional) models were assayed to describe the residual error associated with plasma concentrations.

Allometric weight scaling to humans was included to all clearances and volume fixed effects a priori and standardized to a body weight (WGT) of 70 kg [23], according to the following relationship:

$$P_j = P_{std} \times (WGT/70)^{PWR} \quad (1)$$

where P_j is the parameter of the j th individual and P_{std} is the typical value of the population PK parameter for a human adult weighting 70 kg. As previously reported [24], the power parameter was 0.75 for CLs and 1 for distribution volumes [25] according to the allometric laws. Both power parameters were employed under the assumption that they are accurate for maslinic acid.

2.6.4 Model evaluation

Model selection on each stage of development was based on goodness-of-fit plots, precision of parameter estimates and minimum objective function value (MOFV). The quality of fit of the PK model to the data was sought by visual examination of goodness-of-fit-plots that included scatter plots of

(a) observed versus population predicted concentrations, (b) observed versus individual predicted concentrations, and (c) conditional weighted residuals versus time [26]. The precision of the model parameter estimates expressed as relative standard error (RSE%) was computed as the ratio between the standard error provided by NONMEM and the parameter estimate multiplied by 100. The statistical evaluation of nested models takes into account the MOFV, because the difference of this value between models shows an approximately χ^2 distribution. A difference of 7.879 in MOFV, which corresponds to a significance level of $p < 0.005$ for 1 degree of freedom, was considered. For nonhierarchical models, the selected one was the most parsimonious with the lowest AIC value, according to the Akaike information criterion [27].

The prediction corrected visual predictive check (pcVPC) stratified by the administration route was used to assess whether the final model provided an adequate description of the data [28]. For that purpose, 1000 datasets as the original were simulated, using the final selected model and the corresponding parameter estimates. Both the observations and the model predictions were normalized by the typical model predictions in each bin of independent variables. The 95% confidence intervals for the median, the 5th and 95th percentiles of the predicted data were then calculated and plotted together with the median and the 5th and 95th percentiles of the observed data. If the model described the data adequately, the lines corresponding to the median and to the 5th and 95th percentiles of the observed data would fall in the respective 95% confidence intervals (CI) of the predicted data. The extent of the Bayesian shrinkage was also evaluated for η and ε parameters in the final population PK model [29].

3 Results

3.1 HPLC-MS method

For method validation, blank plasma spiked with maslinic acid was used. The recovery of the triterpene was calculated as the ratio between the mean peak area of extracted calibration standard samples and the mean peak area of the blank plasma samples spiked with maslinic acid after extraction. Eight different calibration standards in the range 0.05–10 μ M were evaluated and the mean recovery was $99.0 \pm 0.9\%$ ($n = 31$). The sensitivity was evaluated on the basis of a S/N of 3 for the LOD and 10 for the LOQ. The analytical method had an adequate sensitivity for the measurement of maslinic acid in plasma samples, since the LOD was 2 nM and the LOQ was 5 nM. The LOD, verified by analyzing six blank plasma samples to which the theoretical concentration had been added, yield a concentration of 5.03 ± 0.13 nM with a precision of 6.22%. The linearity was assayed within the concentration range of 0.010–30 μ M, which covered the expected concentration range for both the i.v. and p.o. administration routes. Linearity was observed in the calibration curves over the range 0.010–20 μ M with a correlation coefficient up to

0.99, losing the linear tendency at 30 μM . The intraday and interday precisions of the method were below 5.46 and 8.38%, respectively, in all the concentrations evaluated (0.05–20 μM). Finally, accuracy was established by comparing the nominal concentrations and the calculated concentrations, the deviation was lower than 4.82%.

3.2 Plasma concentrations versus time profiles of maslinic acid

The analytical procedure provided good separation and detection of maslinic acid and the I.S. in plasma, thus allowing the analysis after the i.v. and p.o. dosing. Typical chromatograms of blank plasma and plasma obtained 30 min after the p.o. administration are shown in Fig. 1.

Maslinic acid eluted at 11.9 min, free from other interfering peaks, indicating the selectivity of the analytical method. The individual plasma concentrations versus time profiles of maslinic acid after i.v. and p.o. administrations are shown in Fig. 2. In both cases, the PK profiles were properly defined by the sampling points and a two-exponential decay was observed. After p.o. administration, maslinic acid was quantified up to 24 h, obtaining 79 plasma concentrations for PK

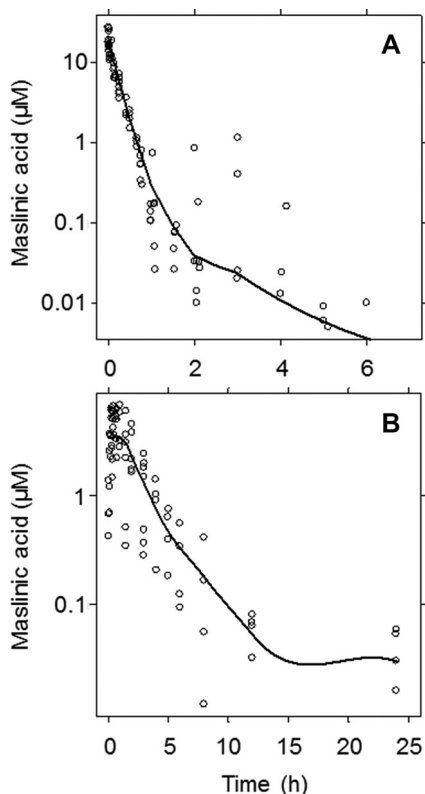


Figure 2. Concentrations versus time profiles of maslinic acid in plasma (open circles) after single i.v. (1 mg/kg) (A) and p.o. (50 mg/kg) (B) administrations to overnight fasted rats ($n = 25$). Solid lines represent the general trend of the observed data.

Table 1. Mean PK parameters estimated through the noncompartmental and compartmental approach after single intravenous and oral doses of 1 and 50 mg/kg maslinic acid in rats

Parameters ^{a)}	Noncompartmental analysis ^{b)}	Compartmental analysis ^{c)}
Intravenous route		
C_0 (μM)	32.79	17.61
$t_{1/2\beta}$ (h)	1.89	10.78
$\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$)	5.06	5.17
Vd_{area} (L/kg)	1.14	5.90
Vss (L/kg)	0.892	1.024
Vi or Vc (L/kg)	0.064	0.120
CL (L/h/kg)	0.418	0.455
MRT (h)	2.13	2.26
Oral route		
C_{max} (μM)	5.36	4.03
T_{max} (h)	0.513	0.500
$\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$)	14.87	12.43
MRT (h)	4.60	3.68
F (%)	6.25	5.13
K_a (1/h)		0.519

a) C_0 , concentration at time 0; $t_{1/2\beta}$, terminal half-life; $\text{AUC}_{0-\infty}$, area under the concentration versus time curve from time zero to infinity; Vd_{area} , volume of distribution associated with the terminal phase; Vss , volume of distribution at steady state; Vi , initial volume of distribution (noncompartmental analysis); Vc , volume of distribution from central compartment (compartmental analysis); CL, total plasma clearance; MRT, mean residence time; C_{max} , peak plasma concentration after oral dosing; T_{max} , time to peak plasma concentration; F , bioavailability; K_a , absorption rate constant.

b) PK parameters were obtained by WinNonlin.

c) NONMEM analysis.

data analysis. However, the concentrations of maslinic acid in plasma after i.v. dosing were lower than the LOQ at 8, 10, and 12 h and were below the LOD at 24 h in all the samples, thus were not included in the PK modeling. Therefore, a total of 87 plasma concentrations were employed in the final data set. The percentage of values below the LOQ was 12%.

3.3 PK data analysis

3.3.1 Noncompartmental analysis

Table 1 lists the PK parameters calculated by the noncompartmental approach after the i.v. (1 mg/kg) and p.o. (50 mg/kg) administrations of maslinic acid to rats. Following i.v. administration (Fig. 2A), plasma concentrations declined rapidly with a half-life of 1.89 h. This value was in agreement with the MRT estimated of 2.13 h. A CL of 0.418 L/h/kg was obtained. The Vi was 0.064 L/kg. The Vss as well as the Vd_{area} were 0.892 L/kg and 1.144 L/kg, respectively. These values suggested a progressive distribution of maslinic acid over time.

Following p.o. administration (Fig. 2B), the peak plasma concentration of maslinic acid (5.36 μM) was achieved at

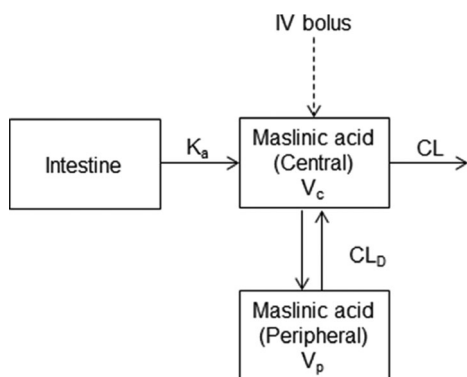


Figure 3. Schematic representation of the PK model that best describes the plasma concentrations versus time profiles of maslinic acid after i.v. and p.o. administrations. The model consists of two open compartments with first order absorption and linear elimination processes.

0.513 h, suggesting a rapid absorption rate. A low oral bioavailability ($F = 6.25\%$) of the triterpene was found.

3.3.2 Population PK model

The simultaneous analysis of i.v. and p.o. concentrations versus time data through population PK modeling yielded the final model represented in Fig. 3. In this study, a two-open compartment model with first order absorption and linear elimination processes, parameterized in terms of CL, CL_D , first order K_a , central and peripheral distribution volumes (V_c and V_p), best described the PKs of maslinic acid. Michaelis-Menten kinetics processes did not improve the fit to the data and no statistically significant reduction in MOFV was found. IAV could be associated with CL. As described above, WGT was added as a fixed covariate a priori with an allometric exponent of 0.75 for CL and CL_D and 1 for V_c and V_p in the final model (Table 2). Residual variability was better described by the proportional error model than by the additive error and combined error models. All the final population PK parameters were estimated with a correct precision (<50%) and are summarized in Table 2.

3.3.3 Model evaluation

Goodness-of-fit plots for maslinic acid plasma concentrations of the final model (Fig. 4) show that observations and predictions were spread randomly around the identity line after both administrations. No bias or specific trend for conditional weighted residuals versus time was observed in any case, confirming the adequacy of the model in describing the data.

The η_{CL} shrinkage (6.42%) was lower than 20%, indicating that the available data were sufficient to make a reliable estimate of the individual parameters and that model evalua-

Table 2. Parameter estimates from the final population PK model

Parameters ^{a)}	Estimate (RSE% ^{b)} (70 kg)
Structural model:	
$CL = \theta_{CL} (WGT/70)^{0.75} \times e^{\eta_{CL}}$	$V_p = \theta_{V_p} (WGT/70)$
$V_c = \theta_{V_c} (WGT/70)$	$K_a = \theta_{K_a}$
$CL_D = \theta_{CL_D} (WGT/70)^{0.75}$	$F = \theta_F$
Proportional residual error model:	
$Y = IPRED + IPRED \times \varepsilon_1$	
Pharmacokinetic parameters	
$CL^{c)}$ (L/h)	8.00 (7.97)
$V_c^{c)}$ (L)	8.41 (6.22)
$CL_D^{c)}$ (L/h)	1.18 (18.73)
$V_p^{c)}$ (L)	63.60 (36.64)
K_a (1/h)	0.52 (7.82)
F (%)	5.13 (11.89)
Inter-animal variability	
IAVCL ^{d)} (%)	38.86 (39.27)
Residual error	
Proportional ^{d)} (%)	40.86 (14.67)

a) CL, total plasma clearance; V_c and V_p , volumes of distribution for central and peripheral compartments; CL_D , distributional clearance between central and peripheral compartments; K_a , first-order absorption rate constant; F , bioavailability; IAV, inter-animal variability; WGT, body weight in kg.

b) All final parameter estimates are shown with the relative standard error indicated (RSE%) by italic numbers in parentheses.

c) The typical parameters refer to a human weighing 70 kg according to the structural model.

d) IAV and residual error are given as coefficients of variation (%).

tion could be performed based on individual predictions. In addition, the ε -shrinkage (10.70%) was also lower than 20%.

The pcVPC demonstrated the predictive ability of the model developed (Fig. 5). In general, median, 5th, and 95th percentiles of the observations as well as the 90% CI for the median, the 5th and 95th percentiles of the simulated profiles were superimposed in each graph. Fiftieth, 95th, and 5th percentiles lines of the observations fell inside the area of the corresponding 90% CI, both after i.v. and p.o. administrations.

4 Discussion

In the current study we have developed a population PK model with integrated allometry after i.v. and p.o. administrations of maslinic acid in rats. Up to now, no information has been reported regarding the PKs of this compound, although the oral bioavailability of similar pentacyclic triterpenes such as betulinic acid, oleanolic acid, and ursolic acid has been assessed either in humans or in experimental animals [30–32]. Therefore, the PK parameters of maslinic acid were estimated by population-based compartmental modeling and estimates were confirmed by noncompartmental calculations. The developed model also serves as a previous step for the possible use of maslinic acid as a nutraceutical, given

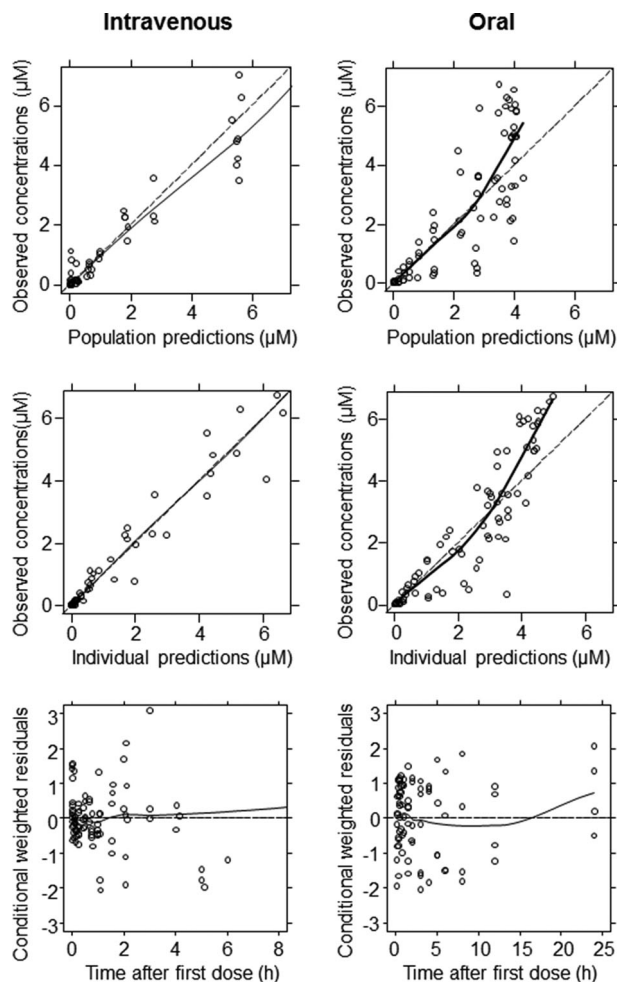


Figure 4. Goodness-of-fit plots for the final population PK model. *Dashed line:* Identity line; *Solid line:* Smooth line indicating the general data trend. Conditional weighted residuals; *Dashed line:* represents the line $y = 0$; *Solid line:* Smooth line indicating the general data trend.

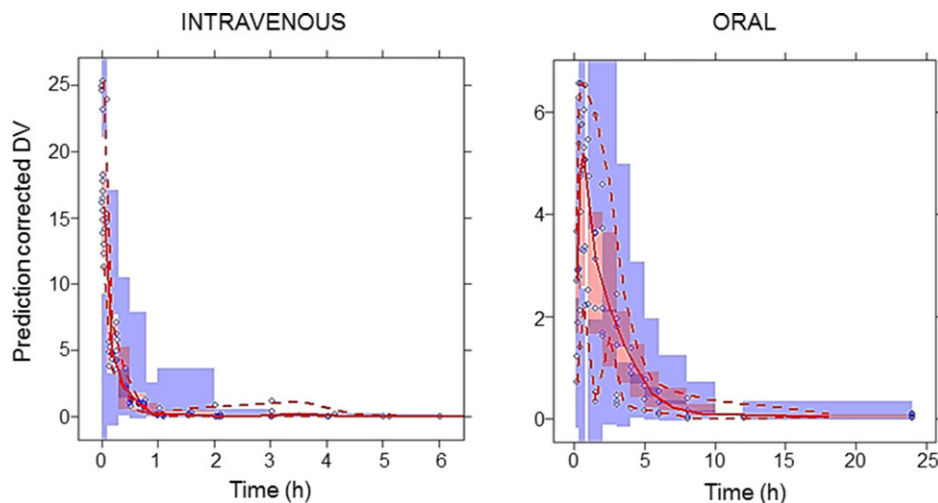


Figure 5. Prediction corrected visual predictive checks of the PK model for maslinic acid after the i.v. and p.o. administrations of 1 and 50 mg/kg, respectively. The circles represent the observed data. *Dashed red lines* depict the 5th and 95th percentiles of the observed concentrations. *Solid red lines* correspond to the 50th percentiles of the observed concentrations. *Shaded blue areas* correspond to the 90% CI of the 5th and 95th percentiles of simulated data and *shaded red area* to the 90% CI of the median of simulated data.

its health-protecting activities [7–11] and no adverse effects [15].

The plasma concentrations obtained after i.v. (1 mg/kg) and p.o. (50 mg/kg) administrations of maslinic acid to rats were simultaneously analyzed following a population PK approach with the nonlinear mixed effects modeling (NONMEM). This analysis, unlike the research performed until now with similar triterpenes [30–32], overcomes the drawback of blood collection when experimental animals are used in addition to allowing the estimation of the standard PK parameters, the associated IAV, and also the residual variability, thus preserving the individuality of plasma concentrations versus time profiles. Moreover, population PKs makes possible the development of interspecies allometric models, which could provide a reasonable prediction of what could happen in humans if maslinic acid were to be used as a nutraceutical [33]. Extrapolation of human PKs from animal data constitutes a valuable tool in the process of nutraceutical development, since it helps to make an estimate of the possible dose to humans as well as of the safety margins before human studies [34]. Allometric scaling is an empirical extrapolation of PK parameters to one species by fitting a power function to the relationship between the PK parameter from other species and a measure of the size, such as WGT [35]. This approach is based on the assumption that numerous structural, physiological, and time related variables scale proportionally to WGT, which seems to be reasonably uniform over a wide range of animal species [34]. In the present study, all PK parameters were allometrically scaled and the validation of the model indicated that it adequately described the data. In agreement with the principles of allometry, PK parameters are associated with indices of WGT. To describe CLs and volumes of distribution, the exponent values of 0.75 and 1, respectively, are usually considered adequate [24]. We have applied these “1/4 power models” directly as a covariate in the population PK model, because the data substantiates, both theoretically [36] and empirically [37], the fixed allometric exponent model.

The developed population PK model was characterized by a two-open compartment model with first order absorption and linear elimination processes. The first order K_a (0.52 1/h) as well as the T_{max} (0.51 h) indicate that maslinic acid has a relatively rapid oral absorption process. The T_{max} value was in agreement with those previously reported for similar pentacyclic triterpenes when given orally to rats, such as ursolic acid (10 mg/kg), with a T_{max} of 0.42 h [32] or oleanolic acid (50 mg/kg), the precursor of maslinic acid in *Olea europaea* L., with a T_{max} of 0.35 h [31].

Our results showed that maslinic acid had an oral bioavailability of 5.13%, which is in agreement with the values reported for other pentacyclic triterpenes [31, 38]. The bioavailability of 23-hydroxybetulinic acid after the p.o. administration of 200 mg/kg to mice was 2.3% [38] whereas oleanolic acid was minimally absorbed (0.7%) after giving to rats doses of 25 and 50 mg/kg [31]. This low bioavailability observed for maslinic acid could be due to either a first-pass effect of the compound at the gut wall or the liver, or a poor gastrointestinal absorption. If the latter takes place, the intestine would face to large amounts of maslinic acid, thus becoming a target organ where the pentacyclic triterpene could perform a protective activity against colon cancer [10]. This behavior has also been described for other bioactive components of food with low plasma concentrations, like *trans*-resveratrol [39, 40].

Once in the bloodstream, maslinic acid is distributed progressively over time. The V_c and V_p in our population were 0.120 and 0.908 L/kg, respectively. These results suggest an extensive distribution into tissues, since the total distribution volume (1.029 L/kg) is higher than the total body water in the rat (0.17 L/kg for a mean WGT of 0.28 kg). Similar values have been reported for oleanolic acid (0.451 L/kg) after i.v. injection of 1 mg/kg [31]. The K_{12} (transfer rate constant from central compartment to peripheral compartment) and K_{21} (transfer rate constant from peripheral compartment to central compartment) estimated in the present study were 0.558 and 0.074 h⁻¹, respectively. The fact that K_{12} is 7–8 times higher than K_{21} suggests that the transfer from the peripheral to the central compartment acts as a limiting step. The rapid disposition rate constant (α) and the terminal phase rate constant (β) were 4.69 and 0.0693 h⁻¹, respectively. Because α was 67.6 times higher than β , maslinic acid plasma concentrations followed a two exponential decay.

The estimated mean CL (0.455 L/h/kg) was slightly lower than that of oleanolic acid administered intravenously at the same dose to rats (1.98 L/h/kg) [31]. This CL value could be due to a minor hepatic and renal metabolism with unaltered renal excretion of the triterpene, as confirmed by internal studies. In that sense, it should be noted that ursolic acid was identified and quantified in several organs 1 h after p.o. administration and kidney was the organ with the lowest concentrations [32]. A similar pattern was described for betulinic acid, which was also quantified at low concentrations in kidney and liver 1 h after intraperitoneal administration [30]. Otherwise, oleanolic, ursolic, and maslinic acids have been

determined in several mice organs after a 4-wk consumption of a diet with 0.5% of these triterpenes and the liver had the largest concentrations followed by kidney [41]. This suggests that, in spite of the low concentration available 1 h after administration, liver could be the major organ for maslinic acid storage [39], where this pentacyclic triterpene could exert a protective activity against hepatic diseases, as it has been demonstrated in different in vitro experiments [2, 42].

The competence of the population PK model was evaluated by comparing the parameters with those obtained by noncompartmental calculations (Table 1). The absolute oral bioavailability, the total distribution volume and the CL obtained by the population approach were 5.13%, 1.029 L/kg, and 0.455 L/h/kg, respectively, whereas the ones calculated by noncompartmental analysis were 6.25%, 1.144 L/kg, and 0.418 L/h/kg, respectively. All together, the estimates were in agreement with each other, thus confirming the good performance of the developed model. Moreover, the exposures to maslinic acid predicted by the population PK model, given by the AUC values, were 5.17 and 12.43 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}/\text{L}$ after i.v. and p.o. administrations, respectively. These values were also similar to those calculated by noncompartmental analysis (i.v. is 5.06 and p.o. is 14.87 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}/\text{L}$), confirming the adequacy of the model. Differences in both approaches were found for C_0 . This could be due to an underprediction of the initial concentrations after the bolus administration by the population model. In the modeling process, a three-compartment model was considered given the concentrations versus time profiles of maslinic acid in plasma (Fig. 2) and the large difference observed between the C_0 (32.8 μM) and the plasma concentrations at 8, 10, and 12 h (<5 nM) after i.v. administration. However, the latter values were below the LOQ of the analytical method and were not included in the modeling process. As a consequence, the data were best fitted with a two-compartment model and the MOFV was not reduced by the three-compartment model. Then, the two-compartmental model was selected although providing an underprediction of the initial concentrations after the administration of the i.v. bolus. It is noteworthy that the developed population model, although it tends to underpredict at the initial times, this only affects the V_c estimation but not the remaining PK parameters. Thus, CL and bioavailability from which depends the extent of exposure values given by AUCs are correctly estimated and in concordance with those obtained after the noncompartmental analysis, thus confirming the adequacy of the model. In addition, discrepancies have been found between the half-life estimated by the developed model (10.78 h) versus the noncompartmental analysis (1.89 h). This could be due to the misspecification of the terminal phase slope by the noncompartmental analysis, caused by the sensitivity of the analytical method that provided concentrations below the LOQ at the latter extraction times. As a consequence, the half-life value obtained by the noncompartmental approach was shorter than that expected for a compound of low clearance and extensive distribution. In addition, it also affected the $V_{d_{area}}$, since its estimation is strongly influenced by the

terminal phase slope. Finally, the internal validation technique applied, i.e. the pcVPC, also indicated the robustness of the model and its predictive ability.

In conclusion, a population PK model with allometric scaling was established for maslinic acid in rats that properly describes the PKs of the triterpene. The model includes allometric scaling of the PK parameters that has been performed according to the laws of allometry and assuming that they are accurate for maslinic acid. Then, the model represents a first approach to the disposition of maslinic acid in humans. Allometric scaling works well for compounds with similar elimination processes across species and fails if elimination pathways differ (i.e. drug metabolizing enzymes, efflux/uptake transporters). Considering that the metabolism of maslinic acid is low and it is excreted in the urine mainly unaltered (data not shown), then, this compound constitutes a good candidate to establish a PK model with allometric scaling. Therefore, the developed model constitutes a first step to future pharmacokinetic/pharmacodynamics (PK/PD) studies. The development of PK/PD relationships may help establishing the most efficacious regimens of maslinic acid, either as a nutraceutical or as a bioactive compound present in the diet. However, further studies about absorption and metabolism of maslinic acid are necessary to explain the low bioavailability of the pentacyclic triterpene.

This work was supported by grants 2009SGR471 from the Generalitat de Catalunya (Spain) and AGL2009-12866 from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain. MS-G was a recipient of a fellowship from project 2009SGR471 and GL-M of Ajuts de Personal Investigador en Formació (APIF) de la Universitat de Barcelona. The authors thank Tatiana Trebolento da Costa and Saskia Homberg for excellent technical assistance.

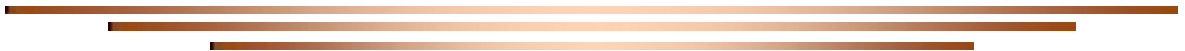
The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Pungitore, C. R., García, M., Gianello, J. C., Sosa, M. E., Tonn, C. E., Insecticidal and antifeedant effects of *Junellia aspera* (Verbenaceae) triterpenes and derivatives on *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.* 2005, *41*, 433–443.
- [2] Lin, C. C., Huang, C. Y., Mong, M. C., Chan, C. Y. et al., Antiangiogenic potential of three triterpenic acids in human liver cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 2011, *59*, 755–762.
- [3] Kalogeropoulos, N., Chiou, A., Ioannou, M., Karathanos, V. T. et al., Nutritional evaluation and bioactive microconstituents (phytosterols, tocopherols, polyphenols, triterpenic acids) in cooked dry legumes usually consumed in the Mediterranean countries. *Food Chem.* 2010, *121*, 682–690.
- [4] Li, G. L., You, J. M., Song, C. H., Xia, L. et al., Development of a new HPLC method with precolumn fluorescent derivatization for rapid, selective and sensitive detection of triterpenic acids in fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2011, *59*, 2972–2979.
- [5] Gao, H., Wu, L., Kuroyanagi, M., Harada, K. et al., Antitumor-promoting constituents from *Chaenomeles sinensis* KOEHNE and their activities in JB6 mouse epidermal cells. *Chem. Pharm. Bull.* 2003, *5*, 1318–1321.
- [6] Lü, H., Chen, J., Li, W. L., Ren, B. R. et al., Hypoglycemic and hypolipidemic effects of the total triterpene acid fraction from *Folium Eriobotryae*. *J. Ethnopharmacol.* 2009, *122*, 486–491.
- [7] Liu, J., Sun, H., Duan, W., Mu, D. et al., Maslinic acid reduces blood glucose in KK-A^y mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2007, *30*, 2075–2078.
- [8] Hussain Shaik, A., Rasool, S. N., Abdul Kareem, M., Krushna, G. S. et al., Maslinic acid protects against isoproterenol-induced cardiotoxicity in albino Wistar rats. *J. Med. Food.* 2012, *15*, 741–746.
- [9] Guan, T., Qian, Y., Tang, X., Huang, M. et al., Maslinic acid, a natural inhibitor of glycogen phosphorylase, reduces cerebral ischemic injury in hyperglycemic rats by GLT-1 up-regulation. *J. Neurosci. Res.* 2011, *89*, 1829–1839.
- [10] Juan, M. E., Planas, J. M., Ruiz-Gutiérrez, V., Daniel, H. et al., Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of maslinic and oleanolic acids, two pentacyclic triterpenes from olives, on HT-29 colon cancer cells. *Br. J. Nutr.* 2008, *100*, 36–43.
- [11] Park, S. Y., Nho, C. W., Kwon, D. Y., Kang, Y. H. et al., Maslinic acid inhibits the metastatic capacity of DU145 human prostate cancer cells: possible mediation via hypoxia-inducible factor-1 α signaling. *Br. J. Nutr.* 2013, *109*, 210–222.
- [12] Martín, R., Carvalho-Tavares, J., Ibeas, E., Hernández, M. et al., Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation. *Cancer Res.* 2007, *67*, 3741–3751.
- [13] Allouche, Y., Warleta, F., Campos, M., Sánchez-Quesada, C. et al., Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic capacities of pentacyclic triterpenes found in the skin of olives on MCF-7 human breast cancer cells and their effects on DNA damage. *J. Agric. Food Chem.* 2011, *59*, 121–130.
- [14] Li, C., Yang, Z., Zhai, C., Qiu, W. et al., Maslinic acid potentiates the anti-tumor activity of tumor necrosis factor alpha by inhibiting NF-kappaB signaling pathway. *Mol. Cancer* 2010, *9*, 73–86.
- [15] Sánchez-González, M., Lozano-Mena, G., Juan, M. E., García-Granados, A. et al., Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013, *57*, 339–346.
- [16] García-Granados, A., Process for the industrial recovery of oleanolic and maslinic acids contained in the olive milling by products. United States patent US 6,037,492. 2002.
- [17] Hem, A., Smith, A. J., Solberg, P., Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. *Lab. Anim.* 1998, *32*, 364–368.
- [18] Mackie, C., Wuyts, K., Haseldonckx, M., Blokland, S. et al., New model for intravenous drug administration and blood sampling in the awake rat, designed to increase quality and throughput for in vivo pharmacokinetic analysis. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 2005, *52*, 293–301.
- [19] FDA, Guidance for industry, Bioanalytical method validation. FDA Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center

- for Veterinary Medicine (CVM), *Department of Health and Human Services* 2001.
- [20] Beal, S.L., Sheiner, L.B. (Eds.), *NONMEM User's guide*, Icon Development Solutions, Ellicott City, Maryland, pp. 1989–2006.
- [21] Jonsson, E.N., Karlsson, M.O., Xpose: an S-PLUS based population pharmacokinetic/pharmacodynamics model building aid for NONMEM. *Comput. Meth. Programs Biomed.* 1999, 58, 51–64.
- [22] Lindbom, L., Pihlgren, P., Jonsson, N., PsN-Toolkit: a collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modelling using NONMEM. *Comput. Meth. Programs Biomed.* 2005, 79, 241–257.
- [23] Holford, N. H., A size standard for pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokin.* 1996, 30, 329–332.
- [24] Peters, H.P., in: Beck, E., Birks, H. J. B., Conner, E. F. (Eds.), *Physiological Correlates of Size*, Cambridge University Press, Cambridge 1983, pp. 48–53.
- [25] Prothero, J. W., Scaling of blood parameters in animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 1980, A67, 649–657.
- [26] Hooker, A. C., Staats, C. E., Karlsson, M. O., Conditional weighted residuals (CWRES): a model diagnostic for the FOCE method. *Pharm. Res.* 2007, 24, 2187–2197.
- [27] Yamaoka, T., Nakagawa, T., Uno, T., Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetics equations. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 1978, 6, 165–175.
- [28] Bergstrand, M., Hooker, A. C., Wallin, J. E., Karlsson, M. O., Prediction-corrected visual predictive checks for diagnosing nonlinear mixed-effects models. *AAPS J.* 2011, 13, 143–151.
- [29] Savic, R. M., Karlsson, M. O., Importance of shrinkage in empirical bayes estimates for diagnostics: problems and solutions. *AAPS J.* 2009, 11, 558–569.
- [30] Udeani, G. O., Zhao, G. M., Geun Shin, Y., Cooke, B. P. et al., Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice. *Biopharm. Drug Dispos.* 1999, 20, 379–383.
- [31] Jeong, D. W., Kim, Y. H., Kim, H. H., Ji, H. Y. et al., Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats. *Biopharm. Drug Dispos.* 2007, 28, 51–57.
- [32] Chen, Q., Luo, S., Zhang, Y., Chen, Z., Development of a liquid chromatography–mass spectrometry method for the determination of ursolic acid in rat plasma and tissue: application to the pharmacokinetic and tissue distribution study. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 399, 2877–2884.
- [33] Jolling, K., Perez Ruixo, J. J., Hemeryck, A., Vermeulen, A. et al., Mixed-effects modelling of the interspecies pharmacokinetic scaling of pegylated human erythropoietin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2005, 24, 465–475.
- [34] Kang, H. E., Lee, M. G., Approaches for predicting human pharmacokinetics using interspecies pharmacokinetic scaling. *Arch. Pharm. Res.* 2011, 34, 1779–1788.
- [35] Boxenbaum, H., Interspecies scaling, allometry, physiological time, and the ground plan of pharmacokinetics. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 1982, 10, 201–227.
- [36] West, G. B., Brown, J. H., Enquist, B. J., A general model for the origin of allometric scaling laws in biology. *Science* 1997, 276, 122–126.
- [37] Anderson, B. J., Holford, N. H., Mechanism-based concepts of size and maturity in pharmacokinetics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2008, 48, 303–332.
- [38] Yang, M., Wang, G. J., Wang, S. J., Li, X. T. et al., Quantitative analysis of 23-hydroxybetulinic acid in mouse plasma using electrospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19, 1619–1623.
- [39] Planas, J. M., Alfaras, I., Colom, H., Juan, M. E., The bioavailability and distribution of *trans*-resveratrol are constrained by ABC transporters. *Arch. Biochem. Biophys.* 2012, 527, 67–73.
- [40] Juan, M. E., Alfaras, I., Planas, J. M., Colorectal cancer chemoprevention by *trans*-resveratrol. *Pharmacol. Res.* 2012, 65, 584–591.
- [41] Yin, M. C., Lin, M. C., Mong, M. C., Lin, C. Y., Bioavailability, distribution, and antioxidative effects of selected triterpenes in mice. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 7697–7701.
- [42] He, X., Liu, R. H., Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 4366–4370.

Resultats: Capítol 4



3.4. CAPÍTOL 4. IDENTIFICACIÓ I QUANTIFICACIÓ DELS METABÒLITS DE L'ÀCID MASLÍNIC EN PLASMA I ORINA DE RATA

Els resultats d'aquest capítol es troben recollits a l'article 4:

Identification in rat plasma and urine by LTQ-Orbitrap mass spectrometry of the metabolites of maslinic acid, a triterpene from olives

Marta Sánchez-González, Glòria Lozano-Mena, M. Emília Juan, Joana M. Planas.

Els resultats obtinguts han donat lloc a la següent comunicació en congrés:

- ❖ *Metabolite profile in plasma of maslinic acid, a bioactive compound from Olea europea L.*

Marta Sánchez-González, Glòria Lozano-Mena, Olga Jáuregui, Andrés García-Granados, M. Emília Juan, Joana M. Planas.

Presentada com a pòster en el congrés:

IUNS 20th International Congress of Nutrition

Granada, Espanya, 15 – 20 de setembre de 2013

Identification in rat plasma and urine by LTQ-Orbitrap mass spectrometry of the metabolites of maslinic acid, a triterpene from olives

Identificació dels metabòlits de l'àcid maslínic, un triterpè de les olives, en plasma i orina de rata per espectrometria de masses LTQ-Orbitrap

M. Sánchez-González, G. Lozano-Mena, M.E. Juan, J.M. Planas

3.4.1. Resum de l'article 4

Objectius. L'àcid maslínic és un triterpè pentacíclic amb capacitat antitumoral, cardioprotectora i antioxidant. Es troba a *Olea europaea* L. així com en altres vegetals i fruites. L'estudi farmacocinètic d'aquest compost va presentar una biodisponibilitat del 5,13% que pot ser atribuïda, entre altres causes, a un metabolisme extens. En conseqüència, es van investigar els metabòlits de l'àcid maslínic en plasma i orina de rata per cromatografia líquida d'alta eficàcia acoblada a espectrometria de masses LTQ-Orbitrap (HPLC-LTQ-Orbitrap-MS).

Material i mètodes. Després d'administrar 50 mg/kg d'àcid maslínic per via oral a rates mascle Sprague-Dawley, es va obtenir sang i orina als 45 minuts. Les mostres es van processar mitjançant una doble extracció líquid-líquid amb acetat d'etil. La identificació dels metabòlits es va dur a terme mitjançant HPLC-LTQ-Orbitrap-MS, amb separació en una columna Luna C18 (150 mm x 2,0 mm, 5 µm), fase mòbil consistent en aigua i acetonitril i ionització per APCI en mode negatiu. Els metabòlits de l'àcid maslínic es van cercar manualment amb el programa Xcalibur Qual Browser i també van ser avaluats amb el software Networks. La quantificació dels derivats de l'àcid maslínic es va realitzar per espectrometria de masses emprant com a patró intern l'àcid betulínic.

Resultats. L'àcid maslínic (C₃₀H₄₈O₄) va ser detectat en plasma i en orina amb una *m/z* de 471,3480 i a un temps de retenció de 9,22 min. En plasma es van identificar 4 derivats (M1-M4) amb massa 15.9949 Da més elevada que el compost pare i fórmula molecular C₃₀H₄₈O₅, compatible amb l'addició d'un grup hidroxil. Amb la *m/z* de 485.3272 i fórmula molecular C₃₀H₄₆O₅ es va identificar un únic pic (M5) suggerint la incorporació d'un grup hidroxil i la pèrdua de 2 hidrògens, compatible amb l'oxidació d'un alcohol secundari en una cetona. Finalment, es van trobar 2 compostos (M6-M7), amb una massa superior a la de l'àcid maslínic en 29.9442 Da i fórmula molecular C₃₀H₄₆O₆, que es poden atribuir a una doble hidroxilació i a la formació d'una cetona. En les mostres d'orina, només es van identificar els metabòlits M1, M4, M5 i M6. La quantificació realitzada per HPLC-MS va indicar que l'àcid maslínic és el compost majoritari en plasma en trobar-se en un 81,8% respecte el 18,2% en què s'han trobat els 7 metabòlits. El principal derivat va ser l'M5

amb un 13,2%, seguit pels derivats monohidroxilats M1 (2,5%), M2 (1%), M4 (0,6%) i M3 (0,4%). Finalment, els metabòlits dihidroxilats i deshidrogenats van representar només un 0,6% de total. En orina, a l'igual que en plasma, l'àcid maslínic va ser el més abundant amb un 73,9%. Ara bé, el perfil dels metabòlits va variar, ja que el derivat M1 va ser el més abundant amb un 19,9%, seguit pels compostos M5 (4,3%), M6 (1,2%) i M4 (0,7%).

Conclusions. L'àcid maslínic es troba majoritàriament inalterat a l'organisme, tot i que s'han identificat 7 metabòlits a plasma i 4 a orina, procedents tots ells de reaccions de fase I, de tipus hidroxilació i oxidació. Els resultats obtinguts proporcionen nova informació sobre el metabolisme de l'àcid maslínic *in vivo*, tot indicant que aquesta via d'eliminació no és la responsable de la baixa biodisponibilitat observada per aquest component bioactiu de la dieta.

1 IDENTIFICATION IN RAT PLASMA AND URINE BY LTQ-ORBITRAP MASS
2 SPECTROMETRY OF THE METABOLITES OF MASLINIC ACID, A TRITERPENE
3 FROM OLIVES

4

5 Marta Sánchez-González, Glòria Lozano-Mena, M. Emília Juan* and Joana M. Planas*

6

7 Departament de Fisiologia and Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB),

8 Universitat de Barcelona (UB), Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

9

10 * **Corresponding author:** Departament de Fisiologia
11 Facultat de Farmàcia
12 Universitat de Barcelona
13 Av. Joan XXIII s/n,
14 08028 Barcelona
15 Phone: +34934024505
16 Fax: +34934035901
17 e-mail: jmplanas@ub.edu (J.M. Planas)
18 e-mail: mejuan@ub.edu (M.E. Juan)

19

20

21

22 **ABSTRACT**

23

24 Maslinic acid is a natural pentacyclic triterpenoid widely distributed in edible and medicinal plants
25 with health-promoting activities. The identification and quantification of its metabolites is a
26 requirement for a better understanding of the biological effects of this triterpene. Therefore,
27 maslinic acid was orally administered to Sprague-Dawley rats at a dose of 50 mg/kg. Blood and
28 urine were withdrawn at 45 min. Samples were extracted with ethyl acetate prior to LC-APCI-LTQ-
29 ORBITRAP analysis. Screening of plasma yielded four monohydroxylated derivatives (M1-M4),
30 one monohydroxylated and dehydrogenated metabolite (M5), and two dihydroxylated and
31 dehydrogenated compounds (M6 and M7). In urine, M1, M4, M5 and M6 were detected.
32 Quantification by LC-APCI-MS revealed maslinic acid as the prevalent compound both in plasma
33 (83.2%) and urine (74.0%), which indicates that metabolism is low and mainly attributable to phase
34 I reactions.

35

36 **Key words:** maslinic acid, metabolism, rat plasma, pentacyclic triterpenes, LC-MS

37 INTRODUCTION

38

39 Metabolite identification and quantitation play an important role in the investigation of bioactive
40 food components. Metabolism affects not only their bioavailability, by influencing the distribution
41 and the rate or the route of excretion, but also the evaluation of their actions, given that metabolites
42 could either contribute to the biological activities or have toxicological effects independent of the
43 parent compound (Holcapek *et al.*, 2008). In addition, the identification of metabolites is important
44 for their potential application as biomarkers of intake in dietary intervention studies (García-Cañas
45 *et al.*, 2010). One of the natural molecules being assessed as a future nutraceutical is maslinic acid
46 ([2 α ,3 β]-2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid) a biologically active pentacyclic triterpene that has
47 been isolated from different vegetal species, including edible and medicinal plants (Romero *et al.*,
48 2010, Caligiani *et al.*, 2013). This compound is especially prevalent in the leaves and fruits of *Olea*
49 *europaea* L. and has recently been found in different fresh vegetables (Lin *et al.*, 2011), legumes
50 (Kalogeropoulos *et al.*, 2010) and fruits (Li *et al.*, 2011). Maslinic acid has attracted much interest
51 due to its proven toxicological safety (Sánchez-González *et al.*, 2013) and its multiple biological
52 activities, such as antitumoral, antidiabetic, cardioprotective and neuroprotective (reviewed in
53 Lozano-Mena *et al.*, 2014). Recently, the pharmacokinetics of this compound has been assessed
54 through a population approach that indicated that maslinic acid had a fairly rapid absorption with a
55 maximal concentration of 4.03 μ M at 30 min after the oral administration of 50 mg/kg and
56 bioavailability of 5.13% (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2014), but the information about its metabolism
57 remains unknown.

58

59 Therefore, the present study aims to investigate the metabolites of maslinic acid in rat plasma and
60 urine by LTQ-Orbitrap mass spectrometry, since the robust, accurate mass data that this high-

61 resolution mass spectrometer provides, allows its unambiguous identification. Furthermore,
62 maslinic acid and its metabolites were quantified by LC-APCI-MS in order to obtain a thorough
63 understanding of the biotransformation underwent by this bioactive compound. The knowledge of
64 the circulating derivatives of maslinic acid is relevant not only for providing information about the
65 metabolic fate of this pentacyclic triterpene applicable to its future use as nutraceutical, but also of
66 putative biomarkers of table olives and olive oil consumption.

67

68 **MATERIALS AND METHODS**

69

70 **Chemicals and Reagents**

71

72 Maslinic acid was derived from olive pomace by the patented method of García-Granados (2002).
73 Extrasynthèse (Genay, France) supplied betulinic acid (3 β -3-hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid),
74 which was used as the internal standard (I.S.). Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) provided (2-
75 hydroxypropyl)- β -cyclodextrin and sodium carboxymethylcellulose. Acetonitrile was purchased
76 from Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Spain) and ethyl acetate and methanol were from J.T.
77 Baker (Deventer, Netherlands). All of them were HPLC grade solvents. Other chemicals and
78 solvents were analytical grade reagents supplied by Sigma-Aldrich. Ultra-pure water (18 m Ω , Milli-
79 Q water, Millipore, Milan, Italy) was used in all the experiments.

80

81 **Animals**

82

83 Adult male Sprague-Dawley rats of 250 - 300 g were maintained in cages (n = 2/cage) at the
84 Animal House Facility of the Facultat de Farmàcia of the Universitat de Barcelona. Animals were

85 kept in an environmentally controlled room with stable humidity ($50 \pm 10\%$) and temperature ($22 \pm$
86 $2 \text{ }^\circ\text{C}$) and a 12 h light:dark cycle. A commercial diet (2014 Teklad Global 14%, Harlan, Barcelona,
87 Spain) and water were supplied *ad libitum*. Rats were fasted overnight and anesthetized by
88 intraperitoneal injection of 90 mg/kg ketamine (Imalgene 1000, Merial Laboratorios S.A.,
89 Barcelona, Spain) and 10 mg/kg xylazine (Rompun 2%, Química Farmacéutica Bayer S.A.,
90 Barcelona, Spain). All animal manipulations accomplished the requirements set by the European
91 Community guidelines for the care and management of laboratory animals. In addition, the
92 experiments were conducted in the morning to lessen the effects of circadian rhythms. The research
93 protocol (ref. 164/10) was approved by the Ethic Committee of Animal Experimentation of the
94 Universitat de Barcelona.

95

96 **Dose Administration and Sample Collection**

97

98 Maslinic acid was administered to overnight fasted rats at a dose of 50 mg/kg by single oral gavage.
99 The pentacyclic triterpene was dissolved into an aqueous solution of (2-hydroxypropyl)- β -
100 cyclodextrin (40%, w/v) and sodium carboxymethylcellulose (0.5%) as previously described
101 (Lozano-Mena *et al.*, 2012). After oral administration, blood was withdrawn from the saphenous
102 vein (Hem *et al.*, 1998) at 45 min and placed in tubes containing EDTA-K₂ (Microvette CB300,
103 Sarstedt, Granollers, Spain) to avoid coagulation. Samples were maintained on ice until
104 centrifugation at $1500\times g$ (Centrifuge Megafuge 1.0R, Heraeus, Boadilla, Spain) for 15 min at $4 \text{ }^\circ\text{C}$.
105 Plasma was subsequently separated and stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis. At 45 min post-
106 administration, urine samples were directly collected from the urinary bladder of previously
107 anesthetized animals and frozen at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ until processing.

108

109 **Preparation of Rat Plasma and Urine Samples**

110

111 Plasma and urine were thawed before analysis and urine was centrifuged at 25000×g for 30 min at 2
112 °C (Centrifuge 5417R, Eppendorf Ibérica S.L.) in order to obtain a clear supernatant. 200 µL of
113 either plasma or urine were spiked with 10 µL of betulinic acid 50 µM (I.S., dissolved in methanol-
114 water 80:20, v/v) before being extracted with 2 mL of ethyl acetate. Each sample was strongly
115 stirred in a vortex-mixer for 3 min and then centrifuged at 1500×g for 15 min at 4 °C (Centrifuge
116 Megafuge 1.0R, Heraeus). The ethyl acetate layer was carefully removed and placed in a clean
117 conical tube, and a second extraction of the residue was done. The organic supernatants were
118 gathered together and evaporated to dryness in a vacuum concentrator (Concentrator 5301,
119 Eppendorf Ibérica S.L., San Sebastián de los Reyes, Spain) at 45 °C. The dry residue was dissolved
120 by adding 100 µL of methanol-water (80:20, v/v) followed by vigorous shaking in a vortex-mixer
121 for 5 min. Samples were immediately sonicated for 1 min and centrifuged at 25000×g for 15 min at
122 4 °C (Centrifuge 5417R, Eppendorf Ibérica S.L.). Finally, an amber vial was employed to place the
123 clean supernatant before the analysis.

124

125 **Metabolite Identification by LC-APCI-LTQ-ORBITRAP**

126

127 Samples were analyzed using an Accela liquid chromatograph (Thermo Scientific, Hemel,
128 Hempstead, UK) equipped with a thermostated autosampler and a quaternary pump, and coupled to
129 an LTQ-ORBITRAP Velos mass spectrometer (Thermo Scientific). The equipment was available at
130 the Centres Científics i Tecnològics of the Universitat de Barcelona. A Luna C18 column (150 x 2.0
131 mm, 5 µm) kept at 40 °C and protected with a security guard cartridge of the same packing material
132 (Phenomenex, Micron Analítica S.A., Madrid, Spain) was used for chromatographic separations.

133 Gradient elution was performed with water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) at a constant
134 flow rate of 0.8 mL/min. The volume of injection was 10 μ L. Separation was carried out within 19
135 min under the following conditions: 0 min, 95% A and 5% B; 4 min, 50% A and 50% B; 8 min,
136 40% A and 60% B; 12 min, 25% A and 75% B; 15 min, 0% A and 100% B; 19 min, 0% A and
137 100% B. An additional period of 8 min was needed for re-equilibration of the column before the
138 ensuing injection.

139

140 Mass spectrometric analysis was conducted using an atmospheric pressure chemical ionization
141 (APCI) source in the negative ion mode. Mass calibration was performed daily according to the
142 manufacturer's guidelines. The LTQ-ORBITRAP was tuned to the optimal conditions for maslinic
143 acid. Therefore, a 100 μ M standard solution was delivered by the LTQ syringe pump at a constant
144 flow rate of 10 mL/min in the presence of LC mobile phase under isocratic conditions of 25% A
145 and 75% B. Operation parameters were set as follows: vaporizer temperature, 450 $^{\circ}$ C; sheath gas,
146 50 arbitrary units (au); auxiliary gas flow, 5 au; sweep gas, 0 au; discharge current, 5 μ A; S-Lens
147 RF level, 70% and capillary gas 300 $^{\circ}$ C. The data was acquired using Fourier transform full scan
148 with resolving power of either 60 000 or 100 000 (at m/z 400) and the microscan count fixed to
149 unity. The automatic gain control (AGC) was set at 1×10^6 . The mass spectrometric data was
150 collected in a range of m/z from 100 to 1000.

151

152 **MS Data Processing**

153

154 Mass chromatograms and spectral data were acquired with the Xcalibur software 2.0 (Thermo
155 Scientific). Maslinic acid metabolites were searched both manually with Xcalibur Qual Browser
156 and also employing MetWorks software (version 1.3, Thermo Scientific). Qual Browser was

157 employed for MS data processing and calculation of elementary compositions. The elemental
158 composition was selected according to the accurate masses and the isotopic pattern. Mass accuracy
159 was determined by the deviation of measured and theoretical masses relative to theoretical values,
160 and was expressed in mDa. MetWorks software allowed the identification of metabolites by
161 comparing the samples with controls, either of blank plasma or urine. The most commonly
162 observed biotransformations in phase I and phase II metabolism were searched in order to find
163 putative metabolites of maslinic acid with mass deviation of less than 5 ppm from the predicted
164 values.

165

166 **Quantification of Maslinic Acid and its Metabolites by LC-APCI-MS in Rat Plasma and** 167 **Urine**

168

169 After the identification of maslinic acid metabolites by LC-APCI-LTQ-ORBITRAP, the
170 compounds were quantified by LC-APCI-MS. The liquid chromatograph (Perkin-Elmer series 200,
171 Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) included a quaternary pump and a refrigerated autosampler
172 plate, and was coupled to a single quadrupole mass spectrometer (PE Sciex API 150 EX, AB
173 SCIEX, Spain, SL) with an APCI source at 500 °C in negative ion mode. The LC-MS system was
174 controlled by the 1.4.2 Analyst software supplied by Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).
175 The chromatographic conditions were the ones described for the LC-APCI-LTQ-ORBITRAP
176 system. For the mass spectrometer, nitrogen was used as both curtain gas (12 au) and nebulizer gas
177 (10 au) with a nebulizing flow of -3 au. The optimum LC-APCI-MS pre-collision cell voltages were
178 -30 V for declustering potential, -100 V for focusing potential and -5 V for entrance potential. The
179 selected ion monitoring (SIM) mode was used for quantification of maslinic acid at m/z 471.3 and
180 betulinic acid (I.S.) at m/z 455.3. The metabolites identified by LC-APCI-LTQ-ORBITRAP were

181 quantified at m/z 487.3 (M1 - M4), 485.3 (M5) and 501.3 (M6 and M7). The dwell time was set at
182 165 ms. Concentrations of maslinic acid in plasma and urine samples were calculated from the ratio
183 of the peak area of the triterpene to the I.S. interpolated on an external calibration curve. Because of
184 the absence of synthetic standards, it was assumed that LC-APCI-MS response to derivatives is
185 similar to that of maslinic acid, thus both plasma and urine metabolites were quantified using the
186 standard curve of the parent compound. Results were expressed as μmol per liter (μM).

187
188 The determination of maslinic acid in plasma and urine was validated for recovery, matrix effect,
189 precision, accuracy, linearity and sensitivity, according to the EMEA Guideline on Bioanalytical
190 Method Validation (2011). Calibration standards were freshly prepared by spiking 190 μL of rat
191 blank plasma or urine with 10 μL of standard solutions of maslinic acid at different concentrations,
192 and were treated as previously indicated for the specimens collected from dosed rats. The post-
193 extraction spiking method proposed by Matuszewski *et al.* (2003) was used to establish the
194 recovery and matrix effect. Briefly, recovery was assessed by comparing the peak areas of
195 calibration standards with the ones obtained from blank plasma or urine spiked with maslinic acid
196 after the extraction. Matrix effect was evaluated by comparing the peak areas obtained from blank
197 plasma or urine spiked with the pentacyclic triterpene after the extraction to those of a solution of
198 methanol 80% spiked with the expected concentration. Recovery and matrix effect were determined
199 at four concentration levels (0.5, 1, 5 and 10 μM), while precision and accuracy were analyzed at 1,
200 5 and 10 μM . Linearity was assayed in the range 0.005 - 10 μM , which included 8 concentration
201 levels that covered the expected amounts in the samples. The limit of detection (LOD) was
202 considered as the minimum concentration of maslinic acid that could be recognized by the detector
203 and produced a signal-to-noise of 3:1. The lowest limit of quantification (LLOQ) was defined as the

204 lowest concentration of the standard curve that could be accurately quantified and with a signal at
205 least 10 times above the noise level.

206

207 **RESULTS**

208

209 **LC-APCI-LTQ-ORBITRAP Analysis of Maslinic Acid and its Metabolites in Rat Plasma and** 210 **Urine**

211

212 Maslinic acid (C₃₀H₄₈O₄) was unambiguously identified in rat plasma and urine by comparing its
213 retention time (9.22 min) and MS data with the standard reference. In addition, the injection into the
214 high-resolution system LTQ-ORBITRAP gave its accurate mass (m/z 471.3480) with an error of 0.4
215 mDa. The spectra generated for the pentacyclic triterpene in plasma and urine showed the
216 deprotonated molecule [M-H]⁻ without the presence of any fragment (Figure 1 A and Figure 2 A,
217 respectively).

218

219 Possible derivatives of maslinic acid were first predicted based on knowledge of metabolism and
220 then searched in full scan chromatograms of rat plasma and urine samples. Afterwards, the formulas
221 of potential metabolites were compared with that of the parent compound to refer metabolic
222 pathways. The high mass accuracy of the LTQ-ORBITRAP analyzer enabled an extraction of
223 individual chromatograms in a narrow interval of m/z scale (\pm 5 mDa), which is useful for
224 discarding other compounds with similar masses (Jirasko *et al.*, 2010). The initial screening of
225 plasma and urine samples obtained after the oral administration of maslinic acid revealed the
226 formation of derivatives with mass shifts of +16, +14 and +30 Da in comparison with the parent
227 compound. Mass shifts of +32 Da, which corresponded to a double hydroxylation, were searched

228 but were not found in the analyzed plasma and urine samples. On the other hand, phase II
229 metabolites of maslinic acid were not detected after screening with LC-APCI-LTQ-ORBITRAP and
230 MetWorks software, indicating that this compound undergoes mainly phase I metabolism.

231

232 Table 1 shows the list of metabolites identified through LTQ-ORBITRAP analysis, along with
233 retention times, accurate masses, molecular formulas, mDa and ppm of error between the mass
234 found and the accurate mass of each derivative. The observed and calculated masses agree to within
235 less than 1 mDa, which demonstrates the high accuracy of the measured masses. Neither maslinic
236 acid nor its metabolites were detected in plasma and urine of the control group at the corresponding
237 retention times.

238

239 *M1 - M4 (m/z 487.3)*

240

241 Four polar metabolites, namely M1, M2, M3 and M4, were detected in plasma as deprotonated
242 molecules at m/z 487.3 and a molecular formula of $C_{30}H_{48}O_5$, according to the Formula Predictor
243 software (Table 1). The mass of these compounds was 15.9949 Da higher than that of maslinic acid,
244 thus indicating that the biotransformation might be the addition of a hydroxyl group. All the
245 metabolites eluted earlier than the parent compound, showing retention times of 4.77, 5.33, 6.61
246 and 7.13 min for M1, M2, M3 and M4, respectively. As shown in Figure 1B, the peak of M1 was
247 the most abundant, followed by M2 and M4 peaks, whilst that of M3 was the less intense. The
248 accurate mass of each of these metabolites differed by less than 1 mDa from the theoretical mass,
249 and the respective spectra showed an isotopic distribution that was in accordance with the
250 theoretical spectra of the m/z 487.3, indicating a correct identification (Figure 1 B1, B2, B3 and
251 B4).

252

253 On the other hand, in urine samples only metabolites M1 and M4 were detected (Figure 2B).
254 Compound M1 showed the highest relative mass spectrometric response, whereas the intensity of
255 M4 peak was lower, meaning minor concentrations. The spectra of M1 and M4 are shown in Figure
256 2 B1 and B2. M2 and M3 were not present in any of the samples analyzed.

257

258 *M5 (m/z 485.3)*

259

260 A single peak corresponding to a deprotonated molecule at m/z 485.3 was identified as M5. This
261 metabolite had a retention time of 7.75 min and was found both in plasma (Figure 1C) and in urine
262 samples (Figure 2C). The mass increment of 13.9792 Da with respect to maslinic acid (Table 1)
263 together with the molecular formula ($C_{30}H_{46}O_5$) calculated by the Formula Predictor software
264 suggested that this biotransformation consists of the incorporation of a hydroxyl group and the loss
265 of two hydrogen atoms. M5 was identified with an error of 0.23 mDa (Table 1) and a correct
266 isotopic distribution pattern (Figure 1 C1 and Figure 2 C1), which demonstrated an accurate
267 identification of the derivative in both plasma and urine samples.

268

269 *M6 - M7 (m/z 501.3)*

270

271 Two additional compounds (M6 and M7) eluting earlier than the parent compound yielded a
272 deprotonated molecule at m/z 501.3. The retention times were 4.24 and 4.65 min for M6 and M7,
273 respectively. Since the molecular formula of both metabolites was $C_{30}H_{46}O_6$, as calculated by the
274 Formula Predictor software (Table 1), and the mass shift was +29.9442 Da, this biotransformation
275 was attributed to dihydroxylation and dehydrogenation of maslinic acid. In plasma samples, M7

276 showed a higher relative abundance than M6 (Figure 1D), whereas in urine only M6 was detected
277 and with very low intensities, indicating small concentrations (Figure 2D).

278

279 **Quantification of Maslinic Acid Metabolites by LC-APCI-MS in Rat Plasma**

280

281 The mass chromatograms from LC-APCI-LTQ-ORBITRAP were consistent with the LC-APCI-MS
282 chromatograms and allowed the identification of all the metabolites taking into account the relative
283 retention times. The method was adequate for the quantification of maslinic acid in plasma samples,
284 as indicated by the results obtained in the validation. The mean recovery and matrix effect at the
285 four concentration levels assayed were 99.1% and 119.1 %, respectively (Table 2). The intra-day
286 and inter-day precision and accuracy are summarized in Table 3, showing that at all concentrations
287 the results were well below the 15% limit established by the EMEA Guideline on Bioanalytical
288 Method Validation (2011). Calibration curves were linear within the concentration range from
289 0.005 to 10 μM , and a representative curve is $y = 2.39x + 0.25$. Correlation coefficients were above
290 0.99. The sensitivity was suitable, since the LOD and the LLOQ were 2 and 5 nM, respectively.

291

292 Maslinic acid was the main compound in plasma samples withdrawn at 45 min after the oral
293 administration of 50 mg/kg with a concentration of $4.83 \pm 0.85 \mu\text{M}$ (Figure 3A). The identified
294 metabolites were found in plasma at much lower concentrations than the parent compound. The
295 most abundant derivative was the monohydroxylated and dehydrogenated metabolite M5 (m/z
296 485.3) at $0.77 \pm 0.18 \mu\text{M}$, followed by the monohydroxylated metabolite M1 (m/z 487.3) with
297 reached the amount of $0.15 \pm 0.03 \mu\text{M}$. The other monohydroxylated metabolites were found at
298 concentrations of $57.0 \pm 12.7 \text{ nM}$, $22.6 \pm 3.8 \text{ nM}$ and $34.2 \pm 10.9 \text{ nM}$ for M2, M3 and M4,

299 respectively (Figure 3). Similarly, the dihydroxylated and dehydrogenated compounds were present
300 in plasma in minor amounts, of 25.1 ± 4.1 nM for M7 and 10.3 ± 2.3 nM for M6 (Figure 3).

301

302 **Quantification of Maslinic Acid Metabolites by LC-APCI-MS in Rat Urine**

303

304 The analytical method for the determination of maslinic acid in urine was also validated to ensure a
305 reliable quantification of both the parent compound and its metabolites. Recovery and matrix effect
306 were analyzed at concentrations of 0.5, 1, 5 and 10 μ M (Table 2). The extraction method was
307 appropriate for the analysis of maslinic acid in urine, since it yielded recoveries between 95.6 and
308 99.4% (Table 2) and matrix effect values from 103 to 112%. Table 3 displays the intra- and inter-
309 day precision and accuracy, which were assayed by spiking blank urine at three concentrations (1, 5
310 and 10 μ M). The method was precise, as evidenced by relative standard deviations (RSDs) of intra-
311 day and inter-day assays lower than 6.90% and 7.59%, respectively, which fall below the 15% limit
312 stipulated by the EMEA Guideline on Bioanalytical Method Validation (2011). The accuracy of the
313 method met the same criterion. Linearity was observed over the concentration range assayed (0.005
314 - 10 μ M), with a representative calibration curve of $y = 0.58x + 0.05$ and correlation coefficients
315 that surpassed 0.99. The LOD was 2 nM and the LLOQ was 5 nM, meaning appropriate sensitivity.

316

317 Maslinic acid and its metabolites were quantified by LC-APCI-MS in urine samples obtained 45
318 min after the administration of the triterpene (Figure 3B). As previously observed in plasma,
319 maslinic acid was the major compound in urine (73.9%). However, the metabolite profile in this
320 biological fluid differed from that found in plasma. The most abundant compound was the
321 monohydroxylated derivative M1, representing 19.9%, whereas the monohydroxylated and
322 dehydrogenated metabolite (M5) accounted for only 4.30%. The other monohydroxylated

323 metabolite (M4) and the dihydroxylated and dehydrogenated compound M6 represented only a
324 0.71% and 1.23%, respectively.

325

326 **DISCUSSION**

327

328 The identification and quantification of the metabolites of a bioactive compound is essential not
329 only for explaining its bioavailability but also to assess its therapeutic effects. To this end, the
330 choice of an adequate methodology is needed for the unambiguous detection of these derivatives in
331 different biological fluids, such as plasma and urine, where their concentrations could be low. In
332 recent years, liquid chromatography coupled with LTQ-ORBITRAP mass spectrometry has
333 emerged as a powerful and reliable analytical tool for the identification of metabolites (Makarov *et*
334 *al.*, 2006). The ORBITRAP, a high-resolution mass analyzer based on Fourier transform
335 instruments, provides a higher mass resolution and mass accuracy over a wide dynamic range than
336 those achievable with any other mass spectrometers, thus allowing the potential detection and
337 identification of a greater number of metabolites of similar accurate mass with a high level of
338 confidence (Holcapek *et al.*, 2008). This mass analyzer provides high resolution up to 100 000 at
339 m/z 400 and mass accuracy of < 2 ppm (Makarov *et al.*, 2006). Moreover, the proposed structure of
340 a product ion can be confirmed by the chemical formula obtained from the accurate mass
341 measurement and the comparison of the experimental isotopic distribution with theoretically
342 calculated patterns for all elemental compositions considered (Makarov *et al.*, 2006). For all these
343 reasons, LTQ-ORBITRAP is a suitable analytical tool for the structural elucidation of drug
344 metabolites in biological samples, and thus was chosen to identify the metabolites of maslinic acid.

345

346 A large variety of drugs and bioactive compounds from the diet, like maslinic acid, are considered
347 as xenobiotics by the organism. Consequently, a detoxification process is activated, consisting of
348 the increase of its hydrophilicity via metabolism in order to facilitate their excretion (Benedetti *et*
349 *al.*, 2009). The biotransformation of xenobiotics can take place through phase I reactions, based on
350 oxidation, reduction and hydrolysis processes, and phase II reactions, which comprise
351 glucuronidation, sulfation, methylation, acetylation and glutathione conjugation (Testa and Krämer,
352 2006; Holcapek *et al.*, 2008). To devise a comprehensive strategy for the detection in plasma and
353 urine of maslinic acid and its metabolites, the derivatives arising from both processes were
354 considered, but only phase I metabolites were found.

355
356 The analysis by LTQ-ORBITRAP allowed the identification of a monohydroxylated metabolite
357 with four isomers in plasma samples (M1 - M4) and two in urine (M1 and M4). The metabolism of
358 pentacyclic triterpenes has been scarcely assessed with only an *in vivo* study for boswellic acids
359 (Krüger *et al.*, 2008). In agreement with our study, Krüger *et al.* (2008) found in plasma two
360 monohydroxylated derivatives after the oral administration of 12.5 mg/kg of boswellic acids to
361 female albino Wistar rats. The fact that hydroxylation is the principal metabolic route of pentacyclic
362 triterpenes has been confirmed by *in vitro* assays consisting of incubations of oleanolic acid (Jeong
363 *et al.*, 2007) or boswellic acids (Krüger *et al.*, 2008, Gerbeth *et al.*, 2013) with rat and human liver
364 microsomes. Regarding maslinic acid, the biotransformation of this pentacyclic triterpene has only
365 been investigated *in vitro* with the use of fungi such as *Cunninghamella* (Feng *et al.*, 2012) and
366 *Rhizomucor* (Martínez *et al.*, 2013). These species express cytochrome P450 (CYP) enzymes that
367 enable equivalent phase I reactions to mammalian metabolism thus being widely used in the
368 assessment of the biotransformation of drugs and xenobiotics (Murphy 2014). The results obtained
369 with these microbial models of mammalian drug metabolism are in concordance with our findings.

370 Feng *et al.* (2012) described that maslinic acid was transformed by *Cunninghamella blakesleana*
371 into three different monohydroxylated derivatives (7 β -hydroxy, 15 α -hydroxy, 13 β -hydroxy with
372 double bond migration) and one dihydroxylated metabolite (7 β ,15 α -dihydro derivative).
373 Moreover, the bioconversion of maslinic acid by *Rhizomucor miehei* also yielded a
374 monohydroxylated metabolite, but in this case the addition of the hydroxyl group took place at the
375 angular methyl group on position 30 (Martínez *et al.*, 2013). Taking into account these published
376 data and considering that in our study four isomers of the monohydroxylated maslinic acid were
377 detected in plasma, it could be suggested that the hydroxyl groups were added to the positions 7, 13,
378 15 and 30.

379
380 Maslinic acid underwent a biotransformation that yielded M5, which was detected in both plasma
381 and urine. The mass shift of +14 Da exhibited by this metabolite was compatible with
382 monohydroxylation followed by dehydrogenation, which could be due to the oxidation of the
383 corresponding secondary alcohol to a ketone. The pentacyclic ring skeleton of maslinic acid has two
384 alcohols at the 2 and 3 positions, respectively, which are likely to be converted to a ketone. Up to
385 now, this modification of maslinic acid has not been reported. However, this reaction has been
386 described *in vitro* for boswellic acids after incubation with rat liver microsomes (Krüger *et al.*,
387 2008), and also for betulinic acid after incubations with different microbial models of drug
388 metabolism (Chatterjee *et al.*, 2000, Bastos *et al.*, 2007). Additionally, metabolites M6 and M7
389 showed a mass shift of +30 Da, which corresponded to the addition of two hydroxyl groups plus the
390 conversion of a secondary alcohol to a ketone. This result is consistent with the biotransformation
391 observed for boswellic acids (Krüger *et al.*, 2008) as well as ursolic acid after the incubation with
392 the fungus *Pestalotiopsis microspora* (Fu *et al.*, 2011). Under our experimental conditions, no

393 metabolites resulting solely from oxidation (-2 Da) or dihydroxylation (+32 Da) reactions were
394 found neither in plasma nor in urine.

395
396 Once the metabolites of maslinic acid were identified by LTQ-ORBITRAP, their plasmatic
397 concentrations were quantified in order to know the degree of the biotransformation of this
398 compound. After the administration of 50 mg/kg of maslinic acid, this bioactive molecule was the
399 prevalent compound in plasma accounting for 81.8%, and hence the metabolites detected
400 represented only 18.2%. The major derivative found in plasma was M5, which represented 13.2%.
401 Monohydroxylation of maslinic acid took place in a 4.5% for all the four isomers, being M1 the
402 most abundant (2.54%), followed by M2 (0.96%), M4 (0.58%) and M3 (0.38%). Finally, the
403 metabolic conversion of maslinic acid consisting of dihydroxylation and oxidation of a secondary
404 alcohol to a ketone was scarce, since it represented only a 0.60% (M6, 0.17% and M7, 0.43%).
405 Regarding the amount of maslinic acid and its metabolites in urine, results showed that, like in
406 plasma, maslinic acid was the main compound, representing a 74%. In contrast, the metabolite
407 profile experienced a shift, given that the monohydroxylated derivative M1 was the prevalent one
408 (20%), while M5 represented approximately 4%. Taken together, the results indicate that although
409 maslinic acid undergoes phase I metabolism yielding 7 derivatives in plasma and 4 in urine, their
410 contribution to the elimination of this pentacyclic triterpene is not preminent, since the parent
411 compound is excreted in urine mainly unaltered. These findings are consistent with our previous
412 assessment of the pharmacokinetics of maslinic acid that indicated a low clearance that was
413 attributed to minor hepatic and renal metabolism along with unchanged renal excretion (Sánchez-
414 Gonzalez et al., 2014). Moreover, the oral bioavailability of 5.13% observed cannot be mainly
415 attributed to metabolism. At present, experiments on the intestinal absorption of this compound are

416 being conducted in our laboratory, and the results suggest a poor absorption from the
417 gastrointestinal tract (data not shown).

418

419 In summary, the present study thoroughly characterizes for the first time the metabolite profile of
420 maslinic acid in rat plasma and urine. Although the oral bioavailability of similar pentacyclic
421 triterpenes has been reported, and the derivatives of some of them have been identified after
422 incubation with different microorganisms (Chatterjee *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2007; Krüger *et al.*,
423 2008; Fu *et al.*, 2011) or rat and human microsomes (Jeong *et al.*, 2007, Krüger *et al.*, 2008), none
424 of these studies quantified the metabolites in biological fluids. Our results reveal that maslinic acid
425 undergoes mainly phase I metabolism through hydroxylation and oxidation reactions but it is not
426 subjected to phase II biotransformations. A total of seven metabolites were identified in plasma,
427 four monohydroxylated derivatives (M1, M2, M3 and M4), one monohydroxylated and
428 dehydrogenated metabolite (M5) and two dihydroxylated and dehydrogenated derivatives (M6 and
429 M7). Only M1, M4, M5 and M6 were detected in urine. This study provides a comprehensive
430 insight into the metabolite profile of maslinic acid, thus increasing our knowledge about the
431 bioavailability of this bioactive food component.

432

433 **ABBREVIATIONS USED**

434

435 LC-MS, Liquid chromatography-mass spectrometry; LOD, limit of detection; LLOQ, lowest limit
436 of quantification; RSD, relative standard deviation. Maslinic acid was kindly provided by Prof.
437 Andrés García-Granados from Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias,
438 Universidad de Granada.

439

440 **ACKNOWLEDGMENTS**

441

442 The authors thank Dr. Isidre Casals and Dr. Olga Jáuregui from Centres Científics i Tecnològics of
443 the Universitat de Barcelona for excellent technical assistance and advice, and Maria Vicente for
444 excellent technical assistance.

445 **REFERENCES**

446

447 (1) Holcapek, M.; Kolárová, L.; Nobilis, M. High-performance liquid chromatography-tandem
448 mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug
449 metabolites. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 59-78.

450

451 (2) García-Cañas, V.; Simó, C.; León, C.; Cifuentes, A. Advances in Nutrigenomics research:
452 novel and future analytical approaches to investigate the biological activity of natural
453 compounds and food functions. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 290-304.

454

455 (3) Romero, C.; García, A.; Medina, E.; Ruiz-Méndez, M. V.; de Castro, A.; Brenes, M.
456 Triterpenic acids in table olives. *Food Chem.* **2010**, *118*, 670-674.

457

458 (4) Caligiani, A.; Malavasi, G.; Palla, G.; Marseglia, A.; Tognolini, M.; Bruni, R. A simple GC–
459 MS method for the screening of betulinic, corosolic, maslinic, oleanolic and ursolic acid
460 contents in commercial botanicals used as food supplement ingredients. *Food Chem.* **2013**,
461 *136*, 735-741.

462

463 (5) Lin, C. C.; Huang, C. Y.; Mong, M. C.; Chan, C.Y.; Yin, M. C. Antiangiogenic potential of
464 three triterpenic acids in human liver cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 755-762.

465

466 (6) Kalogeropoulos, N.; Chiou, A.; Ioannou, M.; Karathanos, V. T.; Hassapidou, M.;
467 Andrikopoulos, N. K. Nutritional evaluation and bioactive microconstituents (phytosterols,

- 468 tocopherols, polyphenols, triterpenic acids) in cooked dry legumes usually consumed in the
469 Mediterranean countries. *Food Chem.* **2010**, *121*, 682-690.
- 470
- 471 (7) Li, G. L.; You, J. M.; Song, C. H.; Xia, L.; Zheng, J.; Suo, Y. R. Development of a new
472 HPLC method with precolumn fluorescent derivatization for rapid, selective and sensitive
473 detection of triterpenic acids in fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2972–2979.
- 474
- 475 (8) Sánchez-González, M.; Lozano-Mena, G.; Juan, M. E.; García-Granados, A.; Planas, J. M.
476 Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L. *Mol.*
477 *Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 339-346.
- 478
- 479 (9) Lozano-Mena, G.; Sánchez-González, M.; Juan, M. E.; Planas, J. M. Maslinic acid, a natural
480 phytoalexin-type triterpene from olives--a promising nutraceutical? *Molecules.* **2014**, *19*,
481 11538-11559.
- 482
- 483 (10) Sánchez-González, M.; Colom, H.; Lozano-Mena, G.; Juan, M. E.; Planas, J. M. Population
484 pharmacokinetics of maslinic acid, a triterpene from olives, after intravenous and oral
485 administration in rats.. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, doi: 10.1002/mnfr.201400147.
- 486
- 487 (11) García-Granados, A. Process for the industrial recovery of oleanolic and maslinic acids
488 contained in the olive milling by products. Patent No. 6,037,492, **2002**.
- 489

- 490 (12) Lozano-Mena, G.; Juan, M. E.; García-Granados, A.; Planas, J. M. Determination of maslinic
491 acid, a pentacyclic triterpene from olives, in rat plasma by high-performance liquid
492 chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 10220-10225.
- 493
- 494 (13) Hem, A.; Smith, A. J.; Solberg, P. Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse,
495 rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. *Lab. Anim.* **1998**, *32*, 364-368.
- 496
- 497 (14) European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use
498 (CHMP). Guideline on Bioanalytical Method Validation, London, **2011**.
- 499
- 500 (15) Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. Strategies for the assessment of
501 matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.*
502 **2003**, *75*, 3019–3030.
- 503
- 504 (16) Makarov, A.; Denisov, E.; Kholomeev, A.; Balschun, W.; Lange, O.; Strupat, K.; Horning, S.
505 Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal. Chem.*
506 **2006**, *78*, 2113-2120.
- 507
- 508 (17) Benedetti, M. S.; Whomsley, R.; Poggese, I.; Cawello, W.; Mathy, F. X.; Delporte, M. L.;
509 Papeleu, P.; Watelet, J. B. Drug metabolism and pharmacokinetics. *Drug Metab. Rev.* **2009**,
510 *41*, 344-390.
- 511
- 512 (18) Testa, B.; Krämer, S. D. The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 1.
513 Principles and overview. *Chem. Biodivers.* **2006**, *3*, 1053-1101.

- 514
- 515 (19) Krüger, P.; Daneshfar, R.; Eckert, G. P.; Klein, J.; Volmer, D. A.; Bahr, U.; Müller, W. E.;
- 516 Karas, M.; Schubert-Zsilavec, M.; Abdel-Tawab, M. Metabolism of boswellic acids *in vitro*
- 517 and *in vivo*. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 1135-1142.
- 518
- 519 (20) Jeong, D. W.; Kim, Y. H.; Kim, H. H.; Ji, H. Y.; Yoo, S. D.; Choi, W. R.; Lee, S.M.; Han, C.
- 520 K.; Lee, H. S. Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral
- 521 administration in rats. *Biopharm. Drug Dispos.* **2007**, *28*, 51-57.
- 522
- 523 (21) Gerbeth, K.; Hüscher, J.; Fricker, G.; Werz, O.; Schubert-Zsilavec, M.; Abdel-Tawab, M. *In*
- 524 *vitro* metabolism, permeation, and brain availability of six major boswellic acids from
- 525 *Boswellia serrata* gum resins. *Fitoterapia.* **2013**, *84*, 99-106.
- 526
- 527 (22) Feng, X.; Luan, J.; Guo, F. F.; Li, D. P.; Chu, Z. Y. Microbial transformation of maslinic acid
- 528 by *Cunninghamella blakesleana*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *82*, 127-130.
- 529
- 530 (23) Martinez, A.; Rivas, F.; Perojil, A.; Parra, A.; Garcia-Granados, A.; Fernandez-Vivas, A.
- 531 Biotransformation of oleanolic and maslinic acids by *Rhizomucor miehei*. *Phytochemistry.*
- 532 **2013**, *94*, 229-237.
- 533
- 534 (24) Murphy, C.D. Drug metabolism in microorganisms. *Biotechnol Lett.* **2014**, DOI
- 535 [10.1007/s10529-014-1653-8](https://doi.org/10.1007/s10529-014-1653-8).
- 536

537 (25) Chatterjee, P.; Kouzi, S. A.; Pezzuto, J. M.; Hamann, M. T. Biotransformation of the
538 antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Appl. Environ.*
539 *Microbiol.* **2000**, *66*, 3850-3855.

540

541 (26) Bastos, D. Z.; Pimentel, I. C.; de Jesus, D. A.; de Oliveira, B. H. Biotransformation of
542 betulinic and betulonic acids by fungi. *Phytochemistry.* **2007**, *68*, 834-839.

543

544 (27) Fu, S.B.; Yang, J.S.; Cui, J. L.; Meng, Q. F.; Feng, X.; Sun, D. A. Multihydroxylation of
545 ursolic acid by *Pestalotiopsis microspora* isolated from the medicinal plant *Huperzia serrata*.
546 *Fitoterapia.* **2011**, *82*, 1057-1061.

547

548

549 This work was supported by grants AGL2009-12866 and AGL2013-41188 from the Ministerio de
550 Economía y Competitividad and 2009SGR471 and 2014SGR1221 from the Generalitat de
551 Catalunya, Spain. M.S-G. was a recipient of a fellowship from project 2009SGR471 and Beques
552 Iniciació a Tesi Doctoral (FFAR2012) and G.L-M. of Ajuts de Personal Investigador en Formació
553 (APIF) from the Universitat de Barcelona.

554

555 **FIGURE CAPTIONS**

556

557 **Figure 1.** Representative extracted ion chromatograms (EIC) and MS spectra of maslinic acid and
558 its phase I metabolites of rat plasma sample obtained 45 min after the oral administration of 50
559 mg/kg of the triterpene. A full-scan analysis was performed by LC-APCI-LTQ-ORBITRAP using a
560 scan range from m/z 100.00 to 1000.00. EIC chromatograms: maslinic acid (m/z 471.32) (A),
561 monohydroxylated metabolites (m/z 487.34) (B), monohydroxylated and dehydrogenated
562 metabolites (m/z 485.32) (C) and dihydroxylated and dehydrogenated metabolites (m/z 501.32) (D).
563 MS spectra: maslinic acid (A1), monohydroxylated metabolites (B1, B2, B3, B4),
564 monohydroxylated and dehydrogenated metabolite (C1) and dihydroxylated and dehydrogenated
565 metabolites (D1, D2). NL: normalized level.

566

567 **Figure 2.** Representative extracted ion chromatograms (EIC) and MS spectra of maslinic acid and
568 its phase I metabolites of rat urine sample withdrawn 45 min after the oral administration of 50
569 mg/kg of the triterpene. A full-scan analysis was performed by LC-APCI-LTQ-ORBITRAP using a
570 scan range from m/z 100.00 to 1000.00. EIC chromatograms: maslinic acid (m/z 471.32) (A),
571 monohydroxylated metabolites (m/z 487.34) (B), monohydroxylated and dehydrogenated
572 metabolites (m/z 485.32) (C) and dihydroxylated and dehydrogenated metabolites (m/z 501.32) (D).
573 MS spectra: maslinic acid (A1), monohydroxylated metabolites (B1, B2), monohydroxylated and
574 dehydrogenated metabolite (C1) and dihydroxylated and dehydrogenated metabolite (D1). NL:
575 normalized level.

576

577 **Figure 3.** Concentrations of maslinic acid and its metabolites in plasma (A) and urine (B) collected
578 at 45 min after the oral administration of 50 mg/kg of the triterpene. Values are represented as
579 means + S.E.M (n = 4 - 5).

580

Table 1.

Maslinic acid and its metabolites identified by LC-APCI-LTQ-ORBITRAP in rat plasma and urine samples obtained after the oral administration of 50 mg/kg of the pentacyclic triterpene.

	Retention time (min)	Molecular formula	Theoretical mass (m/z)	Measured mass (m/z)	Error		Metabolite appearance	
					mDa	ppm	Plasma	Urine
M0	9.22	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471.3480	471.3479	0.04	-0.22	+	+
<i>Monohydroxylated metabolites</i>								
M1	4.77	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487.3429	487.3426	-0.05	-0.30	+	+
M2	5.33	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487.3429	487.3425	0.13	-0.35	+	ND ^a
M3	6.61	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487.3429	487.3425	0.25	-0.80	+	ND ^a
M4	7.13	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487.3429	487.3424	0.9	-0.50	+	+
<i>Monohydroxylated and dehydrogenated metabolites</i>								
M5	7.75	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	485.3272	485.3271	0.23	0.03	+	+
<i>Dihydroxylated and dehydrogenated metabolites</i>								
M6	4.24	C ₃₀ H ₄₆ O ₆	501.3222	501.3216	-0.37	0.18	+	+
M7	4.65	C ₃₀ H ₄₆ O ₆	501.3222	501.3218	-0.05	-1.13	+	ND ^a

^aND: Not detected

Table 2.

Matrix effect and recovery of the analytical methods to determine maslinic acid in rat plasma and urine.

Theoretical concentration (μM)	Recovery (%)		Matrix effect (%)	
	Plasma	Urine	Plasma	Urine
0.5	98.8 ± 1.6 (n = 9)	95.6 ± 2.7 (n = 3)	108.8 ± 3.1 (n = 3)	110.6 ± 1.8 (n = 3)
1	96.8 ± 2.1 (n = 9)	96.7 ± 2.2 (n = 8)	124.7 ± 1.1 (n = 3)	112.0 ± 4.7 (n = 6)
5	100.2 ± 4.2 (n = 8)	98.7 ± 1.8 (n = 8)	116.1 ± 2.2 (n = 3)	111.5 ± 3.0 (n = 10)
10	100.4 ± 5.2 (n = 6)	99.4 ± 2.0 (n = 6)	126.7 ± 2.3 (n = 3)	109.7 ± 2.3 (n = 3)

Values are expressed as means \pm S.E.M.

Table 3. Precision and accuracy of the analytical methods to determine maslinic acid in rat plasma and urine.

Theoretical concentration (μM)	Intra-day Precision (%)		Inter-day Precision (%)		Accuracy (%)	
	Plasma	Urine	Plasma	Urine	Plasma	Urine
1	1.30	5.62	5.46	7.59	0.54	-4.36
	(n = 3)	(n = 3)	(n = 8)	(n = 12)	(n = 5)	(n = 8)
5	2.64	6.90	5.93	6.91	2.34	0.85
	(n = 3)	(n = 3)	(n = 9)	(n = 10)	(n = 3)	(n = 10)
10	3.30	3.54	6.42	5.10	0.94	14.5
	(n = 3)	(n = 3)	(n = 9)	(n = 6)	(n = 4)	(n = 3)

Values are expressed as means \pm S.E.M.

Figure 1.

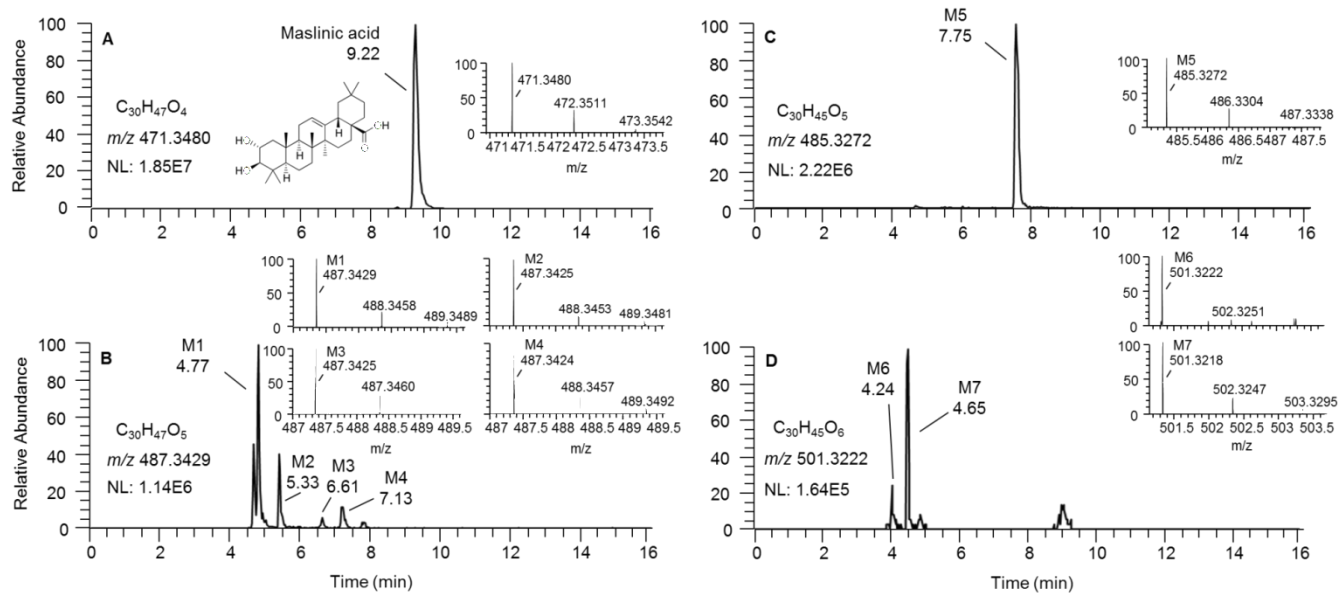


Figure 2.

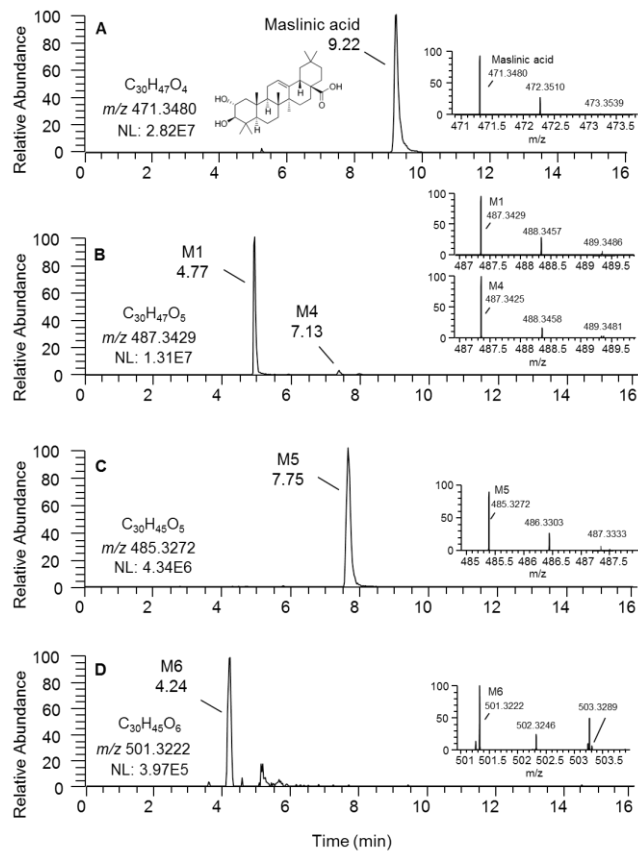
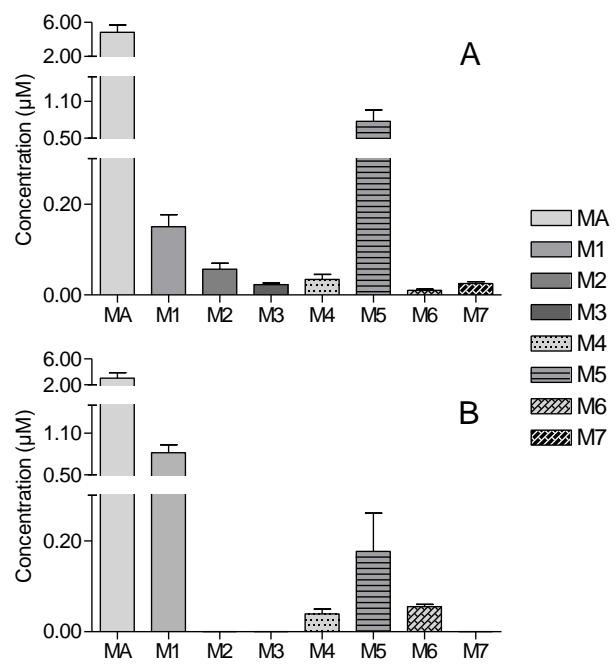
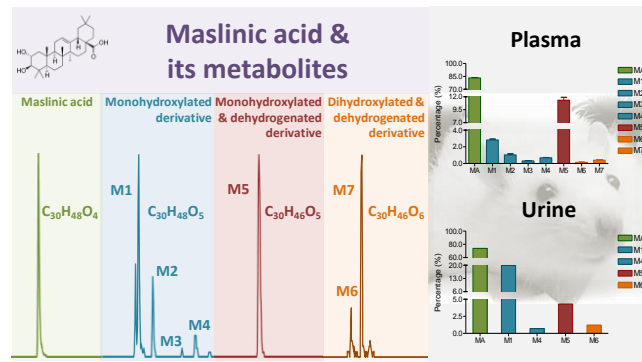


Figure 3.



GRAPHIC FOR TABLE OF CONTENT



IV. DISCUSSIÓ GENERAL

L'interès de la comunitat científica envers l'estudi de la dieta mediterrània s'ha vist incrementat en les darreres dècades a causa de la descripció d'efectes beneficiosos que exerceix sobre diferents malalties. Així, s'ha demostrat que la població que segueix aquest patró alimentari presenta una menor incidència de la síndrome metabòlica (Grosso *et al.*, 2013a; Velázquez-López *et al.*, 2014; Pimenta *et al.*, 2014; Salas-Salvadó *et al.*, 2014), un risc inferior de desenvolupar malaltia cardiovascular (Martínez-González i Bes-Rastrollo, 2014; Grosso *et al.*, 2014) així com de diversos càncers (Grosso *et al.*, 2013b). Per aquest motiu, els aliments que componen la dieta mediterrània han estat objecte d'estudi per tal de conèixer el seu paper en la prevenció d'aquestes malalties, així com per identificar components bioactius que puguin explicar aquestes activitats biològiques (Bender *et al.*, 2014; Pounis *et al.*, 2014; Rahmani *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2014). Un dels aliments més representatius i alhora més estudiats de la dieta mediterrània és l'oli d'oliva, del qual s'ha indicat que millora els factors de risc cardiovascular, com ara el perfil lipídic, la pressió arterial i els perfils antitrombòtics, entre d'altres (Ruiz-Canela i Martínez-González, 2011; Delgado-Lista *et al.*, 2011). A més, el consum habitual d'aquest aliment s'ha associat amb un envelliment saludable, amb una major longevitat (Trichopoulou i Dilis, 2007; Pérez-López *et al.*, 2009), així com amb una menor prevalença de càncer respecte als països del nord d'Europa (Psaltopoulou *et al.*, 2011; Buckland *et al.*, 2011; Escrich *et al.*, 2014). Molts d'aquests efectes beneficiosos per a la salut han estat atribuïts al perfil lipídic que presenta l'oli d'oliva, amb un elevat contingut en àcid oleic (Owen *et al.*, 2000; Bermudez *et al.*, 2011; Sales-Campos *et al.*, 2013). Tot i així, cada vegada hi ha més evidències científiques que demostren que moltes de les activitats biològiques associades a la ingesta d'oli d'oliva es poden atribuir als compostos minoritaris presents a la fracció no saponificable, com ara els polifenols i els triterpens (Martín-Peláez *et al.*, 2013; Sánchez-Quesada *et al.*, 2013). Dins d'aquest darrer grup destaca l'àcid maslínic, que és un triterpè pentacíclic sintetitzat en alguns vegetals per la via del mevalonat a partir del 2,3-oxidoscualè (Stiti *et al.*, 2007) per tal de protegir la planta (Bianchi, 2003; Pungitore *et al.*, 2005).

L'àcid maslínic presenta diversos efectes beneficiosos per a la salut, com ara antitumoral (Juan *et al.*, 2006; Juan *et al.*, 2008; Reyes-Zurita *et al.*, 2011; Sánchez-Tena *et al.*, 2013; Rufino-Palomares *et al.*, 2013), antioxidant (Hussain-Shaik *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2012), antidiabètic (Hou *et al.*, 2009; Rufino-Palomares *et al.*, 2011) i cardioprotector (Guillen *et al.*, 2009; Lou-Bonafonte *et al.*, 2012). L'avaluació de les activitats biològiques d'aquest compost s'ha realitzat majoritàriament *in vitro*, sent limitada la informació de què es disposa procedent d'estudis *in vivo*. En aquest sentit, no es coneixia l'efecte que pot tenir en l'organisme un consum repetit d'àcid maslínic a dosis elevades, com tampoc la seva biodisponibilitat. Un dels motius que justifica aquestes mancances és la falta d'un mètode

analític prou sensible per determinar-lo en fluids biològics. Per això, el primer objectiu d'aquesta memòria va consistir en posar a punt i validar una tècnica que permetés la identificació i la quantificació de l'àcid maslínic en plasma. A l'hora d'analitzar l'àcid maslínic, una de les primeres qüestions que es van plantejar va ser l'elecció de la tècnica més adient. L'anàlisi de triterpens pentacíclics a plantes i/o aliments s'ha realitzat tradicionalment per mitjà de cromatografia de gasos, que s'ha utilitzat bé sola o acoblada a espectrometria de masses (Pérez-Camino i Cert, 1999; Gu *et al.*, 2006; Guinda *et al.*, 2010; Kalogeropoulos *et al.*, 2010; Caligiani *et al.*, 2013). Aquestes tècniques requereixen una reacció de derivatització prèvia per volatilitzar les molècules. Per a molècules no volàtils, com ara l'àcid maslínic, la cromatografia de líquids d'alta eficàcia (HPLC) és una opció adequada (Rhourri-Frih *et al.*, 2008). Els detectors més habituals acoblats als HPLC són els ultraviolats o també els detectors de díodes; ara bé, l'àcid maslínic no té cap grup cromòfor en la seva estructura, presentant una longitud d'ona de màxima absorbància al límit de l'aparell (210 nm). En aquest sentit, es podria comprometre la sensibilitat amb què es determina l'anàlit a baixes concentracions, dificultant la seva identificació i quantificació a fluids biològics d'estudis de farmacocinètica, en què s'extreuen mostres de sang amb continguts molt baixos. Per aquest motiu es va escollir la cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses (HPLC-MS). Aquesta tècnica aporta major selectivitat i sensibilitat atès que mesura la massa dels ions presents a la mostra.

Per establir les condicions òptimes per determinar l'àcid maslínic per HPLC-MS és molt important l'elecció de la font d'ionització. Per aquest motiu es van avaluar la ionització per electroesprai (ESI) i per APCI. Clàssicament, la ionització per ESI ha estat la més emprada per determinar triterpens pentacíclics com ara l'àcid betulínic (Cheng *et al.*, 2003), l'àcid oleanòlic (Jeong *et al.*, 2007) i l'àcid ursòlic (Xia *et al.*, 2011). Per contra, la ionització per APCI és la més utilitzada per a l'anàlisi de compostos apolars (Rhourri-Frih *et al.*, 2008). Simultàniament a l'elecció de la font es va avaluar la fase mòbil, que va consistir en acetonitril com a fase orgànica i, com a fase aquosa, aigua amb diferents modificadors (àcid acètic, àcid fòrmic o acetat d'amoni) o sense modificador. En les nostres condicions experimentals, es va veure que la font d'APCI a 500 °C era la que proporcionava millor intensitat de senyal i que la fase mòbil consistent en acetonitril i aigua la que presentava els cromatogrames amb menys interferències. Per aquest motiu es va escollir la font d'ionització APCI a 500 °C amb aigua i acetonitril com a fase mòbil. Per últim, es van analitzar els modes d'adquisició de dades SIM i de monitorització de reacció múltiple, utilitzant un triple quadrupol. La manca de fragmentació de l'àcid maslínic no va permetre detectar els seus ions fragment o producte. Per aquest motiu, el mode d'adquisició de dades SIM és el que va proporcionar el millor LLOQ. Aquest comportament també s'ha observat en altres triterpens pentacíclics, com ara l'àcid

oleanòlic (Song *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2007) i l'àcid ursòlic (Chen *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2011), per als quals tampoc s'ha descrit la presència de fragments.

El mètode d'extracció de l'àcid maslínic en plasma s'ha basat en el descrit prèviament per Lozano-Mena *et al.* (2012), que utilitza acetat d'etil. Aquest solvent és emprat habitualment per a l'anàlisi d'altres triterpens pentacíclics en plasma com ara l'àcid oleanòlic (Song *et al.*, 2006), l'àcid ursòlic (Xia *et al.*, 2011) i l'àcid glicirretínic (Ding *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008). El mètode s'ha modificat lleugerament, de forma que s'ha reduït el volum de plasma de 500 a 200 μL , ja que la major sensibilitat que proporciona l'HPLC-MS permet emprar volums de mostra inferiors que els de l'HPLC. Aquest és un punt important per al seu posterior ús en estudis de farmacocinètica que impliquen extreure diferents mostres de sang del mateix animal. Un cop realitzada una doble extracció amb acetat d'etil, s'ha evaporat el solvent i s'ha reconstituït en un volum final de 100 μL , aconseguint concentrar al doble els components presents a la mostra, tot incrementant la sensibilitat del mètode analític.

En les tècniques analítiques per HPLC-MS és habitual l'ús de patrons interns per a la quantificació de l'anàlit. La funció d'aquest compost consisteix en minimitzar els efectes de possibles errors sistemàtics o a l'atzar que es puguin produir durant el procés, així com fluctuacions de l'aparell (Tan *et al.*, 2009). Per aquest motiu, el patró intern ha de ser una molècula molt semblant a l'anàlit i que presenti un comportament similar durant la preparació de les mostres i durant l'anàlisi. L'àcid betulínic (m/z 455,7) i l'àcid glicirretínic (m/z 469,7) es van avaluar com a patrons interns ja que són triterpens pentacíclics amb una estructura química i unes propietats físiques molt similars a l'àcid maslínic (m/z 471,3). En assajar l'àcid glicirretínic es va veure que eluïa a un temps de retenció similar al de l'àcid maslínic i la seva contribució isotòpica a 471,3 m/z interferia en la integració. Per aquest motiu es va descartar el seu ús. D'altra banda, l'àcid betulínic, emprat en altres assajos analítics com a patró intern per quantificar l'àcid maslínic en olis vegetals (Pérez-Camino i Cert, 1999) i en fulles d'olivera (Sánchez-Avila *et al.*, 2009), va ser seleccionat com a patró intern atès que en les nostres condicions experimentals eluïa a un temps de retenció de 15,5 min, no interferint amb l'àcid maslínic que presentava un temps de retenció de 11,7 min.

Un cop les condicions de l'HPLC-MS van ser optimitzades, es va validar el mètode per determinar l'àcid maslínic en plasma de rata segons la FDA (2001) i l'EMEA (2011) pels paràmetres d'exactitud, precisió, sensibilitat, selectivitat i linealitat. Per determinar la recuperació i l'efecte matriu, es van seguir també les recomanacions de Matuszewski *et al.* (2003). L'anàlisi per HPLC-MS amb font d'ionització per APCI es considera un mètode

adequat per determinar compostos en matrius biològiques (Van Eeckhaut *et al.*, 2009). Tot i això, s'ha de tenir en compte que components de la matriu de la mostra que coelueixen amb els compostos d'interès poden interferir en el procés d'ionització, de forma que tant el poden potenciar, afavorint la detecció de l'anàlit, com inhibir, dificultant així l'anàlisi (Van Eeckhaut *et al.*, 2009). Aquest efecte es coneix com a “efecte matriu” i va ser descrit per primera vegada per Kerbarle i Tang (1993). Actualment es considera que en tota validació d'un mètode analític per HPLC-MS s'ha de tenir en compte l'efecte matriu, atès que pot influir per una banda, en la intensitat del senyal i de l'altra, en paràmetres com ara la recuperació (EMEA, 2011).

Seguint l'estratègia descrita per Matuszewski *et al.* (2003) s'ha obtingut una recuperació mitjana avaluada en 8 concentracions diferents del $95,0 \pm 1,2\%$ per a l'àcid maslínic i del $95,2 \pm 1,5\%$ per al patró intern. Aquests resultats suggereixen que els dos triterpens es comporten de forma similar a l'obtenir una recuperació semblant. A més, quan es calcula la recuperació de l'àcid maslínic pel mètode del patró intern, és a dir, calculant la raó de l'àrea obtinguda per l'anàlit respecte l'àrea obtinguda pel patró intern, la mitjana d'aquest valor augmenta fins el 99%. Per tant, la recuperació obtinguda indica que el mètode és capaç d'extreure de la matriu el màxim possible del compost d'interès superant el 95%, valor que es considera adequat (Bansal i DeStefano, 2007). Aquest valor de recuperació va ser similar a l'obtingut en la determinació de l'àcid ursòlic (99,4%) en plasma (Chen *et al.*, 2011) i superior a l'aconseguit en altres grups d'investigació per aquest mateix triterpè, ja que Xia *et al.* (2011) només van obtenir un 73,6% i Liao *et al.* (2005) un 83,5%. Seguidament es va establir l'efecte matriu, que per a l'àcid maslínic i pel patró intern ha presentat un valor mitjà de $23,6 \pm 3,6\%$ i $-13,2 \pm 1,7\%$, respectivament. En el desenvolupament d'un mètode analític fiable, la variabilitat observada en l'efecte matriu és més important que els valors en ells mateixos. En aquest sentit, l'àcid maslínic ha presentat una variabilitat, expressada com a desviació estàndard relativa, del 8,29% i el patró intern de l'11,1%. Aquests valors es troben per sota del 15% recomanat per la guia de validació EMEA (2011), indicant que l'efecte és constant i no compromet la quantificació de l'anàlit.

La sensibilitat del mètode indica que és adequat per a la identificació i la quantificació de l'àcid maslínic en plasma, ja que el LOD i el LLOQ es van establir en 2 i 5 nM, respectivament. El LOD obtingut és 100 vegades menor que l'aconseguit per Yin *et al.* (2012) en plasma de ratolí per HPLC-MS. Així mateix, el LLOQ del present mètode validat és menor que el d'altres triterpens pentacíclics en mostres de plasma, com l'indicat per als àcids boswelics, 11 nM i ursòlic, 22 nM (Reising *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2011). A més, el mètode analític és exacte ($<4,82\%$) i precís, tal com indiquen els valors obtinguts en la

precisió intra-dia i inter-dia que han estat inferiors a 5,45% i 8,38%, respectivament. Aquests valors es troben dins dels límits acceptables indicats en les guies de validació FDA (2001) i EMEA (2011), atès que estan per sota del 15%. Per últim, el mètode és lineal en el rang de concentracions entre 0,005 i 10 µM en presentar coeficients de correlació superiors a 0,997.

Un cop validat el mètode analític es va verificar mitjançant l'administració a rates per via oral de 10, 25 i 50 mg/kg d'àcid maslínic. Per tal de demostrar la seva aplicabilitat en l'anàlisi de farmacocinètica del triterpè, s'han recollit mostres de sang a les 24 h, en què s'esperen concentracions baixes de l'anàlit. Es va observar un augment de les concentracions plasmàtiques d'acord amb la dosi administrada, obtenint resultats per sobre del LLOQ que van ser de 10,8; 20,2 i 39,3 nM a les dosis de 10, 25 i 50 mg/kg, respectivament. Per tant, el mètode desenvolupat és capaç de mesurar l'àcid maslínic de forma exacta, precisa i reproducible amb una elevada sensibilitat.

Un cop desenvolupat i validat el mètode per determinar l'àcid maslínic en plasma de rata i abans de realitzar l'estudi farmacocinètic per conèixer la seva biodisponibilitat, es va realitzar un estudi per saber si aquest triterpè pentacíclic tenia efectes adversos sobre la salut. En conseqüència, el segon objectiu de la present tesi va ser avaluar l'efecte de la ingesta d'àcid maslínic a dosis elevades en ratolins Swiss CD1. En primer lloc s'ha realitzat l'estudi de la toxicitat aguda que va consistir en l'administració oral d'una dosi única de 1000 mg/kg d'àcid maslínic seguit d'un període d'observació de quinze dies, tal com indica la OECD (OECD, 2008). En les condicions experimentals descrites l'àcid maslínic va demostrar la seva innocuïtat atesa l'absència de símptomes de reacció adversa, la manca d'impacte negatiu en el creixement durant el període d'observació i l'aspecte normal dels òrgans vitals en el moment de la necròpsia.

L'estudi de la toxicitat subaguda es va portar a terme administrant diàriament 50 mg/kg d'àcid maslínic per via oral durant 28 dies. La dosi a administrar va ser seleccionada tenint en compte que l'oli d'oliva i les olives són uns aliments consumits de forma habitual a la dieta mediterrània. Assumint que la concentració mitjana d'àcid maslínic present en les olives de taula comercials i l'oli d'oliva verge és de 553 mg/kg (Romero *et al.*, 2010) i 194 mg/kg (Pérez-Camino i Cert, 1999), respectivament, i que el consum diari d'aquests aliments és de 10 olives mitjanes i 33 g d'oli d'oliva, la ingesta diària d'àcid maslínic sota aquestes condicions és d'aproximadament 0,4 mg/kg. Per tant, es va triar una dosi al voltant de 125 vegades superior de l'estimat per tal de proporcionar un marge de seguretat suficientment gran.

L'administració oral diària d'aquest triterpè pentacíclic no va provocar cap signe de toxicitat, com ara piloerecció, alteració de la marxa o mortalitat, durant els 28 dies de tractament. No es va observar cap diferència significativa entre grups pel que fa al consum de l'aigua de beguda, però sí que es va observar una disminució del 13% ($p=0.0004$) de la ingesta de pinso en el grup administrat amb àcid maslínic en comparació amb el grup control. En ratolins KK-A^y, que són un model animal de diabetis de tipus 2, l'administració d'àcid maslínic a les dosis de 10 i 30 mg/kg durant 2 setmanes va reduir el consum de pinso en un 28% i un 34%, respectivament, en comparació al grup control (Liu *et al.*, 2007a). També s'ha descrit una menor ingesta d'aliment (18%) en dorades alimentades durant 210 dies amb àcid maslínic. En el nostre estudi, la disminució del consum d'aliment no va afectar ni al pes corporal, ni a l'índex de conversió dels aliments. A la literatura, no existeix informació sobre l'efecte de l'àcid maslínic en ratolins sans, ja que les dades que es tenen, corresponen a models animals en què el pes corporal és una variable (Liu *et al.*, 2007a, Li *et al.*, 2010). En canvi, sí existeix informació en altres espècies animals. En aquest sentit, no es van observar diferències significatives en el pes corporal de rates Wistar tractades durant una setmana amb una dosi de 15 mg/kg d'àcid maslínic (Hussain-Shaik *et al.*, 2012). Ara bé, sí que s'ha descrit que l'àcid maslínic indueix un augment del pes en peixos sans, com ara la truita (Fernández-Navarro *et al.*, 2008) i la dorada (Rufino-Palomares *et al.*, 2011) i per aquest motiu s'ha proposat com additiu alimentari en aqüicultura.

L'estudi de les magnituds hematològiques i bioquímiques després de l'administració oral de 50 mg/kg d'àcid maslínic durant 28 dies no presenta diferències significatives entre el grup control i el grup tractat, indicant que l'administració d'aquest triterpè no té efectes adversos. La concentració de glucosa en sang no es va veure afectada pel tractament, en concordança amb els resultats descrits prèviament en ratolins sans per Tang *et al.* (2008). En aquest sentit, i en experiments emprant rates sanes, Khathi *et al.* (2013) no van observar canvis en la concentració de glucosa postprandial mesurats després de l'administració d'una càrrega de carbohidrats juntament amb 80 mg/kg d'àcid maslínic. En canvi, aquest triterpè s'ha descrit com a hipoglucemiant en models animals d'hiperglucèmia (Liu *et al.*, 2007b; Tang *et al.*, 2008). Referent al perfil lipídic, l'administració repetida d'àcid maslínic (50 mg/kg) durant 28 dies no afecta el colesterol, els triglicèrids i l'HDL. Aquests resultats es troben en concordança amb els obtinguts per Hussain-Shaik *et al.* (2012) després d'administrar 15 mg/kg d'àcid maslínic a rates sanes. En canvi, l'administració oral diària de 100 mg/kg d'àcid maslínic durant 15 dies a rates Sprague-Dawley alimentades amb una dieta rica en colesterol durant 30 dies va normalitzar els valors de colesterol total, triglicèrids, HDL i LDL (Liu *et al.*, 2007b),

suggerint que aquest compost presenta un efecte terapèutic en la hiperlipidèmia causada per la dieta rica en colesterol.

La funció hepàtica es va avaluar mesurant l'enzim alanina-aminotransferasa, el qual no ha mostrat diferències significatives entre el grup tractat i el grup control, suggerint l'absència d'efectes adversos en el fetge induïts per l'àcid maslínic. Aquests resultats coincideixen amb els observats per Liu *et al.* (2007a) i per Hussain-Shaik *et al.* (2012), que tampoc van trobar alteracions en l'enzim alanina-aminotransferasa després de l'administració oral diària d'àcid maslínic. La funció renal tampoc s'ha vist afectada atès que els nivells plasmàtics de creatinina i urea no estaven alterats. A més, els valors obtinguts en l'anàlisi dels electròlits a sang no van ser diferents entre ambdós grups.

L'examen dels òrgans vitals realitzats a l'autòpsia no va mostrar diferències significatives entre el grup control i el grup administrat amb àcid maslínic. Només el cervell dels animals del grup tractat va presentar un pes major que el del grup control amb un increment de l'11 %. Tot i així, canvis en el pes relatiu del cervell rarament està associat amb neurotoxicitat (Sellers *et al.*, 2007). D'altra banda, l'estudi histopatològic dels òrgans no ha presentat diferències significatives entre ambdós grups demostrant l'absència d'efectes adversos.

En observar a l'estudi toxicològic que l'àcid maslínic no produïa efectes adversos i disposant d'una tècnica validada per mesurar el triterpè en plasma, es va plantejar com a següent objectiu l'anàlisi farmacocinètica de les concentracions plasmàtiques de l'àcid maslínic, ja que els efectes beneficiosos per a la salut descrits per aquest compost depenen de la concentració que s'assoleix en sang. Per tal de dur a terme l'estudi farmacocinètic, l'àcid maslínic va ser administrat a rates Sprague-Dawley per via oral (50 mg/kg) i via intravenosa (1 mg/kg). Les concentracions plasmàtiques obtingudes es van analitzar de forma simultània mitjançant una aproximació poblacional emprant el programa NONMEM. Fins ara, els estudis realitzats amb altres triterpens pentacíclics (Udeani *et al.*, 1999; Jeong *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011) han seguit una farmacocinètica clàssica que només permet analitzar concentracions plasmàtiques respecte el temps i totes les dades s'han d'extreure del mateix animal. En canvi, l'aproximació poblacional permet analitzar poblacions amb poques dades que procedeixen de diferents individus i estimar els paràmetres típics farmacocinètics, la variabilitat interindividual associada així com la variabilitat residual, tot preservant la individualitat dels perfils de concentracions plasmàtiques representats respecte el temps. Així mateix, l'anàlisi poblacional realitzat amb el programa NONMEM permet incorporar l'escalat entre espècies en el disseny del model, fet que possibilita poder extrapolar i predir els nivells plasmàtics i de distribució

d'un compost en l'home a partir de dades obtingudes amb animals (Jolling *et al.*, 2005). Per això, i seguint una aproximació al·lomètrica, es va incorporar el pes corporal (70 kg) en el model base, a més d'exponents al·lomètrics fixats. Aquesta aproximació al·lomètrica, encara que empírica, constitueix una eina valuosa en el procés de desenvolupament d'un nutricèutic, ja que ajuda a estimar la possible dosi i els marges de seguretat abans dels estudis en humans (Kang *et al.*, 2011).

El desenvolupament del model farmacocinètic s'ha basat en l'aplicació d'eines estadístiques que han permès calcular la bondat de l'ajust, la precisió dels paràmetres estimats i el valor mínim de la funció objectiva (MOFV) per tal de seleccionar el model que millor ajusti les concentracions plasmàtiques de l'àcid maslínic. Durant el procés, es va valorar un model tricompartmental atesa la gran diferència entre les concentracions plasmàtiques dels temps inicials i finals de l'administració intravenosa. Però les concentracions d'àcid maslínic en plasma a les 8, 10 i 12 h després d'aquesta administració no es van incloure perquè estaven per sota del LLOQ. Per aquest motiu, el model que descrivia millor les dades i presentava la millor funció objectiva va ser un model bicompartimental amb absorció de primer ordre i procés d'eliminació lineal.

El model final es va validar emprant la comprovació visual predictiva corregida per les prediccions típiques del model (pcVPC, acrònim en anglès de prediction-corrected Visual Predictive Check). La representació de les dades individuals respecte a les predites pel model va indicar que aquest descrivia adequadament els resultats experimentals obtinguts. La tècnica de validació interna aplicada va demostrar que el model era capaç de predir d'una manera adient els percentils 5%, 50% i 95% de les dades observades, tot indicant que el model és robust.

L'anàlisi dels paràmetres farmacocinètics obtinguts permeten establir, a través de la constant d'absorció ($k_a = 0,52$ 1/h) i el temps al qual s'assoleix la concentració màxima ($T_{max} = 0,51$ h), que l'àcid maslínic presenta un procés d'absorció oral relativament ràpid. D'altres triterpens pentacíclics com l'àcid ursòlic (Chen *et al.*, 2011) i l'àcid oleanòlic (Jeong *et al.*, 2007) també presenten valors de T_{max} similars (0,42 h i 0,35 h, respectivament) en ser administrats en rata. La biodisponibilitat, que informa sobre la fracció del compost d'estudi que aconsegueix arribar a la sang després de la seva administració, és del 5,13% per a l'àcid maslínic. Resultats similars d'aquest paràmetre es van observar per altres triterpens pentacíclics com l'àcid oleanòlic (Jeong *et al.*, 2007) i l'àcid hidroxibetulínic (Yang *et al.*, 2005) amb valors de 0,7% i 2,3%, respectivament. Si la biodisponibilitat és baixa, com és el cas de l'àcid maslínic, es pot atribuir a diferents motius. Un d'ells és l'efecte de primer pas, que consisteix en metabolitzar el compost

d'estudi a nivell de fetge i/o paret intestinal, evitant el seu pas cap a la circulació sanguínia. Per contra, una absorció gastrointestinal petita també podria ser la causa d'una baixa biodisponibilitat. Si el darrer cas tingués lloc, grans quantitats d'àcid maslínic romandrien a l'intestí, convertint-lo així en l'òrgan diana on el triterpè pentacíclic podria exercir la seva activitat protectora contra el càncer de colon (Juan *et al.*, 2008), tal com s'ha descrit per altres components bioactius dels aliments com ara el *trans*-resveratrol (Planas *et al.*, 2012; Juan *et al.*, 2012).

Un cop es troba l'àcid maslínic a l'interior de l'organisme, les constants farmacocinètiques que caracteritzen la seva distribució són el volum de distribució al compartiment central (V_c) referent a la circulació sistèmica i el volum de distribució al compartiment perifèric (V_p) relatiu al conjunt de teixits on l'àcid maslínic pot ser distribuït. Els resultats obtinguts per a la població estudiada, rates Sprague-Dawley, van ser de 0,120 L/kg pel V_c i de 0,908 L/kg pel V_p . Aquests resultats suggereixen una distribució progressiva de l'àcid maslínic al llarg del temps cap als teixits a causa del fet que el volum de distribució total (1,028 L/kg) és major que el volum total de l'aigua corporal a la rata (0,668 L/kg). Resultats similars s'han observat per a l'àcid oleanòlic (Jeong *et al.*, 2007). A més, la constant de velocitat de transferència del compartiment perifèric al central (k_{21}) va ser de 7 a 8 vegades més baixa que la constant de velocitat de transferència del compartiment central al perifèric (k_{12}). Això indica que l'arribada d'àcid maslínic als teixits és més ràpida que el seu retorn a la circulació sanguínia. D'altra banda, es pot concloure que les concentracions plasmàtiques de l'àcid maslínic segueixen una caiguda biexponencial tenint en compte que la constant de velocitat de disposició ràpida (α) va presentar un valor 67,6 vegades superior a la constant de velocitat de disposició lenta (β).

L'aclariment indica la capacitat de l'organisme per eliminar un compost de la sang. En el cas de l'àcid maslínic s'ha estimat un aclariment mitjà de 0,455 L/h/kg, sent un valor baix. Si es té en compte el flux de sang renal en la rata (2,21 L/h/kg), l'aclariment de l'àcid maslínic representa menys d'una cinquena part d'aquest, fet que suggereix que l'excreció renal d'aquest triterpè pentacíclic es dona de forma relativament lenta. Ara bé, l'aclariment obtingut també podria ser explicat per un baix metabolisme hepàtic.

Finalment, i com a comprovació addicional, es van comparar les constants obtingudes per l'aproximació poblacional amb les calculades pel model no compartimental amb el software WinNonlin. Aquesta darrera anàlisi permet estimar paràmetres farmacocinètics sense haver d'ajustar-se a un model determinat. Ara bé, es van observar discrepàncies en la concentració a temps 0 (C_0) i la semivida ($t_{1/2}$), que es podrien atribuir a la falta de concentracions plasmàtiques disponibles a partir de les 8 h després de l'administració

intravenosa. Tot i així, la majoria dels paràmetres farmacocinètics estudiats, com ara la biodisponibilitat oral absoluta, el volum de distribució total i l'aclariment obtinguts per l'aproximació poblacional van presentar resultats similars als calculats per l'anàlisi no compartimental, demostrant que el model desenvolupat descriu correctament les dades.

L'estudi farmacocinètic de l'àcid maslínic mostra una limitada biodisponibilitat, que pot ser deguda a una absorció intestinal incompleta o a un elevat metabolisme, tot i que l'aclariment obtingut suggereix una baixa biotransformació a nivell hepàtic. Per aquest motiu, el darrer objectiu d'aquesta memòria va consistir en identificar i quantificar els metabòlits de l'àcid maslínic en plasma i orina després de la seva administració oral a rates. La caracterització dels metabòlits d'un compost, a més d'ampliar el coneixement sobre la biodisponibilitat, també és important atès que els derivats podrien presentar activitats biològiques amb efectes terapèutics i/o efectes tòxics.

Els compostos bioactius que provenen de la dieta es poden metabolitzar mitjançant transformacions de fase I i fase II. Les primeres es basen en oxidacions, reduccions i hidròlisis, mentre que les segones es basen en glucuronitzacions, sulfatacions, metilacions, acetilacions i conjugacions amb glutatió (Testa i Krämer, 2006; Holcapek *et al.*, 2008). Per a l'estudi dels metabòlits de l'àcid maslínic es van analitzar els cromatogrames de les mostres de plasma i orina injectades a l'HPLC-LTQ-Orbitrap-MS tant manualment amb el programa Xcalibur Qual Browser com de forma automàtica a través del software Metworks. A les mostres de plasma i orina obtingudes 45 min després de l'administració de 50 mg/kg d'àcid maslínic només es van trobar metabòlits procedents de transformacions de fase I. En les mostres analitzades es van detectar 7 metabòlits de l'àcid maslínic, 4 metabòlits monohidroxilats (M1-M4), 1 metabòlit monohidroxilat i deshidrogenat (M5) i 2 metabòlits dihidroxilats i deshidrogenats (M6, M7). Tots ells van ser identificats en plasma però només l'M1, M4, M5 i M6 s'han detectat en orina. Així mateix, en cap de les matrius analitzades es van identificar derivats que presentessin únicament una doble hidroxilació o solament una deshidrogenació.

La hidroxilació de l'àcid maslínic va donar lloc en plasma a 4 metabòlits que van presentar una massa 15.9949 Da superior a la del compost pare. Tot i que actualment no es disposa d'informació sobre la biotransformació de l'àcid maslínic *in vivo*, sí que s'han realitzat investigacions *in vitro* sobre les transformacions microbianes del triterpè, com ara l'estudi dut a terme per Feng *et al.* (2012) amb *Cunninghamella blakesleana* o el de Martínez *et al.* (2013) amb *Rhizomucor miehei*. Aquests autors van observar també l'addició de grups hidroxil a la molècula d'aquest compost bioactiu. Així, Feng *et al.* (2012) va descriure tres metabòlits monohidroxilats diferents en què el grup hidroxil

s'incorporava al carboni 7, al carboni 13 o al carboni 15 de la molècula amb la migració d'un doble enllaç. Martínez *et al.* (2013) va observar un metabòlit monohidroxilat però, en aquest cas, el grup hidroxil es va afegir al grup metil angular de la posició 30. Si es consideren els resultats publicats tant per Feng *et al.* (2012) com per Martínez *et al.* (2013), els quatre isòmers identificats del metabòlit monohidroxilat de l'àcid maslínic (M1–M4) podrien haver incorporat els grups hidroxils a les posicions 7, 13, 15 i 30.

L'addició d'un grup hidroxil ha estat descrita *in vivo* per a altres triterpens pentacíclics (Krüger *et al.*, 2008). Després de l'administració d'una suspensió de 12,5 mg/kg de l'àcid 11-ceto- β -boswellic a rates Wistar albines femelles, es van identificar en plasma dos derivats monohidroxilats de l'àcid boswellic (Krüger *et al.*, 2008). Diferents estudis realitzats *in vitro* amb àcids boswellics, àcid oleanòlic i àcid ursòlic també mostren derivats hidroxilats (Gerbeth *et al.*, 2013; Krüger *et al.*, 2008; Jeong *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2011). La incubació dels àcids α - i β boswellics i de l'àcid 11-ceto- β -boswellic en microsomes de fetge de rata (Gerbeth *et al.*, 2013; Krüger *et al.*, 2008) presenten derivats monohidroxilats. Els mateixos resultats es van descriure per a l'àcid oleanòlic, en microsomes de fetge de rata, i per a l'àcid ursòlic, després d'una transformació microbiana amb fongs de *H. serrata* (Jeong *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2011). Aquests resultats confirmen que la hidroxilació és una de les principals rutes metabòliques dels triterpens pentacíclics.

A més dels derivats monohidroxilats de l'àcid maslínic, també es va identificar un metabòlit monohidroxilat i deshidrogenat (M5) en què la pèrdua dels 2 hidrògens de la molècula és compatible amb la oxidació d'un alcohol secundari a una cetona. Encara que aquesta reacció no ha estat descrita prèviament per a l'àcid maslínic, sí que s'ha observat en altres triterpens pentacíclics en experiments *in vitro*, com ara la incubació de l'àcid betulínic amb *Bacillus megaterium* ATCC 13368 (Chatterjee *et al.*, 2000) i amb el fong *Colletotrichum* (Bastos *et al.*, 2007) així com la incubació dels àcids boswellics amb microsomes de fetge de rata (Krüger *et al.*, 2008).

Finalment, es van identificar dos metabòlits (M6 i M7) que presentaven una massa superior a la de l'àcid maslínic en 29.9442 Da, que corresponen a l'addició de dos grups hidroxils seguits d'una oxidació d'un alcohol secundari en cetona. Aquest metabòlit també ha estat descrit per a l'àcid ursòlic després de la incubació amb *Pestalotiopsis microspora* (Fu *et al.*, 2011) així com per als àcids boswellics (Krüger *et al.*, 2008).

Després de la identificació en plasma i orina per l'HPLC-LTQ-Orbitrap-MS dels metabòlits de l'àcid maslínic, aquests derivats es van quantificar per tal de conèixer el grau de transformació metabòlica del triterpè. La concentració obtinguda en plasma als 45 min de

l'administració oral de l'àcid maslínic va ser de 4,83 μM pel triterpè, mentre que les concentracions observades relatives als metabòlits van ser menors i en cap cas van superar els 0,8 μM . D'aquesta manera, el compost pare representava el 81,8% mentre que els metabòlits només el 18,2%. El principal derivat en plasma va ser l'M5 (13,2%), seguit dels metabòlits monohidroxilats de l'àcid maslínic (M1, M2, M4 i M3) els quals representaven el 4,47%, i dels derivats M6 i M7 que només arribaven al 0,60%. Els metabòlits identificats en orina també van ser quantificats emprant el mètode prèviament desenvolupat pel plasma (Sánchez-González *et al.*, 2013). Aquest va ser validat per a la nova matriu demostrant ser lineal, precís, exacte, sense efecte matriu i amb una recuperació mitjana del $97,6 \pm 1,6\%$. En orina, a l'igual que en plasma, l'àcid maslínic va ser el component majoritari representant el 74%. Els metabòlits trobats en aquesta matriu no van superar la concentració d'1 μM i van presentar un perfil diferent al del plasma. El derivat majoritari va ser l'M1 representant el 20% mentre que l'M5 només va representar el 4%. Els resultats obtinguts a la quantificació dels metabòlits en plasma i en orina permeten descartar el metabolisme com a principal causa de la baixa biodisponibilitat observada per a l'àcid maslínic, i corroboren el valor obtingut per l'aclariment plasmàtic, que s'havia associat a un metabolisme hepàtic limitat.

L'estudi de l'àcid maslínic realitzat en la present tesi ha permès ampliar els coneixements sobre aquest triterpè pentacíclic. S'ha demostrat que el consum diari d'àcid maslínic durant 28 dies no presenta efectes adversos a la dosi de 50 mg/kg així com tampoc l'administració única del triterpè a 1000 mg/kg per via oral. D'altra banda, s'ha desenvolupat i validat un mètode per poder determinar l'àcid maslínic en plasma mitjançant l'HPLC-MS, fet que ha permès realitzar l'estudi farmacocinètic del triterpè seguint una aproximació poblacional, amb el qual s'han ajustat les concentracions plasmàtiques a un model bicompartimental amb cinètiques d'absorció i eliminació de primer ordre. Aquest estudi ha demostrat que l'àcid maslínic presenta una absorció relativament ràpida amb una biodisponibilitat petita i una distribució a teixits extensa i progressiva al llarg del temps. El baix aclariment obtingut ha donat lloc a una semivida llarga. L'estudi de la biotransformació de l'àcid maslínic *in vivo* ha posat de manifest un metabolisme baix derivat únicament de reaccions de fase I. S'han identificat 7 metabòlits en plasma, dels quals 4 també es trobaven a l'orina, sent l'àcid maslínic el principal component en ambdues matrius. Els resultats obtinguts de la present tesi proporcionen nous coneixements sobre l'àcid maslínic i donen un pas més en el seu futur desenvolupament com a nutricèutic.

V. CONCLUSIONS



L'anàlisi dels resultats obtinguts en la present memòria permet obtenir les següents conclusions, que s'han desglossat segons els objectius plantejats.

CAPÍTOL 1. Posada a punt i validació d'un mètode per a la determinació de l'àcid maslínic en plasma

- S'han estudiat diferents modificadors de la fase mòbil (àcid acètic, àcid fòrmic, acetat d'amoni), fonts d'ionització (ESI i APCI) i modes d'adquisició de dades (MRM i SIM) per tal d'aconseguir la màxima ionització de l'àcid maslínic i així obtenir una detecció amb el màxim senyal. La font d'ionització per APCI a 500°C, l'analitzador de masses quadrupol senzill i l'adquisició de dades en SIM i mode negatiu han estat les òptimes per aconseguir la màxima sensibilitat.
- S'ha establert un mètode per determinar l'àcid maslínic en plasma de rata que inclou l'extracció amb acetat d'etil seguit de l'anàlisi per HPLC-MS. La validació del mètode indica que és selectiu, sensible, precís i reproduïble d'acord amb els resultats obtinguts en el rang de concentracions de 0,05 a 10 µM.
- L'aplicació del mètode validat ha permès la identificació i quantificació de l'àcid maslínic en plasma de rates Sprague-Dawley 24 h després de l'administració de 10, 25 i 50 mg/kg d'àcid maslínic per via oral, demostrant la seva idoneïtat per ser aplicat a estudis de farmacocinètica.

CAPÍTOL 2. Estudi toxicològic de l'àcid maslínic

- L'administració oral única d'1 g/kg d'àcid maslínic a ratolins Swiss CD1 no presenta efectes adversos.
- L'administració oral diària de 50 mg/kg d'àcid maslínic durant 28 dies no induïx diferències en el pes corporal ni en l'eficiència de conversió de l'aliment dels animals d'ambdós grups.
- L'anàlisi de les magnituds hematològiques i bioquímiques clíniques, així com l'estudi anatomopatològic, no han mostrat cap efecte de rellevància toxicològica després de l'administració oral de 50 mg/kg durant 28 dies. Els resultats obtinguts indiquen l'ampli marge de seguretat de l'àcid maslínic per ser emprat en futurs estudis com a un possible nutricional.

CAPÍTOL 3. Desenvolupament d'un model farmacocinètic de l'àcid maslínic seguint una aproximació poblacional

- S'ha desenvolupat un model de farmacocinètica poblacional per a l'àcid maslínic que permet l'extrapolació en humans seguint una aproximació al·lomètrica. Aquest model, que descriu les concentracions plasmàtiques obtingudes després de l'administració oral i intravenosa d'aquest triterpè pentacíclic, es caracteritza per ser bicompartimental amb absorció de primer ordre i eliminació lineal.
- L'estudi farmacocinètic de l'àcid maslínic indica una absorció relativament ràpida ($K_a = 0,52 \text{ 1/h}$) assolint la concentració plasmàtica màxima de $4,03 \mu\text{M}$ als 30 minuts amb una biodisponibilitat del 5,13%.
- Un cop ha arribat al torrent sanguini, l'àcid maslínic es distribueix extensament als teixits, segons indiquen els volums de distribució central ($8,41 \text{ L/70 kg}$) i perifèric ($63,6 \text{ L/70 kg}$). L'aclariment de l'àcid maslínic (8 L/h/70 kg) suggereix un metabolisme hepàtic i renal baix, així com l'eliminació per orina en forma majoritàriament inalterada.
- El model desenvolupat constitueix un primer pas per a futurs estudis de farmacocinètica/farmacodinàmica que permetin establir pautes d'administració eficaces de l'àcid maslínic com a nutricional.

CAPÍTOL 4. Identificació i quantificació dels metabòlits de l'àcid maslínic en plasma i orina de rata

- S'han identificat per primera vegada els metabòlits de l'àcid maslínic en plasma i orina després de la seva administració oral. Els resultats indiquen que el triterpè està sotmès a metabolisme de fase I, mitjançant reaccions d'hidroxilació i oxidació, i que no pateix biotransformacions de fase II.
- S'han detectat un total de 7 metabòlits en plasma, 4 derivats monohidroxilats (M1, M2, M3 i M4), 1 derivat monohidroxilat i deshidrogenat (M5) i 2 derivats dihidroxilats i deshidrogenats (M5 i M6). Només els metabòlits M1, M4, M5 i M6 s'han identificat en orina i l'àcid maslínic ha estat el compost principal en ambdues matrius.
- Aquest estudi proporciona nova informació sobre el metabolisme de l'àcid maslínic dins l'organisme ampliant el coneixement sobre la biodisponibilitat d'aquest compost bioactiu.

VI. BIBLIOGRAFIA

Acebey-Castellon IL, Voutquenne-Nazabadioko L, Doan Thi Mai H, Roseau N, Bouthagane N, Muhammad D, Le Magrex Debar E, Gangloff SC, Litaudon M, Sevenet T, Hung NV, Lavaud C. Triterpenoid saponins from *Symplocos lancifolia*. *J Nat Prod*. 2011; 74:163-8.

Adnyana IK, Setiawan F, Insanu M. From ethnopharmacology to clinical study of *Orthosiphon stamineus* benth. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2013; 5:66-73. Review.

Agencia para el Aceite de Oliva [seu Web] Madrid: Agencia para el Aceite de Oliva; [acces 10 de maig de 2014]. Información del sector – La calidad de nuestros aceites [2 pantallas aproximadament]. Disponible en: http://aplicaciones.magrama.es/pwAgenciaAO/CalidadAceites.aao?opcion_seleccionada=2200&control_acceso=S&idioma=ESP

Alarcón de la Lastra C, Barranco MD, Motilva V, Herrerías JM. Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. *Curr Pharm Des*. 2001; 7(10):933-50. Review.

Alexandraki V, Georgalaki M, Papadimitriou K, Anastasiou R, Zoumpopoulou G, Chatzipavlidis J, Papadelli M, Vallis N, Moschochoritis K, Tsakalidou E. Determination of triterpenic acids in natural and alkaline-treated Greek table olives throughout the fermentation process. *LWT-Food Sci Technol*. 2014; 58:609-13.

Allouche Y, Beltrán G, Gaforio JJ, Uceda M, Mesa MD. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48:2885-90.

Allouche Y, Jiménez A, Uceda M, Aguilera MP, Gaforio JJ, Beltrán G. Triterpenic content and chemometric analysis of virgin olive oils from forty olive cultivars. *J Agric Food Chem*. 2009; 57(9):3604-10.

Allouche Y, Warleta F, Campos M, Sánchez-Quesada C, Uceda M, Beltrán G, Gaforio JJ. Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic capacities of pentacyclic triterpenes found in the skin of olives on MCF-7 human breast cancer cells and their effects on DNA damage. *J Agric Food Chem*. 2011; 59:121-30.

Alqahtani A, Hamid K, Kam A, Wong KH, Abdelhak Z, Razmovski-Naumovski V, Chan K, Li KM, Groundwater PW, Li GQ. The pentacyclic triterpenoids in herbal medicines and their pharmacological activities in diabetes and diabetic complications. *Curr Med Chem*. 2013; 20:908-31.

Armijo JA. Farmacocinética: absorción, distribución y eliminación de los fármacos. Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. *Farmacología Humana*, 3ª edición. Barcelona: Masson; 1997. p. 47-72.

Bibliografía

Bansal S, DeStefano A. Key elements of bioanalytical method validation for small molecules. *AAPS J.* 2007; 9:E109-14.

Barranco-Garduño LM, Neri-Salvador JC, Leon-Molina H, Carrasco-Portugal MC, Flores-Murrieta FJ, Patinño-Camacho SI. La farmacocinético poblacional y su importancia en la terapéutica. *Med Int Mex.* 2011; 27:370-377.

Barros L, Carvalho AM, Ferreira IC. Comparing the composition and bioactivity of *Crataegus Monogyna* flowers and fruits used in folk medicine. *Phytochem Anal.* 2011; 22:181-8.

Bastos DZ, Pimentel IC, de Jesus DA, de Oliveira BH. Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi. *Phytochemistry.* 2007; 68:834-9.

Bender N, Portmann M, Heg Z, Hofmann K, Zwahlen M, Egger M. Fish or n3-PUFA intake and body composition: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2014; 15:657-65.

Benedetti MS, Whomsley R, Poggesi I, Cawello W, Mathy FX, Delporte ML, Papeleu P, Watelet JB. Drug metabolism and pharmacokinetics. *Drug Metab Rev.* 2009; 41:344-90.

Bermudez B, Lopez S, Ortega A, Varela LM, Pacheco YM, Abia R, Muriana FJ. Oleic acid in olive oil: from a metabolic framework toward a clinical perspective. *Curr Pharm Des.* 2011; 17:831-43.

Bianchi G, Murelli C, Vlahov G. Surface waxes from olives fruits. *Phytochemistry.* 1992;31:3503-06.

Bianchi G. Lipids and phenols in table olives. *Eur J Lipid Sci. Technol.* 2003; 105:229–242.

Bolòs O de, Vigo J, Masalles RM, Ninot JM. *Flora manual dels Països Catalans.* 2^a ed. Barcelona: Pòrtic; 1993.

Buckland G, Agudo A, Travier N, Huerta JM, Cirera L, Tormo MJ, Navarro C, Chirlaque MD, Moreno-Iribas C, Ardanaz E, Barricarte A, Etxeberria J, Marin P, Quirós JR, Redondo ML, Larrañaga N, Amiano P, Dorronsoro M, Arriola L, Basterretxea M, Sanchez MJ, Molina E, González CA. Adherence to the Mediterranean diet reduces mortality in the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain). *Br J Nutr.* 2011; 106:1581-91.

Caligiani A, Malavasi G, Palla G, Marseglia A, Tognolini M, Bruni R. A simple GC-MS method for the screening of betulinic, corosolic, maslinic, oleanolic and ursolic acid

contents in commercial botanicals used as food supplement ingredients. *Food Chem.* 2013; 136:735-41.

Calvo Dúo R, Suárez González E, Rodríguez Calvo M, Leal Eguiluz N. Farmacocinética: absorción, distribución y eliminación. Hernández G, Moreno A, Zaragoza F, Porras A. Tratado de medicina farmacéutica. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011. p. 63-78.

Calvo Malvar M, Benítez Estévez AJ. Papel de los modelos farmacocinéticos de población. Revisión de métodos. *Quím Clín.* 2004; 23:417-422.

Cano-Cebrián MJ, Zornoza T, Granero L, Polache A. Intestinal absorption enhancement via the paracellular route by fatty acids, chitosans and others: a target for drug delivery. *Curr Drug Deliv.* 2005; 2:9-22.

Chan LM, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci.* 2004; 21:25-51.

Chatterjee P, Kouzi SA, Pezzuto JM, Hamann MT. Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66:3850-5.

Chen Q, Luo S, Zhang Y, Chen Z. Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of ursolic acid in rat plasma and tissue: application to the pharmacokinetic and tissue distribution study. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 399:2877-84.

Cheng X, Shin YG, Levine BS, Smith AC, Tomaszewski JE, van Breemen RB. Quantitative analysis of betulinic acid in mouse, rat and dog plasma using electrospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003; 17:2089-92.

Community herbal monograph on *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng, folium [Internet]. London: European Medicines Agency (EMA); 2012 [acceso el 3 de juny de 2014]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2011/04/WC500105350.pdf

De Pablos LM, Dos Santos MF, Montero E, García-Granados A, Parra A, Osuna A. Anticoccidial activity of maslinic acid against infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Parasitol Res.* 2010b; 107:601-4.

De Pablos LM, González G, Rodríguez R, García-Granados A, Parra A, Osuna A. Action of a pentacyclic triterpenoid, maslinic acid, against *Toxoplasma gondii*. *J Nat Prod.* 2010a; 73:831-4.

Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F. Olive oil and haemostasis: platelet function, thrombogenesis and fibrinolysis. *Curr Pharm Des.* 2011; 17:778-85.

Dhillon S, Gill K. Basic pharmacokinetics. Dhillon S, Kostrzewski A. *Clinical pharmacokinetics.* London: Pharmaceutical Press; 2006.

Di L, Umland JP, Chang G, Huang Y, Lin Z, Scott DO, Troutman MD, Liston TE. Species independence in brain tissue binding using brain homogenates. *Drug Metab Dispos.* 2011; 39:1270-7.

Diccionari enciclopèdic de medicina [Internet]. Barcelona: Enciclopèdia Catalana, cop. 1997-2007. [accés 10 de juny de 2014] Disponible en: <http://www.medic.cat/>

Dietrich CG, Geier A, Oude Elferink RP. ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut.* 2003; 52:1788-95.

Ding L, Huang X, Yang J, Bian X, Zhang Z, Liu G. Determination of glycyrrhetic acid in human plasma by LC-ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; 40:758-62.

Doménech Berrozpe J, Díez Martín I, Peraire Guitart C. Administración extravasal: aproximación compartimental. Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Peraire Guitart C. *Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética. Vol. I, LADME. Análisis farmacocinético. Biodisponibilidad y bioequivalencia.* Madrid: Editorial Síntesis; 2013b. p. 299-308.

Doménech Berrozpe J, Lauroba Viladrosa J, Cendrós Carreras JM. Administración de bolus intravenoso: modelo independiente. Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Peraire Guitart C. *Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética. Vol. I, LADME. Análisis farmacocinético. Biodisponibilidad y bioequivalencia.* Madrid: Editorial Síntesis; 2013a. p. 215-216.

Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J. Fundamentos de la biofarmacia y la farmacocinética. Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Peraire Guitart C. *Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética. Vol. I, LADME. Análisis farmacocinético. Biodisponibilidad y bioequivalencia.* Madrid: Editorial Síntesis; 2013. p. 43-49.

Dongmo AB, Azebaze AG, Donfack FM, Dimo T, Nkeng-Efouet PA, Devkota KP, Sontia B, Wagner H, Sewald N, Vierling W. Pentacyclic triterpenoids and ceramide mediate the vasorelaxant activity of *Vitex cienkowskii* via involvement of NO/cGMP pathway in isolated rat aortic rings. *J Ethnopharmacol.* 2011; 133:204-212.

Ette EI, Williams PJ. Population pharmacokinetics I: background, concepts, and models. *Ann Pharmacother.* 2004; 38:1702-1706.

Escrich E, Solanas M, Moral R. Olive oil and other dietary lipids in breast cancer. *Cancer Treat Res.* 2014; 159:289-309.

Fan J, de Lannoy IA. Pharmacokinetics. *Biochem Pharmacol.* 2014; 87:93-120.

Feng X, Luan J, Guo FF, Li DP, Chu ZY. Microbial transformation of maslinic acid by *Cunninghamella blakesleana*. *J Mol Catal B Enzym.* 2012; 82:127-30.

Fernández de Trocóniz I, Cendrós Carreras JM, Colom Codina H. Farmacocinética poblacional. Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Peraire Guitart C. Tratado general de biofarmacia y farmacocinética. Vol II. Vías de administración de fármacos: aspectos biofarmacéuticos. Farmacocinética no lineal y clínica. Madrid: Editorial Síntesis; 2013. p. 319-327.

Fernández-Navarro M, Peragón J, Amores V, De La Higuera M, Lupiáñez JA. Maslinic acid added to the diet increases growth and protein-turnover rates in the white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2008; 147:158-67.

Fu SB, Yang JS, Cui JL, Meng QF, Feng X, Sun DA. Multihydroxylation of ursolic acid by *Pestalotiopsis microspora* isolated from the medicinal plant *Huperzia serrata*. *Fitoterapia.* 2011; 82:1057-61.

Fukushima EO, Seki H, Ohyama K, Ono E, Umemoto N, Mizutani M, Saito K, Muranaka T. CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 2011; 52:2050-61.

Gavhane YN, Yadav AV. Loss of orally administered drugs in GI tract. *Saudi Pharm J.* 2012; 20:331-44.

Gerbeth K, Hüscher J, Fricker G, Werz O, Schubert-Zsilavecz M, Abdel-Tawab M. In vitro metabolism, permeation, and brain availability of six major boswellic acids from *Boswellia serrata* gum resins. *Fitoterapia.* 2013; 84:99-106.

Grosso G, Buscemi S, Galvano F, Mistretta A, Marventano S, La Vela V, Drago F, Gangi S, Basile F, Biondi A. Mediterranean diet and cancer: epidemiological evidence and mechanism of selected aspects. *BMC Surg.* 2013b;13 Suppl 2:S14.

Grosso G, Mistretta A, Marventano S, Purrello A, Vitaglione P, Calabrese G, Drago F, Galvano F. Beneficial Effects of the Mediterranean Diet on Metabolic Syndrome. *Curr Pharm Des.* 2013a. doi: 10.2174/1381612819666131206112144.

Grosso G, Pajak A, Mistretta A, Marventano S, Raciti T, Buscemi S, Drago F, Scalfi L, Galvano F. Protective role of the Mediterranean diet on several cardiovascular risk factors: evidence from Sicily, southern Italy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014; 24:370-7.

Gu JQ, Wang Y, Franzblau SG, Montenegro G, Timmermann BN. Dereplication of pentacyclic triterpenoids in plants by GC-EI/MS. *Phytochem Anal.* 2006; 17:102-6.

Guan T, Li Y, Sun H, Tang X, Qian Y. Effects of maslinic acid, a natural triterpene, on glycogen metabolism in cultured cortical astrocytes. *Planta Med.* 2009; 75:1141-3.

Guan T, Qian Y, Tang X, Huang M, Huang L, Li Y, Sun H. Maslinic acid, a natural inhibitor of glycogen phosphorylase, reduces cerebral ischemic injury in hyperglycemic rats by GLT-1 up-regulation. *J Neurosci Res.* 2011; 89:1829-39.

Guidance for Industry: Bioanalytical method validation [Internet]. Maryland: FDA, CDER, CVM, U.S. Department of Health and Human Services; 2001 [accès el 28 de març de 2014]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>

Guidance for Industry: Population pharmacokinetics [Internet]. Maryland: FDA, CDER, CBER, U.S. Department of Health and Human Services; 1999 [accès el 9 de juny de 2014]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM072137.pdf>

Guideline on Bioanalytical Method Validation [Internet]. London: European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for human Use (CHMP); 2011 [accès el 28 de març de 2014]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf

Guillen N, Acín S, Surra JC, Arnal C, Godino J, García-Granados A, Muniesa P, Ruiz-Gutiérrez V, Osada J. Apolipoprotein E determines the hepatic transcriptional profile of dietary maslinic acid in mice. *J Nutr Biochem.* 2009; 20:882-93.

Guinda A, Rada M, Delgado T, Gutiérrez-Adán P, Castellano JM. Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf. *J Agric Food Chem.* 2010; 58(17):9685-91.

Guo S, Duan JA, Tang Y, Qian Y, Zhao J, Qian D, Su S, Shang E. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of triterpenic acids, saponins and flavonoids in the leaves of two *Ziziphus* species by HPLC-PDA-MS/ELSD. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 56:264-70.

He X, Liu RH. Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. *J Agric Food Chem.* 2007; 55:4366-70.

- Holcapek M, Kolárová L, Nobilis M. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 391:59-78.
- Hou W, Li Y, Zhang Q, Wei X, Peng A, Chen L, Wei Y. Triterpene acids isolated from *Lagerstroemia speciosa* leaves as alpha-glucosidase inhibitors. *Phytother Res.* 2009; 23:614-8.
- Huang B, Luo J, Han Y, Li S, Liu F, Wu L. Protective effect of maslinic acid preconditioning against oxygen-glucose deprivation- induced injuries in embryonic rat cortical neurons. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2013; 33:322-5, 331.
- Huang L, Guan T, Qian Y, Huang M, Tang X, Li Y, Sun H. Anti-inflammatory effects of maslinic acid, a natural triterpene, in cultured cortical astrocytes via suppression of nuclear factor-kappa B. *Eur J Pharmacol.* 2011; 672:169-74.
- Hussain-Shaik A, Rasool SN, Abdul Kareem M, Krushna GS, Akhtar PM, Devi KL. Maslinic acid protects against isoproterenol-induced cardiotoxicity in albino Wistar rats. *J Med Food.* 2012; 15:741-6.
- Jäger S, Trojan H, Kopp T, Laszczyk MN, Scheffler A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules.* 2009; 14:2016-31
- Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2010; 154:103-16.
- Jatczak K, Gryniewicz G. Triterpene sapogenins with oleanene skeleton: chemotypes and biological activities. *Acta Biochim Pol.* 2014; 61: 227-43.
- Jeong DW, Kim YH, Kim HH, Ji HY, Yoo SD, Choi WR, Lee SM, Han CK, Lee HS. Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats. *Biopharm Drug Dispos.* 2007; 28:51-7.
- Jolling K, Perez Ruixo JJ, Hemerysk A, Vermeuelen A, Greway T. Mixed-effects modelling of the interspecies pharmacokinetic scaling of pegylated human erythropoietin. *Eur J Pharm Sci.* 2005; 24:465-75.
- Juan ME, Alfaras I, Planas JM. Colorectal cancer chemoprevention by trans-resveratrol. *Pharmacol Res.* 2012; 65:584-91.
- Juan ME, Planas JM, Ruiz-Gutierrez V, Daniel H, Wenzel U. Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of maslinic and oleanolic acids, two pentacyclic triterpenes from olives, on HT-29 colon cancer cells. *Br J Nutr.* 2008; 100:36-43.

Juan ME, Wenzel U, Ruiz-Gutierrez V, Daniel H, Planas JM. Olive fruit extracts inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr.* 2006; 136:2553-7.

Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L.*): a review. *Altern Med Rev.* 2008; 13:128-44.

Kalogeropoulos N, Chiou A, Ioannou M, Karathanos VT, Hassapidou M, Andrikopoulos NK. Nutritional evaluation and bioactive microconstituents (phytosterols, tocopherols, polyphenols, triterpenic acids) in cooked dry legumes usually consumed in the Mediterranean countries. 2010; 121:682-90.

Kaminsky LS, Zhang QY. The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31:1520-5.

Kanaki P, Termentzi A, Michel T, Gikas E, Halabalaki M, Skaltsounis AL. From olive drupes to olive oil. An HPLC-Orbitrap-based qualitative and quantitative exploration of olives key metabolites. *Planta Med.* 2013;79:1576-87.

Kang HE, Lee MG. Approaches for predicting human pharmacokinetics using interspecies pharmacokinetic scaling. *Arch Pharm Res.* 2011; 34:1779-88.

Kang MJ, Kim HG, Kim JS, Oh do G, Um YJ, Seo CS, Han JW, Cho HJ, Kim GH, Jeong TC, Jeong HG. The effect of gut microbiota on drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013; 9:1295-308.

Kerbarle P, Tang L. From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1993; 65:972A–986A.

Khathi A, Serumula MR, Myburg RB, Van Heerden FR, Musabayane CT. Effects of *Syzygium aromaticum*-derived triterpenes on postprandial blood glucose in streptozotocin-induced diabetic rats following carbohydrate challenge. *PLoS One.* 2013; 8:e81632.

Kombargi WS, Michelakis SE, Petrakis CA. Effect of olive surface waxes on oviposition by *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *J Econ Entomol.* 1998; 91:993-8.

Krüger P, Daneshfar R, Eckert GP, Klein J, Volmer DA, Bahr U, Müller WE, Karas M, Schubert-Zsilavec M, Abdel-Tawab M. Metabolism of boswellic acids in vitro and in vivo. *Drug Metab Dispos.* 2008; 36:1135-42.

Kwon Y. Handbook of essential pharmacokinetics. Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists. Springer; 2001.

Laszczyk MN. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Med.* 2009; 75: 1549-60.

- Legrand C, Bour JM, Jacob C, Capiaumont J, Martial A, Marc A, Wudtke M, Kretzmer G, Demangel C, Duval D, et al. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium [corrected]. *J Biotechnol.* 1992; 25:231-43.
- Li C, Yang Z, Zhai C, Qiu W, Li D, Yi Z, Wang L, Tang J, Qian M, Luo J, Liu M. Maslinic acid potentiates the anti-tumor activity of tumor necrosis factor alpha by inhibiting NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cancer.* 2010; 9:73.
- Li GL, You JM, Song CH, Xia L, Zheng J, Suo YR. Development of a new HPLC method with precolumn fluorescent derivatization for rapid, selective and sensitive detection of triterpenic acids in fruits. *J Agric Food Chem.* 2011; 59:2972-9.
- Liao Q, Yang W, Jia Y, Chen X, Gao Q, Bi K. LC-MS determination and pharmacokinetic studies of ursolic acid in rat plasma after administration of the traditional chinese medicinal preparation Lu-Ying extract. *Yakugaku Zasshi.* 2005; 125:509-15.
- Lin CC, Huang CY, Mong MC, Chan CY, Yin MC. Antiangiogenic potential of three triterpenic acids in human liver cancer cells. *J Agric Food Chem.* 2011; 59:755-62.
- Liu J, Sun H, Duan W, Mu D, Zhang L. Maslinic acid reduces blood glucose in KK-Ay mice. *Biol Pharm Bull.* 2007a; 30:2075-8.
- Liu J, Sun H, Shang J, Yong Y, Zhang L. Effect of olive pomace extracts on hyperlipidaemia. *Nat Prod Res.* 2011; 25:1190-4.
- Liu J, Sun H, Wang, X, Mu D, Liao H, Zhang L. Effects of oleanolic acid and maslinic acid on hyperlipidemia. *Drug Dev Res.* 2007b; 68:261-266.
- Liu J, Wang X, Chen YP, Mao LF, Shang J, Sun HB, Zhang LY. Maslinic acid modulates glycogen metabolism by enhancing the insulin signaling pathway and inhibiting glycogen phosphorylase. *Chin J Nat Med.* 2014; 12:259-65.
- Lou-Bonafonte JM, Arnal C, Navarro MA, Osada J. Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development. *Mol Nutr Food Res.* 2012; 56:1043-57.
- Lozano-Mena G, Juan ME, García-Granados A, Planas JM. Determination of maslinic acid, a pentacyclic triterpene from olives, in rat plasma by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem.* 2012; 60:10220-5.
- M**árquez-Martín A, de la Puerta Vázquez R, Fernández-Arche A, Ruiz-Gutiérrez V. Suppressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in stimulated murine macrophages. *Free Radic Res.* 2006; 40:295-302.

Martín R, Carvalho-Tavares J, Ibeas E, Hernández M, Ruiz-Gutierrez V, Nieto ML. Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation. *Cancer Res.* 2007; 67:3741-51.

Martínez A, Rivas F, Perojil A, Parra A, García-Granados A, Fernández-Vivas A. Biotransformation of oleanolic and maslinic acids by *Rhizomucor miehei*. *Phytochemistry.* 2013; 94:229-37.

Martínez-González MA, Bes-Rastrollo M. Dietary patterns, Mediterranean diet, and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2014; 25:20-6.

Martín-Peláez S, Covas MI, Fitó M, Kušar A, Pravst I. Health effects of olive oil polyphenols: recent advances and possibilities for the use of health claims. *Mol Nutr Food Res.* 2013; 57:760-71.

Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem.* 2003; 75:3019-30.

Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci.* 1997; 22:477-81.

Mkhwanazi BN, Serumula MR, Myburg RB, Van Heerden FR, Musabayane CT. Antioxidant effects of maslinic acid in livers, hearts and kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats: effects on kidney function. *Ren Fail.* 2014; 36:419-31.

Moneriz C, Marín-García P, Bautista JM, Diez A, Puyet A. Parasitostatic effect of maslinic acid. II. Survival increase and immune protection in lethal *Plasmodium yoelii*-infected mice. *Malar J.* 2011a; 10:103.

Moneriz C, Marín-García P, García-Granados A, Bautista JM, Diez A, Puyet A. Parasitostatic effect of maslinic acid. I. Growth arrest of *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic stages. *Malar J.* 2011b; 10:82.

Montilla MP, Agil A, Navarro MC, Jiménez MI, García-Granados A, Parra A, Cabo MM. Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Med.* 2003; 69:472-4.

○ OECD Guidelines for the testing of chemicals: acute oral toxicity –up-and-down-procedure (UDP) [Internet]. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development; 2008 [accès 10 de gener de 2014]. Disponible en: <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/ocedtg425.pdf>

Oltval ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993; 74:609-19.

Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Würtele G, Spiegelhalder B, Bartsch H. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol*. 2000; 1:107-12.

Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos*. 2006; 34:880-6.

Pang R, Poon RT. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2006; 242:151-67.

Park SY, Nho CW, Kwon DY, Kang YH, Lee KW, Park JH. Maslinic acid inhibits the metastatic capacity of DU145 human prostate cancer cells: possible mediation via hypoxia-inducible factor-1 α signalling. *Br J Nutr*. 2013; 109:210-22.

Parra A, Rivas F, López PE, García-Granados A, Martínez A, Albericio F, Márquez N, Muñoz E. Solution- and solid-phase synthesis and anti-HIV activity of maslinic acid derivatives containing amino acids and peptides. *Bioorg Med Chem*. 2009; 17:1139-45.

Peragón J. Time course of pentacyclic triterpenoids from fruits and leaves of olive tree (*Olea europaea* L.) cv. Picual and cv. Cornezuelo during ripening. *J Agric Food Chem*. 2013; 61:6671-8

Peraire Guitart C, Colom Codina H, Calpena Campmany AC, Escribano Ferrer E. Análisis farmacocinético compartimental. Administración por bolus intravenoso. Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Peraire Guitart C. Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética. Vol. I, LADME. Análisis farmacocinético. Biodisponibilidad y bioequivalencia. Madrid: Editorial Síntesis; 2013.

Pérez-Camino MC, Cert A. Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J Agric Food Chem*. 1999; 47:1558-62.

Pérez-López FR, Chedraui P, Haya J, Cuadros JL. Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. *Maturitas*. 2009; 64:67-79.

Pimenta AM, Toledo E, Rodriguez-Diez MC, Gea A, Lopez-Iracheta R, Shivappa N, Hébert JR, Martinez-Gonzalez MA. Dietary indexes, food patterns and incidence of metabolic syndrome in a Mediterranean cohort: The SUN project. *Clin Nutr*. 2014. doi: 10.1016/j.clnu.2014.06.002.

Planas JM, Alfaras I, Colom H, Juan ME. The bioavailability and distribution of trans-resveratrol are constrained by ABC transporters. *Arch Biochem Biophys*. 2012; 527:67-73.

Pounis G, de Lorgeril M, Salen P, Laporte F, Krogh V, Siani A, Arnout J, Cappuccio FP, van Dongen M, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L; On behalf of the European Collaborative Group of the IMMIDIET Project. Dietary patterns and fatty acids levels of three European populations. Results from the IMMIDIET study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014, doi: 10.1016/j.numecd.2014.01.012.

Psaltopoulou T, Kostis RI, Haidopoulos D, Dimopoulos M, Panagiotakos DB. Olive oil intake is inversely related to cancer prevalence: a systematic review and a meta-analysis of 13,800 patients and 23,340 controls in 19 observational studies. *Lipids Health Dis.* 2011; 10:127.

Pungitore CR, García M, Gianello JC, Sosa ME, Tonn CE. Insecticidal and antifeedant effects of *Junellia aspera* (Verbenaceae) triterpenes and derivatives on *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *J Stored Prod Res.* 2005; 41:433-43.

Qian Y, Guan T, Tang X, Huang L, Huang M, Li Y, Sun H, Yu R, Zhang F. Astrocytic glutamate transporter-dependent neuroprotection against glutamate toxicity: an in vitro study of maslinic acid. *Eur J Pharmacol.* 2011a; 651:59-65.

Qian Y, Guan T, Tang X, Huang L, Huang M, Li Y, Sun H. Maslinic acid, a natural triterpenoid compound from *Olea europaea*, protects cortical neurons against oxygen-glucose deprivation-induced injury. *Eur J Pharmacol.* 2011b; 670:148-53.

Rahmani AH, Albutti AS, Aly SM. Therapeutics role of olive fruits/oil in the prevention of diseases via modulation of anti-oxidant, anti-tumour and genetic activity. *Int J Clin Exp Med.* 2014; 7:799-808.

Reising K, Meins J, Bastian B, Eckert G, Mueller WE, Schubert-Zsilavec M, Abdel-Tawab M. Determination of boswellic acids in brain and plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2005; 77:6640-5.

Reyes FJ, Centelles JJ, Lupiáñez JA, Cascante M. (2 α ,3 β)-2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells. *FEBS Lett.* 2006; 580:6302-10.

Reyes-Zurita FJ, Pachón-Peña G, Lizárraga D, Rufino-Palomares EE, Cascante M, Lupiáñez JA. The natural triterpene maslinic acid induces apoptosis in HT29 colon cancer cells by a JNK-p53-dependent mechanism. *BMC Cancer.* 2011;11:154.

Reyes-Zurita FJ, Rufino-Palomares EE, Lupiáñez JA, Cascante M. Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Lett.* 2009; 273:44-54.

- Reyes-Zurita FJ, Rufino-Palomares EE, Medina PP, Leticia García-Salguero E, Peragón J, Cascante M, Lupiáñez JA. Antitumour activity on extrinsic apoptotic targets of the triterpenoid maslinic acid in p53-deficient Caco-2 adenocarcinoma cells. *Biochimie*. 2013; 95:2157-67.
- Rhourri-Frih B, Chaimbault P, Claude B, Lamy C, André P, Lafosse M. Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS. A comparative study between APCI and APPI. *J Mass Spectrom*. 2009; 44:71-80.
- Roberts DM, Buckley NA. Pharmacokinetic considerations in clinical toxicology: clinical applications. *Clin Pharmacokinet*. 2007; 46:897-939.
- Rodríguez-Rodríguez R, Perona JS, Herrera MD, Ruiz-Gutiérrez V. Triterpenic compounds from "orujo" olive oil elicit vasorelaxation in aorta from spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem*. 2006; 54:2096-102.
- Romero C, García A, Medina E, Ruiz-Méndez MV, de Castro A, Brenes M. Triterpenic acids in table olives. *Food Chemistry*. 2010; 118:670–74.
- Rowland M, Tozer TN. *Clinical pharmacokinetics: Concepts and Applications*. 3^a ed. Pennsylvania: Williams & Wilkins; 1995.
- Rosenbaum S. Pharmacokinetics of an intravenous bolus injection in a two-compartment model. Rosenbaum S. *Basic pharmacokinetics and pharmacodynamics. An integrated textbook and computer simulations*. New Jersey: John Wiley & Sons, INC; 2011b. p. 159-176.
- Rosenbaum S. Pharmacokinetics of extravascular drug administration. Rosenbaum S. *Basic pharmacokinetics and pharmacodynamics. An integrated textbook and computer simulations*. New Jersey: John Wiley & Sons, INC; 2011a. p. 194-195.
- Rufino-Palomares E, Reyes-Zurita FJ, Fuentes-Almagro CA, de la Higuera M, Lupiáñez JA, Peragón J. Proteomics in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to elucidate the cellular response induced by the intake of maslinic acid. *Proteomics*. 2011; 11:3312-25.
- Rufino-Palomares EE, Reyes-Zurita FJ, García-Salguero L, Mokhtari K, Medina PP, Lupiáñez JA, Peragón J. Maslinic acid, a triterpenic anti-tumoural agent, interferes with cytoskeleton protein expression in HT29 human colon-cancer cells. *J Proteomics*. 2013; 83:15-25.
- Ruiz-Canela M, Martínez-González MA. Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. *Maturitas*. 2011; 68:245-50.

Salas-Salvadó J, Guasch-Ferré M, Bulló M, Sabaté J. Nuts in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2014; 100:399S-407S.

Salehi S, Long SR, Proteau PJ, Filtz TM. Hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) extract exhibits atropine-sensitive activity in a cultured cardiomyocyte assay. *J Nat Med.* 2009; 63:1-8.

Sales-Campos H, Souza PR, Peghini BC, da Silva JS, Cardoso CR. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini Rev Med Chem.* 2013; 13:201-10.

Sánchez-Avila N, Priego-Capote F, Ruiz-Jiménez J, de Castro MD. Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction. *Talanta.* 2009; 78:40-8.

Sánchez-González M, Lozano-Mena G, Juan ME, García-Granados A, Planas JM. Liquid chromatography-mass spectrometry determination in plasma of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L. *Food Chem.* 2013; 141:4375-81.

Sánchez-Quesada C, López-Biedma A, Warleta F, Campos M, Beltrán G, Gaforio JJ. Bioactive properties of the main triterpenes found in olives, virgin olive oil, and leaves of *Olea europaea*. *J Agric Food Chem.* 2013; 61:12173-82.

Sánchez-Tena S, Reyes-Zurita FJ, Díaz-Moralli S, Vinardell MP, Reed M, García-García F, Dopazo J, Lupiáñez JA, Günther U, Cascante M. Maslinic acid-enriched diet decreases intestinal tumorigenesis in *Apc(Min/+)* mice through transcriptomic and metabolomic reprogramming. *PLoS One.* 2013 ;8:e59392.

Sellers RS, Morton D, Michael B, Roome N, Johnson JK, Yano BL, Perry R, Schafer K. Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicol Pathol.* 2007; 35:751-5.

Sharma S, Vik S, Kolonel LN. Fruit and vegetable consumption, ethnicity and risk of fatal ischemic heart disease. *J Nutr Health Aging.* 2014; 18:573-8.

Song M, Hang TJ, Wang Y, Jiang L, Wu XL, Zhang Z, Shen J, Zhang Y. Determination of oleanolic acid in human plasma and study of its pharmacokinetics in Chinese healthy male volunteers by HPLC tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; 40:190-6.

Sousa T, Paterson R, Moore V, Carlsson A, Abrahamsson B, Basit AW. The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *Int J Pharm.* 2008; 363:1-25.

- Stiti N, Triki S, Hartmann MA. Formation of triterpenoids throughout *Olea europaea* fruit ontogeny. *Lipids*. 2007; 42:55-67.
- Stohs SJ, Miller H, Kaats GR. A review of the efficacy and safety of banaba (*Lagerstroemia speciosa* L.) and corosolic acid. *Phytother Res*. 2012; 26:317-24.
- Sugano K, Kansy M, Artursson P, Avdeef A, Bendels S, Di L, Ecker GF, Faller B, Fischer H, Gerebtzoff G, Lennernaes H, Senner F. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9:597-614.
- Tan A, Hussain S, Musuku A, Massé R. Internal standard response variations during incurred sample analysis by LC-MS/MS: Case by case trouble-shooting. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009; 877:3201-9.
- Tang XZ, Guan T, Qian YS, Li YM, Sun HB, Huang JH, Zhang Y. Effects of Maslinic Acid as a Novel Glycogen Phosphorylase Inhibitor on Blood Glucose and Hepatic Glycogen in Mice. *Chin J Nat Med*. 2008; 6:53-56.
- Tartan Z, Orhan G, Kasikçioğlu H, Uyarel H, Unal S, Ozer N, Ozay B, Ciloglu F, Cam N. The role of paraoxonase (PON) enzyme in the extent and severity of the coronary artery disease in type-2 diabetic patients. *Heart Vessels*. 2007; 22:158-64.
- Testa B, Krämer SD. The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 1. Principles and overview. *Chem Biodivers*. 2006; 3:1053-101.
- Thelen K, Dressman JB. Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. *J Pharm Pharmacol*. 2009; 61:541-58.
- Thimmappa R, Geisler K, Louveau T, O'Maille P, Osbourn A. Triterpene biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2014; 65:225-57.
- Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Plasma clearance. *J Vet Pharmacol Ther*. 2004b; 27:415-25.
- Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Plasma terminal half-life. *J Vet Pharmacol Ther*. 2004c; 27:427-39.
- Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Volumes of distribution. *J Vet Pharmacol Ther*. 2004a; 27:441-53.
- Trichopoulou A, Dilis V. Olive oil and longevity. *Mol Nutr Food Res*. 2007; 51:1275-8.
- Udeani GO1, Zhao GM, Geun Shin Y, Cooke BP, Graham J, Beecher CW, Kinghorn AD, Pezzuto JM. Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice. *Biopharm Drug Dispos*. 1999; 20:379-83.

Uto T, Sakamoto A, Tung NH, Fujiki T, Kishihara K, Oiso S, Kariyazono H, Morinaga O, Shoyama Y. Anti-Proliferative Activities and Apoptosis Induction by Triterpenes Derived from *Eriobotrya japonica* in Human Leukemia Cell Lines. *Int J Mol Sci.* 2013; 14:4106-20.

Van de Waterbeemd H, Gifford E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2:192-204.

Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009; 877:2198-207.

Velázquez-López L, Santiago-Díaz G, Nava-Hernández J, Muñoz-Torres AV, Medina-Bravo P, Torres-Tamayo M. Mediterranean-style diet reduces metabolic syndrome components in obese children and adolescents with obesity. *BMC Pediatr.* 2014; 14:175.

Wen X, Sun H, Liu J, Cheng K, Zhang P, Zhang L, Hao J, Zhang L, Ni P, Zographos SE, Leonidas DD, Alexacou KM, Gimisis T, Hayes JM, Oikonomakos NG. Naturally occurring pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, structure-activity relationships, and X-ray crystallographic studies. *J Med Chem.* 2008; 51:3540-54.

Wen X, Sun H, Liu J, Wu G, Zhang L, Wu X, Ni P. Pentacyclic triterpenes. Part 1: the first examples of naturally occurring pentacyclic triterpenes as a new class of inhibitors of glycogen phosphorylases. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005; 15:4944-8.

Xia Y, Wei G, Si D, Liu C. Quantitation of ursolic acid in human plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011; 879:219-24.

Xu HX, Zeng FQ, Wan M, Sim KY. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *J Nat Prod.* 1996; 59:643-5.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med.* 2001; 7:941-6.

Yang M, Wang GJ, Wang SJ, Li XT, Xu YP, Wang SP, Xiang JD, Pan SR, Cao GX, Ye WC. Quantitative analysis of 23-hydroxybetulinic acid in mouse plasma using electrospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005; 19:1619-23.

Yarnell E. Botanical medicines for the urinary tract. *World J Urol.* 2002; 20:285-93.

Yin MC, Lin MC, Mong MC, Lin CY. Bioavailability, distribution, and antioxidative effects of selected triterpenes in mice. *J Agric Food Chem.* 2012; 60:7697-701

Zhang S, Ding D, Zhang X, Shan L, Liu Z. Maslinic acid induced apoptosis in bladder cancer cells through activating p38 MAPK signaling pathway. *Mol Cell Biochem.* 2014b; 392:281-7.

Zhang S, Sun Y, Sun Z, Wang X, You J, Suo Y. Determination of triterpenic acids in fruits by a novel high performance liquid chromatography method with high sensitivity and specificity. *Food Chem.* 2014a; 146:264-9.

Zhao WJ, Wang BJ, Wei CM, Yuan GY, Bu FL, Guo RC. Determination of glycyrrhetic acid in human plasma by HPLC-MS method and investigation of its pharmacokinetics. *J Clin Pharm Ther.* 2008; 33:289-94.

