



# Absorció i metabolisme intestinal de l'àcid maslínic, un component bioactiu de l'*Olea europaea* L. Efecte quimiopreventiu sobre lesions preneoplàsiques en còlon de rata

Glòria Lozano Mena

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Universitat de Barcelona

Grup de Fisiologia i Fisiopatologia Nutricionals  
Departament de Fisiologia. Facultat de Farmàcia  
Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària

**ABSORCIÓ I METABOLISME INTESTINAL DE L'ÀCID MASLÍNIC,  
UN COMPONENT BIOACTIU DE L'*OLEA EUROPAEA* L.  
EFECTE QUIMIOPREVENTIU SOBRE LESIONS  
PRENEOPLÀSIQUES EN CÒLON DE RATA**

Glòria Lozano Mena

Barcelona, 2014





Universitat de Barcelona

Grup de Fisiologia i Fisiopatologia Nutricionals  
Departament de Fisiologia. Facultat de Farmàcia  
Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària

**ABSORCIÓ I METABOLISME INTESTINAL DE L'ÀCID MASLÍNIC,  
UN COMPONENT BIOACTIU DE L'OLEA EUROPAEA L.  
EFECTE QUIMIOPREVENTIU SOBRE LESIONS  
PRENEOPLÀSIQUES EN CÒLON DE RATA**

**Programa de Doctorat en Biomedicina**

Directores:

**Joana M. Planas Rosselló**  
Catedràtica de Fisiologia

**M. Emília Juan Olivé**  
Professora Agregada de Fisiologia

Doctoranda:

**Glòria Lozano Mena**

**Barcelona, 2015**



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 “Absorció i metabolisme intestinal de l'àcid maslínic, un component bioactiu de l'*Olea europaea* L. Efecte quimiopreventiu sobre lesions preneoplàsiques en còlon de rata”, presentada per GLÒRIA LOZANO MENA per optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona ha estat realitzada sota la seva direcció en el Departament de Fisiologia i, considerant-la conclosa, n'autoritzen la presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I perquè així consti, signen la present,

Dra. Joana M. Planas Rosselló

Dra. M. Emília Juan Olivé

Barcelona, 15 de desembre del 2014



Aquesta tesi ha estat subvencionada per l'ajut AGL2009-12866 del Ministerio de Economía y Competitividad. El grup de Fisiologia i Nutrició Experimental, al qual pertany el grup de Fisiologia i Fisiopatologia Nutricionals, també ha gaudit d'un *Ajut de suport a les activitats dels grups de recerca* (SGR) del Departament d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya (2009-SGR-471). Per a la realització d'aquesta tesi a l'autora li ha estat concedit un *Ajut de Personal Investigador predoctoral en Formació per a doctorands de la Universitat de Barcelona* (APIF-UB), que ha cobert el període comprès entre l'1 d'octubre del 2010 i el 30 de setembre del 2014. A més, en el marc d'aquesta beca l'autora ha gaudit d'un *Ajut per a la realització d'estades formatives a Espanya i a l'estranger per a l'any 2013*, que li ha permès col·laborar durant 3 mesos (16 de setembre del 2013 – 18 de desembre del 2013) en el grup de recerca que dirigeix el Dr. Alfred H. Schinkel en el Departament d'Oncologia Molecular del Netherlands Cancer Institute (Amsterdam, Holanda). A l'autora també li ha estat concedida una *Beca de Col·laboració en Projectes de Recerca* de la Fundació Bosch i Gimpera (codi de convocatòria 09/2014-49 i codi de projecte 300136) durant el període comprès entre l'1 d'octubre del 2014 i l'1 d'abril del 2015. L'assistència a congressos ha estat subvencionada amb borses de viatge concedides per la Comissió de Recerca de la Facultat de Farmàcia. La tesi s'ha dut a terme en el Departament de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia, en col·laboració amb el Centre d'Atenció Primària Just Oliveras (L'Hospitalet de Llobregat) i els Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCIT-UB).





I per fi ha arribat el moment d'escriure aquestes pàgines, el capítol més personal, l'ocasió per compartir el mèrit d'aquesta tesi.

Voldria agrair, en primer lloc, a la Dra. Joana M. Planas i la Dra. M. Emília Juan que m'oferissin la possibilitat de realitzar la tesi doctoral en el seu grup de recerca. La bona experiència que havien estat els anys previs de col·laboració, en forma de treballs dirigits, no em van fer dubtar que aquesta etapa seria extremadament profitosa. I així ha estat. Joana, directora impecable i *coach* improvisada, gràcies per despertar-me l'interès per la investigació, per aportar sempre la visió pràctica de les coses, que sovint perdem de vista quan ens hi capfiquem, per les converses que de cop feien que tot fos més fàcil i se'm renovessin les ganes de seguir endavant. Emília, treballadora incansable i companya d'aventures en el camí de la tesi, gràcies per alleugerir-me l'esforç tantes vegades, per la teva dedicació incondicional, per no perdre el somriure i per la teva motivació, que mai no defalleix. La teva proximitat ha estat clau per remuntar el vol en moments de desànim.

A la Dra. (doctora!) Marta Sánchez, l'altra tripulant d'aquest projecte. M'alegro que aquella conversa en el Parc "et convencés" per embarcar-te i que haguem compartit aquesta travessa, en la qual no han faltat moments de bona mar però també fortes tempestes, tot i que sempre hem arribat a bon port. Espero que aquesta nova etapa recent estrenada (també en l'àmbit personal) et porti molts èxits!

A la Dra. Lluïsa Miró, encara que dient tan sols Lluïsa penso únicament en una persona; companya, amiga i consellera, tot alhora i en la perfecta combinació per ser un altre dels pilars d'aquesta tesi. Gràcies per ser tan accessible, pel teu caràcter afable i les teves paraules sempre tranquil·litzadores. Tenint-te al costat encara em podria pensar de fer una segona tesi...!

A la resta de components del grup FiNEX, el Dr. Miquel Moretó, la Dra. Conxita Amat i la Dra. Anna Pérez, en qui he trobat exemples de feina ben feta i amb qui he tingut el plaer de compartir tasques docents que m'han fet créixer professionalment. No puc oblidar la Dra. Irene Alfaras i la Dra. Mònica Maijó, amb qui només vam coincidir durant la primera etapa de la tesi però en qui vam veure les nostres "germanes grans" científiques. I no voldria deixar d'anomenar tampoc la Neus Arboix i l'Alba Garcia, tan pendents dels meus avenços durant la fase d'escriptura. Gràcies a tots per crear un ambient distès i agradable on hi he treballat molt a gust.

A la Dra. Helena Colom, per totes les hores que ha dedicat a ensenyar-nos sobre farmacocinètica. Gràcies per posar-nos a l'abast els programes de tractament de dades i per tenir sempre un forat per ajudar-nos a interpretar i discutir els resultats.

A totes aquelles estudiants de pràctiques que han passat pel nostre grup i que han aportat el seu granet de sorra a aquesta tesi i una mica d'aire fresc, la Marta Martí, l'Ares Vergoñós, la Mariona Martínez, la Tatiana Trebolento, la Saskia Homberg, la Mireia Solé, la Laura Pagès, la

Maria Torres, la Ivana Kundisova i la Maria Fedelich. I en especial a la Mariona Vicente i a la Cristina Camps, amb qui, a més, he compartit bons moments a fora de la facultat. Us desitjo molta sort en tot allò que feu!

A tots els companys del Departament de Fisiologia, amb qui en una ocasió o altra he tingut el plaer de compartir pràctiques, vigilàncies d'exàmens, dinars i converses. De cadascun de vosaltres hi ha una part en aquesta tesi, perquè la tesi no és només aquesta memòria sinó totes les hores viscudes entre aquestes parets al llarg dels darrers anys.

Als membres de la Unitat d'Establació Animal de la Facultat de Farmàcia, la Dra. Tere Rodrigo, el David, la Marta i la Paula, pel suport que he rebut sempre que els he necessitat, ja sigui amb animals indomables o tedioses qüestions burocràtiques.

Al personal del servei d'espectrometria de masses dels Centres Científics i Tecnològics de la UB, el Dr. Isidre Casals, la Dra. Olga Jáuregui, el Dr. Alberto Adeva i el David Bellido, pel temps que han dedicat no només a ensenyar-me les tècniques sinó també a resoldre les meves qüestions, sovint de difícil resposta. I molt especialment a l'Isidre, per la seva enorme disposició, paciència i amabilitat.

To Dr. Alfred H. Schinkel, for allowing me to do a stay of research at his laboratory at the Department of Molecular Oncology in the Netherlands Cancer Institute (Amsterdam), and to the members of his research group, Dr. Selvi Durmus, Els Wagenaar, Anita Kort, Dr. Seng Chuan Tang and Anita van Esch. Selvi, from you I received not only knowledge but also great amounts of confidence and a friendship. Els, thanks for your *savoir faire* in the lab, which I admire, for the talks about our furry friends and for being my supplier of stroopwafels! Anita (Kort), thanks for your permanent smile and for being so easy-going; I wish that you soon meet a successful end in your race. Seng, it was a great pleasure to help you with your critical experiments, thanks for counting on me. And I cannot miss to mention Dr. Olaf van Tellingen, Ping, Levi and Mark, from the Department of Clinical Chemistry, where I spent many profitable and memorable hours. Thank you all for making me feel as part of your teams from the very beginning. It was definitely one of the greatest experiences of my life.

A la Dra. Núria Llor, per estar sempre disponible un pis més avall. Gràcies per la teva proximitat, per les estones compartides al cotxe en un trajecte curt però ben aprofitat per mantenir-nos al dia. Ens han quedat uns quants dinars pendents, però no em preocupa perquè ens seguirem veient molts diumenges entre gegants.

Al Sr. Josep Galdón, per la seva contribució de caire logístic i pel seu tracte, sempre amable. Tot i que jo acabi, l'altre germà Lozano seguirà donant feina uns anys més.

A la Clara i a la Gemma (Dra. Gemma Manich, per ser exactes!), pels dinars al parc sota el sol de totes les estacions, explicant batalletes que ens feien desconnectar una estona. Desitjo que la nova etapa que també a vosaltres se us presenta al davant sigui plena en il·lusions i èxits. Clara,

gràcies pel teu optimisme contagiós, per les teves ganes constants de fer coses (que si tardes de jocs, que si matinar per sortir a pescar gavines, que si explorar la Costa Brava en caiac...), també per les vinyetes de la Peppermint Patty i la Marcie, que sempre han aconseguit arrencar-me un somriure. Que tot plegat continuï per molt de temps!

Als companys de la colla de Geganters i Grallers de Palau-solità i Plegamans, per totes les hores compartides entre el so de gralles, timbals i tabals.

Al Dani, per la seva amistat incondicional, per totes les vegades que has estat només orelles mentre jo feia un monòleg sobre qui em manava embolicar-me en una tesi. Ara ja no tindrè "excusa" per no portar a terme tots els plans que hem fet!

A la Pilar, per guiar-me cap a la llum en una època de foscor. Sense tu hauria estat més difícil trobar el camí que m'ha portat fins on sóc ara.

Al Joan, la Lidia, la Samantha i el Sergio, per persistir en l'intent de comprendre aquest món desconegut de la investigació amb rates. I a l'Erik, perquè a aquesta edat només pots portar alegria! Cada estona compartida amb vosaltres és com un petit bàlsam, necessari per recobrar forces i continuar endavant.

Al meu germà, David, per totes les converses (tot i que sovint acaben en discussions amistoses!) que em fan tocar de peus a terra amb la seva visió realista, a vegades una mica massa simplificada pel meu gust..., dels meus "grans" problemes. Qui ho hagués dit, que anys després de compartir jocs acabaríem compartint facultat i un objectiu semblant (la tesi). Molts ànims, el camí no és fàcil però estic segura que arribaràs fins on et proposis i encara més lluny!

Als meus pares, Marisol i Carles, pel seu suport incondicional en totes les meves decisions, tant personals com professionals, pel seu esforç constant vetllant per la meva felicitat (que fàcilment que s'escriuen però quant impliquen aquestes paraules...!). I a la resta de la família, tiets, cosins (i els seus peques!) i avis, els que no han pogut veure la tesi acabada però que n'haurien estat orgullosos, i la iaia Xata, per cuidar-nos sempre tan i tan bé. També a la Carmen i la Montserrat, perquè sense ser ni Lozano ni Mena fa molts anys que són de la família i han seguit de prop tots els meus passos.

I a l'Alan. Per tantes coses... però sobretot per la paciència (sí, ho sé, et dec un monument!). Perquè sempre i en tot has estat al meu costat, perquè em dones seguretat i il·lusió a parts iguals. Aquesta etapa s'acaba, però en vindran d'altres que espero seguir gaudint amb tu.



## ÍNDEXS



<b>ÍNDEX</b> .....	I
<b>ÍNDEX DE FIGURES</b> .....	IX
<b>ÍNDEX DE TAULES</b> .....	XV
<b>ABREVIATURES</b> .....	XVII
<b>RESUM</b> .....	i
<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	1
1.1. L'ÀCID MASLÍNIC.....	1
1.1.1. Estructura i identificació .....	1
1.1.2. Biosíntesi.....	2
1.1.3. Funció a la planta .....	2
1.1.4. Fonts .....	3
1.1.5. Efectes biològics .....	4
1.1.5.1. Efecte antitumoral.....	4
a) Activitat antiproliferativa .....	4
b) Activitat proapoptòtica .....	5
c) Altres dianes de l'àcid maslínic en el càncer.....	9
d) Efecte antitumoral <i>in vivo</i> .....	10
1.1.5.2. Efecte antidiabètic.....	10
1.1.5.3. Efecte antioxidant i antiinflamatori.....	11
1.1.5.4. Efecte cardioprotector .....	12
1.1.5.5. Efecte neuroprotector .....	13
1.1.5.6. Efecte antiparasitari .....	14
1.1.5.7. Efecte sobre el creixement.....	15
1.1.5.8. Altres efectes biològics.....	16
1.2. ABSORCIÓ I METABOLISME INTESTINAL .....	16
1.2.1. Absorció intestinal .....	16
1.2.2. Tècniques per a l'estudi de l'absorció intestinal.....	17
1.2.2.1. Tècniques <i>in vitro</i> .....	17
1.2.2.2. Tècniques <i>ex vivo</i> .....	18
a) Cambres de Ussing.....	18
b) Sacs evertits .....	19
1.2.2.3. Tècniques <i>in situ</i> .....	19
1.2.2.4. Tècniques <i>in vivo</i> .....	19
1.2.3. Metabolisme .....	19
1.2.3.1. Fase 0.....	20
1.2.3.2. Fase I.....	20
1.2.3.3. Fase II.....	20
1.2.3.4. Fase III.....	21



1.3. CÀNCER COLORECTAL .....	22
1.3.1. Anatomia del còlon .....	22
1.3.2. Procés carcinogènic.....	23
1.3.3. Models animals de càncer colorectal.....	23
1.3.3.1. Càncer colorectal induït per agents químics .....	24
a) Activació metabòlics dels agents carcinògens .....	24
b) Efectes dels agents carcinògens .....	25
<b>2. OBJECTIUS .....</b>	<b>27</b>
<b>3. MATERIAL I MÈTODES .....</b>	<b>29</b>
3.1. DISSOLVENTS I REACTIUS .....	29
3.2. EQUIPS CROMATOGRÀFICS .....	29
3.3. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ.....	29
3.4. PREPARACIÓ DE SOLUCIONS D'ÀCID MASLÍNIC I D'ÀCID BETULÍNIC .....	30
3.4.1. Preparació de solucions estoc i solucions de treball d'àcid maslínic i d'àcid betulínic en metanol al 80%.....	30
3.4.2. Preparació de solucions d'àcid maslínic en (2-hidroxipropil)- $\beta$ -ciclodextrina .....	30
3.5. ESTUDI DE LA TOXICITAT DE L'ÀCID MASLÍNIC.....	31
3.5.1. Toxicitat aguda .....	31
3.5.2. Toxicitat subaguda .....	32
3.5.2.1. Anàlisi hematològica i bioquímica .....	32
3.5.2.2. Necròpsia .....	33
3.5.2.3. Anàlisi histopatològica .....	33
3.5.3. Expressió dels resultats, anàlisi estadística i obtenció d'imatges .....	33
3.6. POSADA A PUNT I VALIDACIÓ DE LA TÈCNICA DE CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDS D'ALTA EFICÀCIA PER A LA DETERMINACIÓ DE L'ÀCID MASLÍNIC EN PLASMA.....	33
3.6.1. Extracció de l'àcid maslínic del plasma .....	33
3.6.2. Determinació de l'àcid maslínic en el plasma per HPLC .....	34
3.6.2.1. Instrument i condicions analítiques.....	34
<i>Instrument</i> .....	34
<i>Condicions cromatogràfiques</i> .....	34
3.6.2.2. Quantificació de l'àcid maslínic i expressió dels resultats .....	34
3.6.3. Validació del mètode analític .....	35
<i>Recuperació</i> .....	35
<i>Precisió i exactitud</i> .....	35
<i>Linealitat</i> .....	36
<i>Sensibilitat</i> .....	36
<i>Selectivitat</i> .....	36

3.6.4. Determinació de l'àcid maslínic en el plasma després de la seva administració oral a rates .....	36
3.7. POSADA A PUNT I VALIDACIÓ DE LA TÈCNICA DE CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDS D'ALTA EFICÀCIA ACOBLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSES PER A LA DETERMINACIÓ DE L'ÀCID MASLÍNIC EN EL CONTINGUT INTESTINAL .....	37
3.7.1. Extracció de l'àcid maslínic del contingut intestinal .....	37
<i>Extracció de la fracció sòlida</i> .....	37
<i>Extracció de la fracció líquida</i> .....	37
3.7.2. Determinació de l'àcid maslínic en el contingut intestinal per HPLC-MS .....	38
3.7.2.1. Instrument i condicions analítiques .....	38
<i>Instrument</i> .....	38
<i>Condicions cromatogràfiques</i> .....	38
<i>Condicions de l'espectròmetre de masses</i> .....	38
3.7.2.2. Quantificació de l'àcid maslínic i expressió dels resultats .....	39
3.7.3. Validació del mètode analític .....	39
<i>Recuperació, efecte matriu i eficiència del procés</i> .....	40
<i>Precisió i exactitud</i> .....	40
<i>Linealitat</i> .....	41
<i>Sensibilitat</i> .....	41
<i>Selectivitat</i> .....	41
3.8. DETERMINACIÓ DE L'ÀCID MASLÍNIC I ELS SEUS METABÒLITS EN EL CONTINGUT INTESTINAL I EN EL PLASMA DESPRÉS DE L'ADMINISTRACIÓ ORAL DEL TRITERPÈ A RATES .....	41
3.8.1. Animals d'experimentació, disseny experimental i obtenció de mostres .....	41
3.8.2. Quantificació de l'àcid maslínic en el contingut del duodè i jejú, ili, cec i còlon per HPLC-MS .....	42
<i>Instrument i condicions analítiques</i> .....	42
<i>Quantificació de l'àcid maslínic</i> .....	42
3.8.3. Identificació dels metabòlits de l'àcid maslínic en el contingut dels diferents segments intestinals per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS .....	42
<i>Instrument</i> .....	42
<i>Condicions cromatogràfiques</i> .....	42
<i>Condicions de l'espectròmetre de masses</i> .....	42
<i>Processament de les dades</i> .....	43
3.8.4. Determinació de l'àcid maslínic en el plasma .....	43
<i>Extracció del plasma</i> .....	43
<i>Instrument i condicions analítiques</i> .....	43
<i>Quantificació de l'àcid maslínic</i> .....	44

3.9.	ESTUDI DE L'ABSORCIÓ INTESTINAL DE L'ÀCID MASLÍNIC.....	44
3.9.1.	Tècnica <i>ex vivo</i> dels sacs evertits .....	44
	<i>Obtenció dels sacs evertits</i> .....	44
	<i>Incubació dels sacs evertits i condicions experimentals</i> .....	45
	<i>Tractament de les mostres</i> .....	45
	<i>Determinació de l'àcid maslínic i els seus metabòlits</i> .....	46
	<i>Càlcul del transport net</i> .....	46
	<i>Expressió dels resultats i anàlisi estadística</i> .....	46
3.9.2.	Tècnica <i>in situ</i> de la perfusió intestinal .....	47
	<i>Preparació de l'animal</i> .....	47
	<i>Sistema de perfusió i condicions experimentals</i> .....	48
	<i>Estudi de la cinètica de transport intestinal de l'àcid maslínic</i> .....	49
	<i>Estudi del mecanisme de transport intestinal de l'àcid maslínic</i> .....	49
	<i>Tractament de les mostres</i> .....	50
	<i>Determinació de l'àcid maslínic i els seus metabòlits</i> .....	49
	<i>Càlcul de l'absorció intestinal</i> .....	50
	<i>Expressió dels resultats i anàlisi estadística</i> .....	50
3.10.	ESTUDI DE L'EFECTE DE L'ÀCID MASLÍNIC SOBRE LESIONS PRENEOPLÀSIQUES EN EL CÒLON DE RATA.....	51
3.10.1.	Animals d'experimentació i grups experimentals .....	51
3.10.2.	Sacrifici i obtenció de mostres .....	52
3.10.3.	Tincions histològiques per al recompte de lesions preneoplàsiques .....	53
	<i>Blau de metilè al 0,2% en PBS</i> .....	53
	<i>Solució de diamines i ferro, blau alcià i vermell neutre</i> .....	54
3.10.4.	Determinació de l'àcid maslínic en el contingut del còlon i en el plasma i identificació dels metabòlits en el contingut del còlon.....	55
3.10.5.	Expressió dels resultats, anàlisi estadística i captació d'imatges .....	56
<b>4.</b>	<b>RESULTATS</b> .....	57
4.1.	ESTUDI DE LA TOXICITAT DE L'ÀCID MASLÍNIC .....	57
4.1.1.	Toxicitat aguda .....	57
	4.1.1.1. Pes corporal .....	57
	4.1.1.2. Consum de pinso i aigua .....	57
	4.1.1.3. Eficiència de la conversió de l'aliment.....	57
	4.1.1.4. Necròpsia .....	58
4.1.2.	Toxicitat subaguda .....	58
	4.1.2.1. Pes corporal .....	58
	4.1.2.2. Consum de pinso i aigua .....	58
	4.1.2.3. Eficiència de la conversió de l'aliment.....	59

4.1.2.4. Anàlisi hematològica i bioquímica.....	59
4.1.2.5. Necròpsia.....	61
4.1.2.6. Anàlisi histopatològica .....	61
4.2. POSADA A PUNT I VALIDACIÓ DE LA TÈCNICA DE CROMATOGRÀFIA DE LÍQUIDS D'ALTA EFICÀCIA PER A LA DETERMINACIÓ DE L'ÀCID MASLÍNIC EN PLASMA.....	62
4.2.1. Optimització de les condicions cromatogràfiques.....	62
<i>Fase mòbil</i> .....	62
<i>Tipus d'elució</i> .....	64
<i>Flux</i> .....	65
<i>Temperatura de la columna</i> .....	65
<i>Longitud d'ona del detector</i> .....	65
4.2.2. Validació de l'instrument.....	65
<i>Precisió</i> .....	66
<i>Linealitat</i> .....	66
<i>Sensibilitat</i> .....	66
4.2.3. Optimització del procés d'extracció de l'àcid maslínic del plasma.....	66
<i>Extracció en fase sòlida</i> .....	66
<i>Extracció líquid-líquid</i> .....	67
4.2.4. Validació del mètode analític.....	67
<i>Recuperació</i> .....	68
<i>Precisió i exactitud</i> .....	68
<i>Linealitat</i> .....	68
<i>Sensibilitat</i> .....	68
<i>Selectivitat</i> .....	68
4.2.5. Determinació de l'àcid maslínic en el plasma després de la seva administració oral a rates.....	69
<i>Determinació de l'àcid maslínic en el plasma</i> .....	69
<i>Anàlisi farmacocinètica</i> .....	69
4.3. POSADA A PUNT I VALIDACIÓ DE LA TÈCNICA DE CROMATOGRÀFIA DE LÍQUIDS D'ALTA EFICÀCIA ACOBLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSES PER A LA DETERMINACIÓ D'ÀCID MASLÍNIC EN EL CONTINGUT INTESTINAL .....	71
4.3.1. Optimització del mètode d'extracció .....	71
4.3.2. Validació del mètode analític.....	71
<i>Recuperació, efecte matriu i eficiència del procés</i> .....	72
<i>Precisió i exactitud</i> .....	72
<i>Linealitat</i> .....	73
<i>Sensibilitat</i> .....	74
<i>Selectivitat</i> .....	74

4.4.	DETERMINACIÓ DE L'ÀCID MASLÍNIC I ELS SEUS METABÒLITS EN EL CONTINGUT INTESTINAL I EN EL PLASMA DESPRÉS DE L'ADMINISTRACIÓ ORAL DEL TRITERPÈ A RATES .....	75
4.4.1.	Quantificació de l'àcid maslínic en el contingut de duodè i jejú, ili, cec i còlon per HPLC-MS .....	75
4.4.2.	Identificació dels metabòlits de l'àcid maslínic en el contingut dels diferents segments intestinals per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS .....	75
4.4.3.	Determinació de l'àcid maslínic en el plasma .....	82
4.5.	ESTUDI DE L'ABSORCIÓ INTESTINAL DE L'ÀCID MASLÍNIC.....	82
4.5.1.	Tècnica <i>ex vivo</i> dels sacs evertits .....	82
4.5.1.1.	Optimització de la solubilització de l'àcid maslínic en el medi d'incubació.....	82
4.5.1.2.	Estudi de l'estabilitat de l'àcid maslínic en el medi d'incubació.....	83
4.5.1.3.	Pas de l'àcid maslínic a través de la paret intestinal .....	83
a)	Medi mucosal amb àcid maslínic (100 µM) i medi serosal sense àcid maslínic .....	83
	<i>Transport net de l'àcid maslínic</i> .....	83
	<i>Recuperació de l'àcid maslínic</i> .....	83
	<i>Determinació dels metabòlits de l'àcid maslínic</i> .....	84
b)	Medi mucosal i medi serosal amb àcid maslínic (100 µM) .....	85
	<i>Transport net de l'àcid maslínic</i> .....	85
	<i>Recuperació de l'àcid maslínic</i> .....	85
	<i>Determinació dels metabòlits de l'àcid maslínic</i> .....	86
4.5.2.	Tècnica <i>in situ</i> de la perfusió intestinal .....	86
4.5.2.1.	Cinètica d'absorció intestinal de l'àcid maslínic .....	87
4.5.2.2.	Estudi del mecanisme d'absorció de l'àcid maslínic.....	87
4.5.2.3.	Determinació dels metabòlits de l'àcid maslínic .....	88
4.6.	ESTUDI DE L'EFECTE DE L'ÀCID MASLÍNIC SOBRE LESIONS PRENEOPLÀSIQUES INDUÏDES EN EL CÒLON DE RATA .....	89
4.6.1.	Pes corporal.....	89
4.6.2.	Consum de pinso i aigua .....	90
4.6.3.	Eficiència de la conversió de l'aliment .....	92
4.6.4.	Dades morfològiques del còlon.....	93
4.6.5.	Recompte de lesions preneoplàsiques .....	97
4.6.5.1.	Focus de criptes aberrants.....	98
4.6.5.2.	Focus de criptes amb depleció de mucines .....	101
4.6.6.	Determinació d'àcid maslínic en el contingut del còlon i en el plasma .....	103
4.6.6.1.	Identificació dels metabòlits de l'àcid maslínic en el contingut del còlon.....	105

<b>5. DISCUSSIÓ</b> .....	111
<b>6. CONCLUSIONS</b> .....	129
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	131
<b>ANNEX I</b> .....	149
<b>ANNEX II</b> .....	187
<b>ANNEX III</b> .....	225



## ÍNDIX DE FIGURES

<b>Figura 1.1.</b> Al centre, estructura química de l'àcid maslínic. A l'esquerra, branca amb flors i fruits del <i>Crataegus oxyacantha</i> L., la primera espècie de la qual es va aïllar el compost; a la dreta, l' <i>Olea europaea</i> L., en la qual s'han trobat elevades quantitats d'àcid maslínic tant en les fulles com en els fruits .....	1
<b>Figura 1.2.</b> Ruta biosintètica dels triterpens no esteroïdals en el fruit de l' <i>Olea europaea</i> L.....	2
<b>Figura 1.3.</b> Cascades de senyalització implicades en la via apoptòtica mitocondrial o intrínseca.....	6
<b>Figura 1.4.</b> Cascades metabòliques implicades en la via apoptòtica extrínseca o mediada per receptors de mort cel·lular.....	7
<b>Figura 1.5.</b> Vies d'absorció intestinal de compostos, paracel·lular (A–B) i transcel·lular (C–D) ...	16
<b>Figura 1.6.</b> Fases de l'eliminació de xenobiòtics en una cèl·lula mitjançant reaccions metabòliques de fase I i II i transport a través de membranes (fases 0 i III).....	21
<b>Figura 1.7.</b> Estructura de la paret del còlon.....	22
<b>Figura 1.8.</b> Via metabòlica de la DMH i l'AOM que condueix a la formació de derivats actius....	25
<b>Figura 1.9.</b> Alteracions fenotípiques que es produeixen durant el desenvolupament del càncer de còlon induït per DMH o AOM en rata.....	25
<b>Figura 3.1.</b> Estructura química de l'àcid betulínic, emprat com a patró intern per a la determinació de l'àcid maslínic en el contingut intestinal per HPLC-MS.....	39
<b>Figura 3.2.</b> Col·locació de les cànules d'entrada (A) i de sortida (B) en el segment de jejú de la rata .....	47
<b>Figura 3.3.</b> Imatge del sistema de perfusió en funcionament .....	48
<b>Figura 3.4.</b> Esquema del disseny experimental per a l'estudi de l'activitat quimiopreventiva de l'àcid maslínic sobre lesions preneoplàsiques induïdes en el còlon de rata .....	51
<b>Figura 3.5.</b> Superfície de la mucosa del còlon tenyida amb blau de metilè, sense lesions preneoplàsiques (A) i amb un focus de 3 criptes aberrants (B) .....	54
<b>Figura 3.6.</b> Superfície de la mucosa del còlon tenyida amb les solucions de diamines i ferro, blau alcí i vermell neutre, sense lesions (A) i amb un focus de 4 criptes amb depleció de mucines (B).....	55
<b>Figura 4.1.</b> Evolució diària del pes corporal dels ratolins control i dels ratolins que han rebut una dosi única d'1 g/kg d'àcid maslínic.....	57
<b>Figura 4.2.</b> Eficiència de la conversió de l'aliment dels animals inclosos en l'estudi de la toxicitat aguda.....	57



<b>Figura 4.3.</b> Pes relatiu dels principals òrgans dels animals inclosos en l'estudi de la toxicitat aguda .....	58
<b>Figura 4.4.</b> Evolució diària del pes corporal dels ratolins control i dels ratolins tractats amb àcid maslínic (50 mg/kg) durant 28 dies.....	58
<b>Figura 4.5.</b> Eficiència de la conversió de l'aliment dels animals inclosos en l'estudi de la toxicitat subaguda .....	59
<b>Figura 4.6.</b> Pes relatiu dels principals òrgans dels ratolins control i dels ratolins als quals s'ha administrat àcid maslínic (50 mg/kg) durant 28 dies .....	61
<b>Figura 4.7.</b> Microfotografies de talls histològics dels principals òrgans tenyits amb hematoxilina/eosina i observats al microscopi òptic .....	62
<b>Figura 4.8.</b> (A) Cromatograma d'un patró d'àcid maslínic 250 µM en metanol al 80% analitzat per HPLC usant com a fase orgànica metanol al 100%. (B) Cromatograma d'un control (aigua) analitzat immediatament després que el patró anterior; la fletxa assenyala el pic corresponent a restes d'àcid maslínic que no han eluït completament de la columna. (C) Cromatograma d'un patró d'àcid maslínic 250 µM en metanol al 80% analitzat per HPLC usant com a fase orgànica acetonitril al 100% i (D) un control analitzat just després.....	63
<b>Figura 4.9.</b> Linealitat de l'instrument d'HPLC per a la determinació de l'àcid maslínic .....	66
<b>Figura 4.10.</b> Linealitat del mètode analític per a la determinació de l'àcid maslínic en el plasma per HPLC.....	68
<b>Figura 4.11.</b> Cromatograma d'una mostra de plasma blanc (blau fosc) superposat amb el cromatograma d'una mostra de plasma blanc al qual s'ha afegit àcid maslínic a una concentració de 25 µM (blau clar).....	69
<b>Figura 4.12.</b> Cromatograma d'una mostra de plasma obtingut 60 min després de l'administració oral d'una dosi de 50 mg/kg d'àcid maslínic a rata .....	69
<b>Figura 4.13.</b> (A) Concentracions plasmàtiques mitjanes d'àcid maslínic després de l'administració oral d'una dosi de 50 mg/kg del triterpè a rata (n = 2-3/temps); la línia contínua correspon a la corba predita pel model matemàtic. (B) Distribució dels residuals ponderats enfront del temps.....	70
<b>Figura 4.14.</b> Comparació de les rectes patró preparades en extracte metanòlic del contingut intestinal (fracció sòlida) (A) i en extracte metanòlic del PBS (fracció líquida) (B).....	73
<b>Figura 4.15.</b> Linealitat del mètode analític per a la determinació de l'àcid maslínic en el contingut intestinal per HPLC-MS.....	74
<b>Figura 4.16.</b> Selectivitat del mètode analític per a l'àcid maslínic (A) i per al patró intern (àcid betulínic) (B) .....	74
<b>Figura 4.17.</b> Concentració d'àcid maslínic en el contingut dels diferents segments intestinals després de l'administració oral a rates durant dos dies consecutius.....	75

<b>Figura 4.18.</b> Cromatograma corresponent a l' $m/z$ de l'àcid maslínic (471,3) obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS representatiu del contingut de diferents segments intestinals de rates a les quals s'ha administrat el triterpè a una dosi de 5 mg/kg per via oral durant 2 dies consecutius .....	76
<b>Figura 4.19.</b> Cromatograma corresponent a l' $m/z$ de 487,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS representatiu del contingut de diferents segments intestinals de rates a les quals s'ha administrat el triterpè a una dosi de 5 mg/kg per via oral durant 2 dies consecutius	77
<b>Figura 4.20.</b> Cromatograma corresponent a l' $m/z$ de 485,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS representatiu del contingut de diferents segments intestinals de rates a les quals s'ha administrat el triterpè a una dosi de 5 mg/kg per via oral durant 2 dies consecutius	78
<b>Figura 4.21.</b> Cromatograma corresponent a l' $m/z$ de 503,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS representatiu del contingut de diferents segments intestinals de rates a les quals s'ha administrat el triterpè a una dosi de 5 mg/kg per via oral durant 2 dies consecutius	78
<b>Figura 4.22.</b> Cromatograma corresponent a l' $m/z$ de 501,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS representatiu del contingut de diferents segments intestinals de rates a les quals s'ha administrat el triterpè a una dosi de 5 mg/kg per via oral durant 2 dies consecutius	79
<b>Figura 4.23.</b> Cromatograma corresponent a l' $m/z$ de 469,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS representatiu del contingut de diferents segments intestinals de rates a les quals s'ha administrat el triterpè a una dosi de 5 mg/kg per via oral durant 2 dies consecutius	80
<b>Figura 4.24.</b> Abundància relativa de l'àcid maslínic i els diferents metabòlits identificats en el contingut de l'ili de rates que han rebut àcid maslínic a una dosi de 5 mg/kg durant 2 dies consecutius.....	81
<b>Figura 4.25.</b> Abundància relativa de l'àcid maslínic i els metabòlits identificats en el contingut del cec de rates que han rebut àcid maslínic (5 mg/kg) durant 2 dies consecutius .....	81
<b>Figura 4.26.</b> Abundància relativa de l'àcid maslínic i els metabòlits identificats en el contingut del còlon de rates que han rebut àcid maslínic (5 mg/kg) durant 2 dies consecutius .....	82
<b>Figura 4.27.</b> Concentracions d'àcid maslínic en plasma després de l'administració del triterpè per via oral a rates durant dos dies consecutius.....	82
<b>Figura 4.28.</b> Concentracions inicial i final d'àcid maslínic en els medis mucosal i serosal i en el teixit de sacs evertits incubats en medi mucosal amb àcid maslínic a 100 $\mu$ M i medi serosal a 0 $\mu$ M .....	83
<b>Figura 4.29.</b> Concentracions dels metabòlits que han aparegut en els medis mucosal i serosal, així com també en el teixit, després de la incubació dels sacs en medi mucosal amb àcid maslínic a 100 $\mu$ M i medi serosal amb 0 $\mu$ M .....	84

<b>Figura 4.30.</b> Concentracions inicial i final d'àcid maslínic en el medi mucosal i serosal, així com també en el teixit, de sacs evertits incubats en medis mucosal i serosal que contenen, ambdós, àcid maslínic a 100 µM .....	85
<b>Figura 4.31.</b> Concentracions dels metabòlits que han aparegut en els medis mucosal i serosal, així com també en el teixit, després de la incubació dels sacs en medis mucosal i serosal que contenen, ambdós, àcid maslínic a 100 µM.....	86
<b>Figura 4.32.</b> Cromatogrames representatius de medi de perfusió amb àcid maslínic 5 µM abans (blau fosc) i després (blau clar) de la perfusió d'un segment de jejú de rata .....	86
<b>Figura 4.33.</b> Cinètica de desaparició de l'àcid maslínic del medi de perfusió .....	87
<b>Figura 4.34.</b> Desaparició de l'àcid maslínic del medi de perfusió, amb i sense DNP (1 mM).....	87
<b>Figura 4.35.</b> Aparició del derivat M5 de l'àcid maslínic en les solucions perfundides .....	88
<b>Figura 4.36.</b> Aparició dels derivats M2 (A) i M3 (B) de l'àcid maslínic en les solucions perfundides.....	88
<b>Figura 4.37.</b> Evolució setmanal del pes corporal de les rates mascles incloses en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 5 mg/kg .....	89
<b>Figura 4.38.</b> Evolució setmanal del pes corporal de les rates mascles incloses en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 10 mg/kg .....	89
<b>Figura 4.39.</b> Evolució setmanal del pes corporal de les rates mascles incloses en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 25 mg/kg .....	90
<b>Figura 4.40.</b> Evolució setmanal del pes corporal de les rates femelles incloses en l'estudi de l'activitat quimiopreventiva de l'àcid maslínic a dosis de 5, 10 i 25 mg/kg.....	90
<b>Figura 4.41.</b> Consum de pinso setmanal de les rates mascles incloses en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 5 mg/kg .....	91
<b>Figura 4.42.</b> Consum de pinso setmanal de les rates mascles incloses en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 10 mg/kg .....	91
<b>Figura 4.43.</b> Consum de pinso setmanal de les rates mascles incloses en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 25 mg/kg .....	92
<b>Figura 4.44.</b> Evolució setmanal del consum de pinso de les rates femelles incloses en l'estudi de l'activitat quimiopreventiva de l'àcid maslínic a dosis de 5, 10 i 25 mg/kg.....	92
<b>Figura 4.45.</b> Eficiència de la conversió de l'aliment de les rates mascles incloses en l'estudi de l'activitat quimiopreventiva de l'àcid maslínic .....	93
<b>Figura 4.46.</b> Eficiència de la conversió de l'aliment en les rates femelles .....	93
<b>Figura 4.47.</b> Recompte dels focus de criptes aberrants (FCA) normalitzats per àrea en el còlon total de les rates mascles.....	98

<b>Figura 4.48.</b> Recompte dels focus de criptes aberrants (FCA) normalitzats per àrea en els diferents segments del còlon de les rates mascles.....	98
<b>Figura 4.49.</b> Recompte dels focus de criptes aberrants (FCA) normalitzats per àrea en el còlon de les rates mascles, representat en funció del nombre de criptes presents en cada lesió .....	99
<b>Figura 4.50.</b> Recompte dels focus de criptes aberrants (FCA) normalitzats per àrea en el còlon total de les rates femelles .....	99
<b>Figura 4.51.</b> Recompte dels focus de criptes aberrants (FCA) normalitzats per àrea en els diferents segments del còlon de les rates femelles .....	100
<b>Figura 4.52.</b> Recompte dels focus de criptes aberrants (FCA) normalitzats per àrea en el còlon de les rates femelles, representat en funció del nombre de criptes presents en cada lesió .....	100
<b>Figura 4.53.</b> Recompte dels focus de criptes amb depleció de mucines (FDM) normalitzats per àrea en el còlon total de les rates mascles .....	101
<b>Figura 4.54.</b> Recompte dels focus de criptes amb depleció de mucines (FDM) normalitzats per àrea en els diferents segments del còlon de les rates mascles .....	101
<b>Figura 4.55.</b> Recompte dels focus de criptes amb depleció de mucines (FDM) normalitzats per àrea en el còlon de les rates mascles, representat en funció del nombre de criptes presents en cada lesió.....	102
<b>Figura 4.56.</b> Recompte dels focus de criptes amb depleció de mucines (FDM), normalitzats per àrea, en el còlon total de les rates femelles .....	102
<b>Figura 4.57.</b> Recompte dels focus de criptes amb depleció de mucines (FDM) normalitzats per àrea en els diferents segments del còlon de les rates femelles .....	103
<b>Figura 4.58.</b> Recompte dels focus de criptes amb depleció de mucines (FDM) normalitzats per àrea en el còlon de les rates femelles, representat en funció del nombre de criptes presents en cada lesió.....	103
<b>Figura 4.59.</b> Concentracions d'àcid maslínic en el contingut del còlon i en el plasma de les rates mascles (A i B) i de les rates femelles (C i D) incloses en l'estudi de l'activitat quimiopreventiva del triterpè.....	104
<b>Figura 4.60.</b> Cromatograma corresponent a l' $m/z$ de l'àcid maslínic (471,3) obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS després de l'anàlisi d'una mostra de contingut de còlon procedent d'una rata la qual se li ha administrat el triterpè a una dosi de 10 mg/kg per via oral durant 49 dies .....	105
<b>Figura 4.61.</b> Cromatograma corresponent a l' $m/z$ de 487,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS després de l'anàlisi d'una mostra de contingut de còlon procedent d'una rata la qual se li ha administrat el triterpè a una dosi de 10 mg/kg per via oral durant 49 dies .....	106

- Figura 4.62.** Cromatograma corresponent a l' $m/z$  de 485,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS després de l'anàlisi d'una mostra de contingut de còlon procedent d'una rata la qual se li ha administrat el triterpè a una dosi de 10 mg/kg per via oral durant 49 dies.....106
- Figura 4.63.** Cromatograma corresponent a l' $m/z$  de 503,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS després de l'anàlisi d'una mostra de contingut de còlon procedent d'una rata la qual se li ha administrat el triterpè a una dosi de 10 mg/kg per via oral durant 49 dies.....107
- Figura 4.64.** Cromatograma corresponent a l' $m/z$  de 501,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS després de l'anàlisi d'una mostra de contingut de còlon procedent d'una rata la qual se li ha administrat el triterpè a una dosi de 10 mg/kg per via oral durant 49 dies.....108
- Figura 4.65.** Cromatograma corresponent a l' $m/z$  de 469,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS després de l'anàlisi d'una mostra de contingut de còlon procedent d'una rata la qual se li ha administrat el triterpè a una dosi de 10 mg/kg per via oral durant 49 dies.....108
- Figura 4.66.** Abundància relativa de l'àcid maslínic i els metabòlits identificats en el contingut del còlon de rates que han rebut el triterpè (10 mg/kg) per via oral durant 49 dies.....109

## ÍNDIX DE TAULES

<b>Taula 1.1.</b> Fonts alimentàries d'àcid maslínic .....	3
<b>Taula 1.2.</b> Efecte antiproliferatiu (CI <sub>50</sub> ) de l'àcid maslínic en les diferents línies cel·lulars en les quals ha estat demostrat .....	8
<b>Taula 3.1.</b> Gradient d'elució de la fase mòbil per a la determinació de l'àcid maslínic per HPLC .....	34
<b>Taula 3.2.</b> Gradient d'elució de la fase mòbil per a la determinació de l'àcid maslínic per HPLC-MS.....	38
<b>Taula 3.3.</b> Paràmetres de la font d'APCI per a la determinació de l'àcid maslínic per HPLC-MS..	38
<b>Taula 3.4.</b> Paràmetres de la font d'APCI per a la determinació de l'àcid maslínic per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS .....	43
<b>Taula 3.5.</b> Composició salina dels medis d'incubació per als experiments en sacs intestinals evertits .....	45
<b>Taula 3.6.</b> Grups experimentals inclosos en els estudis de l'activitat quimiopreventiva de l'àcid maslínic en rates mascles i femelles .....	52
<b>Taula 4.1.</b> Variables hematològiques dels ratolins control i dels ratolins als quals s'ha administrat diàriament àcid maslínic (50 mg/kg) durant 28 dies .....	60
<b>Taula 4.2.</b> Variables bioquímiques dels ratolins control i dels ratolins als quals s'ha administrat diàriament àcid maslínic (50 mg/kg) durant 28 dies .....	60
<b>Taula 4.3.</b> Gradients d'elució assajats en l'optimització de les condicions cromatogràfiques per a la determinació de l'àcid maslínic per HPLC .....	64
<b>Taula 4.4.</b> Efecte de la longitud d'ona del detector sobre l'àrea del pic d'àcid maslínic.....	65
<b>Taula 4.5.</b> Precisió de l'instrument d'HPLC per a la determinació de l'àcid maslínic .....	66
<b>Taula 4.6.</b> Recuperació, precisió i exactitud del mètode analític per a la determinació de l'àcid maslínic en plasma per HPLC.....	68
<b>Taula 4.7.</b> Paràmetres farmacocinètics de l'àcid maslínic estimats seguint una aproximació monocompartimental després de l'administració oral del triterpè (50 mg/kg) a rata, els seus valors i unitats i la precisió de l'estimació.....	70
<b>Taula 4.8.</b> Recuperació, efecte matriu i eficiència del procés per a la determinació de l'àcid maslínic en contingut intestinal per HPLC-MS .....	72
<b>Taula 4.9.</b> Precisió intradia i interdia i exactitud del mètode analític per a la determinació d'àcid maslínic en contingut intestinal per HPLC-MS.....	73

<b>Taula 4.10.</b> Metabòlits de l'àcid maslínic identificats mitjançant HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS en el contingut de diferents segments intestinals de rata després de l'administració oral del triterpè durant dos dies consecutius a una dosi de 5 mg/kg .....	80
<b>Taula 4.11.</b> Quantitats inicial i final d'àcid maslínic en el medi mucosal i serosal i en el teixit de sacs evertits incubats en un medi mucosal amb àcid maslínic a 100 µM i un medi serosal sense àcid maslínic .....	84
<b>Taula 4.12.</b> Quantitats inicial i final d'àcid maslínic en el medi mucosal i serosal, així com també en el teixit, de sacs evertits incubats en medis mucosal i serosal que contenen, ambdós, àcid maslínic a 100 µM .....	85
<b>Taula 4.13.</b> Dades morfològiques dels segments de còlon de les rates mascles incloses en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 5 mg/kg.....	94
<b>Taula 4.14.</b> Dades morfològiques dels segments de còlon de les rates mascles incloses en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 10 mg/kg.....	95
<b>Taula 4.15.</b> Dades morfològiques dels segments de còlon de les rates mascles incloses en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 25 mg/kg.....	96
<b>Taula 4.16.</b> Dades morfològiques dels segments de còlon de les rates femelles incloses en l'estudi de l'activitat quimiopreventiva de l'àcid maslínic .....	97
<b>Taula 4.17.</b> Metabòlits de l'àcid maslínic identificats mitjançant HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS en el contingut del còlon després de l'administració diària del triterpè a una dosi de 10 mg/kg durant 49 dies.....	109

## ABREVIATURES





ABC	Acrònim de l'anglès <i>ATP-binding cassette</i> , lloc d'unió a l'ATP
ADN	Àcid desoxiribonucleic
AGC	Acrònim de l'anglès <i>automatic gain control</i> , control del guany automàtic
AIC	Acrònim de l'anglès <i>Akaike information criterion</i> , criteri d'informació d'Akaike
ALP	Acrònim de l'anglès <i>alkaline phosphatase</i> , fosfatasa alcalina
ALT	Acrònim de l'anglès <i>alanine aminotransferase</i> , alanina aminotransferasa
AOM	Azoximetà
APCI	Acrònim de l'anglès <i>atmospheric pressure chemical ionization</i> , ionització química a pressió atmosfèrica
APPI	Acrònim de l'anglès <i>atmospheric pressure photoionization</i> , fotoionització a pressió atmosfèrica
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
AST	Acrònim de l'anglès <i>aspartate aminotransferase</i> , aspartat aminotransferasa
ATP	Acrònim de l'anglès <i>adenosine triphosphate</i> , adenosina trifosfat
CI <sub>50</sub>	Concentració inhibidòria 50
CMC	Carboximetilcel·lulosa sòdica
COX-2	Acrònim de l'anglès <i>cyclooxygenase-2</i> , ciclooxigenasa-2
DL <sub>50</sub>	Dosi letal 50
DMH	1,2-Dimetilhidrazina
DNP	2,4-Dinitrofenol
DP	Acrònim de l'anglès <i>declustering potential</i> , potencial de desagregació
EDTA	Acrònim de l'anglès <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , àcid etildiaminotetraacètic
EGF	Acrònim de l'anglès <i>epidermal growth factor</i> , factor de creixement epidèrmic
EP	Acrònim de l'anglès <i>entrance potential</i> , potencial d'entrada
ESI	Acrònim de l'anglès <i>electrospray ionization</i> , ionització per electroesprai
FCA	Focus de criptes aberrants
FDM	Focus amb depleció de mucines
FP	Acrònim de l'anglès <i>focusing potential</i> , potencial d'enfocament
GC	Acrònim de l'anglès <i>gas chromatography</i> , cromatografia de gasos
GC-FID	Acrònim de l'anglès <i>gas chromatography with flame ionization detector</i> , cromatografia de gasos amb detector de ionització de flama
GC-MS	Acrònim de l'anglès <i>gas chromatography coupled to mass spectrometry</i> , cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses
GLAST	Acrònim de l'anglès <i>glutamate aspartate transporter</i> , transportador de glutamat i aspartat
GLT1	Acrònim de l'anglès <i>glutamate transporter 1</i> , transportador de glutamat 1

GLUT2	Acrònim de l'anglès <i>glucose transporter 2</i> , transportador de glucosa 2
GP	Acrònim de l'anglès <i>glycogen phosphorylase</i> , glucogen fosforilasa
GSK3 $\beta$	Acrònim de l'anglès <i>glycogen synthase kinase 3<math>\beta</math></i> , glucogen sintasa quinasa 3 $\beta$
HDL	Acrònim de l'anglès <i>high density lipoproteins</i> , lipoproteïnes d'alta densitat
HIF-1 $\alpha$	Acrònim de l'anglès <i>hypoxia-inducible factor 1<math>\alpha</math></i> , factor induïble per hipòxia 1 $\alpha$
HPBCD	(2-Hidroxiopropil)- $\beta$ -ciclodextrina
HPLC	Acrònim de l'anglès <i>high performance liquid chromatography</i> , cromatografia de líquids d'alta eficàcia
HPLC-MS	Acrònim de l'anglès <i>high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i> , cromatografia de líquids d'alta eficàcia acoblada a espectrometria de masses
IAP	Acrònim de l'anglès <i>inhibitor of apoptosis proteins</i> , inhibidor de proteïnes de l'apoptosi
IKK	Acrònim de l'anglès <i>I<math>\kappa</math>B kinase</i> , quinasa de l'I $\kappa$ B
iNOS	Acrònim de l'anglès <i>inducible nitric oxide synthase</i> , sintasa induïble de l'òxid nítric
IR $\beta$	Acrònim de l'anglès <i>insulin receptor <math>\beta</math></i> , receptor $\beta$ de la insulina
JNK	Acrònim de l'anglès <i>c-Jun N-terminal kinase</i> , quinasa c-Jun N-terminal
LC-MS	Acrònim de l'anglès <i>liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i> , cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses
LDH	Lactat deshidrogenasa
LDL	Acrònim de l'anglès <i>low density lipoproteins</i> , lipoproteïnes de baixa densitat
LOD	Acrònim de l'anglès <i>limit of detection</i> , límit de detecció
LOQ	Acrònim de l'anglès <i>limit of quantification</i> , límit de quantificació
LPS	Lipopolisacàrid
LTQ- Orbitrap	Acrònim de l'anglès <i>hybrid linear ion trap/Orbitrap analyzer</i> , analitzador híbrid de trampa de ions lineal/Orbitrap
MAPK	Acrònim de l'anglès <i>mitogen-activated protein kinase</i> , proteïna quinasa activada per mitògens
MMP	Acrònim de l'anglès <i>matrix metalloproteinase</i> , metal·loproteïnasa de la matriu
MRP1	Acrònim de l'anglès <i>multidrug resistance-associated protein 1</i> , proteïna associada a la resistència a múltiples fàrmacs 1
NMR	Acrònim de l'anglès <i>nuclear magnetic resonance</i> , ressonància magnètica nuclear
NO	Acrònim de l'anglès <i>nitric oxide</i> , òxid nítric
OAT	Acrònim de l'anglès <i>organic anion transporter</i> , transportador d'anions orgànics
OATP	Acrònim de l'anglès <i>organic anion transporting polypeptide</i> , polipèptid transportador d'anions orgànics

---

OCT	Acrònim de l'anglès <i>organic cation transporter</i> , transportador de cations orgànics
PBS	Acrònim de l'anglès <i>phosphate-buffered saline</i> , tampó fosfat salí
P-gp (MDR1)	Acrònim de l'anglès <i>P-glycoprotein (multidrug resistance protein 1)</i> , glucoproteïna-P (proteïna de resistència a múltiples fàrmacs 1)
PTFE	Acrònim de l'anglès <i>polytetrafluoroethylene</i> , politetrafluoroetilè
ROS	Acrònim de l'anglès <i>reactive oxygen species</i> , espècies reactives d'oxigen
SGLT1	Acrònim de l'anglès <i>sodium-glucose cotransporter 1</i> , cotransportador sodi-glucosa 1
SIM	Acrònim de l'anglès <i>single ion monitoring</i> , monitorització d'un ió seleccionat
SLC	Acrònim de l'anglès <i>solute carrier</i> , transportador de soluts
TEER	Acrònim de l'anglès <i>transepithelial electrical resistance</i> , resistència elèctrica transepitelial
TNFR	Acrònim de l'anglès <i>tumor necrosis factor receptor</i> , receptor del factor de necrosi tumoral
TNF- $\alpha$	Acrònim de l'anglès <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> , factor de necrosi tumoral $\alpha$
UGT	Acrònim de l'anglès <i>uridine-diphosphate-glucuronosyl-transferase</i> , uridin-difosfat-glucuronosil transferasa
uPA	Acrònim de l'anglès <i>urokinase-type plasminogen activator</i> , activador del plasminogen de tipus uroquinasa
UV	Ultraviolat
VEGF	Acrònim de l'anglès <i>vascular endothelial growth factor</i> , factor de creixement endotelial vascular
VLDL	Acrònim de l'anglès <i>very low density lipoproteins</i> , lipoproteïnes de molt baixa densitat



**RESUM**



L'àcid maslínic és un component bioactiu present en un ampli ventall de fonts naturals, des de plantes emprades en medicina tradicional asiàtica fins a fruites i verdures de consum habitual en el marc de la dieta mediterrània. Entre altres efectes biològics atribuïts a aquest triterpè pentacíclic destaquen l'antitumoral, antidiabètic, antioxidant, neuroprotector i antiparasitari. Actualment, però, són pocs els estudis que han caracteritzat l'àcid maslínic *in vivo*. Per aquest motiu, els objectius de la present tesi han inclòs l'avaluació de la seguretat d'aquest compost després de la seva administració oral així com també l'estudi de la seva absorció intestinal, lligada amb les concentracions que s'assoleixen tant en plasma com en la llum intestinal i amb el seu efecte sobre lesions preneoplàsiques en còlon. L'assaig de toxicitat subaguda ha posat de manifest que l'administració oral repetida d'àcid maslínic (50 mg/kg) a ratolins durant 28 dies no provoca alteracions en el pes corporal ni en les variables hematològiques i bioquímiques. L'anàlisi histopatològica dels principals òrgans tampoc no ha evidenciat signes de toxicitat derivats de l'exposició al triterpè. Un cop establerta l'absència d'efectes adversos s'ha desenvolupat un mètode de cromatografia de líquids d'alta eficàcia (HPLC) per a la determinació de l'àcid maslínic en plasma de rata, mitjançant el qual aquest compost s'ha quantificat fins a 60 min després de la seva administració oral (50 mg/kg). Les concentracions plasmàtiques s'han ajustat a un model farmacocinètic monocompartimental, a partir del qual s'ha estimat una  $C_{max}$  de 3,74  $\mu\text{M}$  i una  $T_{max}$  de 18,0 min. Seguidament s'ha optimitzat i validat un mètode d'HPLC acoblada a espectrometria de masses (HPLC-MS) per a la determinació de l'àcid maslínic en el contingut intestinal de rata. El mètode s'ha aplicat a mostres obtingudes d'animals que han rebut el triterpè (1, 2 o 5 mg/kg) per via oral durant dos dies consecutius i s'ha vist que la major concentració es troba en el cec, seguit del còlon i l'ili. A més, mitjançant espectrometria de masses d'alta resolució (HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS) també s'han identificat els principals metabòlits de l'àcid maslínic en aquestes mostres. El triterpè és sotmès a reaccions de fase I, concretament hidroxilacions i deshidrogenacions en diferents combinacions que donen lloc a onze derivats. L'estudi de l'absorció intestinal de l'àcid maslínic emprant la tècnica dels sacs evertits i la perfusió en jejú de rata ha mostrat que el compost travessa la paret intestinal per difusió simple, sense implicació de mecanismes de transport actiu, amb una constant aparent de difusió ( $K_d$ ) de 6,95  $\mu\text{L}/5 \text{ min}\cdot\text{mg}$  pes sec, indicativa d'una baixa absorció. Així, donat que el còlon és un dels teixits diana de l'àcid maslínic, se n'ha avaluat l'activitat quimiopreventiva en rata en un model de lesions preneoplàsiques induïdes per 1,2-dimetilhidrazina. El tractament amb el triterpè a diferents dosis oral (5, 10 o 25 mg/kg) durant 49 dies, tant en mascles com en femelles, ha reduït l'aparició de focus de criptes aberrants en un 22–35% i un 21–29%, respectivament. En resum, els resultats obtinguts en la present tesi doctoral evidencien que l'àcid maslínic pot administrar-se per via oral amb seguretat, que la seva absorció intestinal té lloc per un procés de difusió simple i que administrat com a ingredient funcional o nutraceutic podria exercir, entre altres, un efecte protector durant les primeres etapes del desenvolupament del càncer de còlon.





El ácido maslínico es un componente bioactivo presente en una gran variedad de fuentes naturales, desde plantas usadas en medicina tradicional asiática hasta frutas y verduras de consumo habitual en la dieta mediterránea. Entre otros efectos biológicos atribuidos a este triterpeno pentacíclico destacan el antitumoral, antidiabético, antioxidante, neuroprotector y antiparasitario, si bien pocos estudios han caracterizado el ácido maslínico *in vivo*. Por este motivo, los objetivos de la presente tesis doctoral han incluido la evaluación de la seguridad después de su administración oral así como el estudio de su absorción intestinal, que además se ha relacionado con las concentraciones alcanzadas en sangre y en la luz intestinal y con su efecto sobre lesiones preneoplásicas en colon. El ensayo de toxicidad subaguda ha demostrado que la administración oral repetida de ácido maslínico (50 mg/kg) a ratones durante 28 días no altera el peso corporal ni las variables hematológicas y bioquímicas. El análisis histopatológico de los principales órganos tampoco ha evidenciado signos de toxicidad. Una vez establecida la ausencia de efectos adversos se ha desarrollado un método de cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) para la determinación del ácido maslínico en plasma de rata, mediante el cual este triterpeno se ha cuantificado hasta 60 min después de su administración oral (50 mg/kg). Las concentraciones plasmáticas se han ajustado a un modelo farmacocinético monocompartimental, con el que se ha estimado una  $C_{max}$  de 3,74  $\mu\text{M}$  y una  $T_{max}$  de 18,0 min. A continuación se ha optimizado y validado un método de HPLC acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) para la determinación del ácido maslínico en contenido intestinal de rata. El método se ha aplicado a muestras obtenidas de animales que han recibido el triterpeno (1, 2 o 5 mg/kg) por vía oral durante dos días consecutivos y la mayor concentración se ha encontrado en el ciego, seguido del colon y el íleo. Además, mediante espectrometría de masas de alta resolución (HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS) también se han identificado los principales metabolitos del ácido maslínico en estas muestras. El triterpeno es sometido a reacciones de fase I, concretamente hidroxilaciones y deshidrogenaciones en distintas combinaciones que dan lugar a once derivados. El estudio de la absorción intestinal por medio de la técnica de los sacos evertidos y la perfusión en yeyuno de rata ha evidenciado que el ácido maslínico atraviesa la pared intestinal mediante difusión simple, sin implicación de mecanismos de transporte activo, con una constante aparente de difusión ( $K_d$ ) de 6,95  $\mu\text{L}/5 \text{ min}\cdot\text{mg}$  peso seco, indicativo de una baja absorción. Así pues, dado que el colon es uno de los tejidos diana del ácido maslínico, se ha evaluado su actividad quimiopreventiva en un modelo de lesiones preneoplásicas inducidas por 1,2-dimetilhidrazina en rata. El tratamiento con el triterpeno a distintas dosis (5, 10 o 25 mg/kg) durante 49 días, tanto en machos como en hembras, ha reducido la aparición de focos de criptas aberrantes en un 22–35% y un 21–29%, respectivamente. En resumen, los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral evidencian que el ácido maslínico puede administrarse por vía oral con seguridad, que su absorción intestinal tiene lugar por un proceso de difusión simple y que administrado como ingrediente funcional o nutracéutico podría ejercer, entre otros, un efecto protector durante las primeras etapas del desarrollo del cáncer de colon.



Maslinic acid is a bioactive compound found in a wide range of natural sources, from plants used in traditional Asian medicine to fresh vegetables and fruits regularly consumed as part of the Mediterranean diet. Several biological effects have been attributed to this pentacyclic triterpene, including antitumor, antidiabetic, antioxidant, neuroprotective and antiparasitic. Thus far, however, only a few studies have characterized maslinic acid *in vivo*. For this reason, the aims of this thesis have been to assess the safety of maslinic acid after its oral administration and to evaluate its oral absorption. Moreover, the latter has been related to the concentrations reached both in plasma and the intestinal lumen. Finally, the *in vivo* antitumor effect of the triterpene has been investigated on colonic preneoplastic lesions. The subacute toxicity assessment has evidenced that the repeated oral administration of maslinic acid (50 mg/kg) to mice over 28 days does not modify either the body weight or the hematologic and biochemical variables. Similarly, the histopathological examination of the main organs has not revealed any signs of toxicity derived from the exposition to the triterpene. Once the absence of adverse effects has been proved, a high performance liquid chromatography (HPLC) method has been developed to determine maslinic acid in plasma, which has been applied for the quantification of the triterpene up to 60 min after its oral administration to rats (50 mg/kg). Plasma concentrations have been best fitted to a pharmacokinetic monocompartmental model, from which a  $C_{max}$  of 3.74  $\mu\text{M}$  and a  $T_{max}$  of 18.0 min have been estimated. An HPLC coupled to mass spectrometry (HPLC-MS) method has also been optimized and validated to determine maslinic acid in rat intestinal content. This method has been used for the analysis of samples obtained from rats after the oral administration of the triterpene (1, 2 or 5 mg/kg) for two consecutive days. The highest concentration has been found in the caecum, followed by the colon and the ileum. In addition, the main metabolites of maslinic acid have been identified in these samples by high resolution mass spectrometry (HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS). The triterpene undergoes phase I reactions giving a total of eleven hydroxylated and/or dehydrogenated derivatives. Maslinic acid intestinal absorption has been addressed by means of the *ex vivo* everted gut sac and the *in situ* intestinal perfusion techniques. The compound is absorbed by simple diffusion, without any active transport mechanism involved, and with an apparent diffusion constant ( $K_d$ ) of 6,95  $\mu\text{L}/5 \text{ min}\cdot\text{mg}$  dry weight, which indicates a low absorption. Since the colon is a target tissue of maslinic acid, the chemopreventive activity of the triterpene has been evaluated in a rat model of preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine. The treatment with the triterpene at different doses (5, 10 or 25 mg/kg) over 49 days, both in male and female rats, reduces the formation of aberrant crypt foci by 22–35% and 21–29%, respectively. In summary, the results obtained from the present thesis show that maslinic acid can be safely administered by the oral route, its intestinal absorption takes place by a simple diffusion process and its use as a functional ingredient or nutraceutical may exert, among others, a protective effect in the first stages of colon carcinogenesis.



## INTRODUCCIÓ

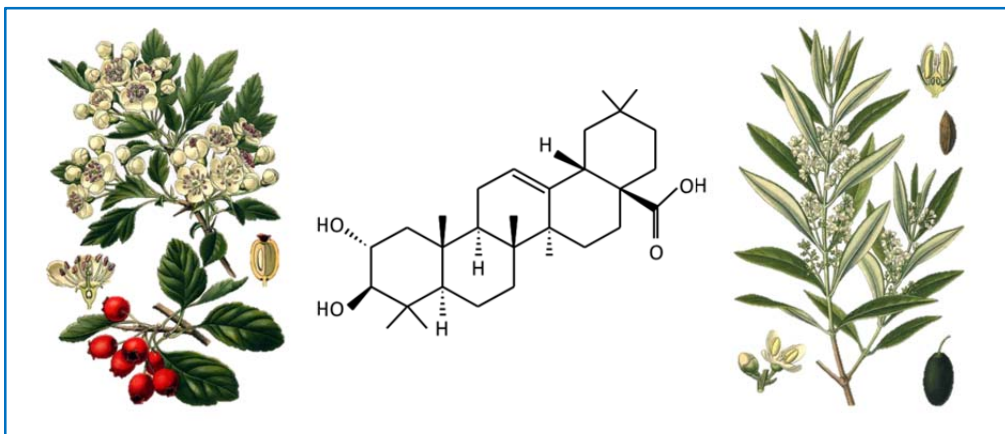


## 1.1. L'ÀCID MASLÍNIC

### 1.1.1. Estructura i identificació

L'àcid maslínic, també conegut com a àcid crategòlic o àcid 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dihidroiolean-12-en-28-oic (Figura 1.1), és un triterpè pentacíclic amplament distribuït en el regne vegetal. La denominació de l'àcid maslínic com a àcid crategòlic s'atribueix a Bächler (1927), que va aïllar-lo per primera vegada de *Crataegus oxyacantha* L. Inicialment es va descriure com un àcid carboxílic triterpenoide (Tschesche *et al.*, 1951) amb fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub> i present principalment en les fulles de l'anterior espècie, en la qual representava entre un 25% i un 30% del total de triterpenoides d'aquest òrgan (Tschesche *et al.*, 1953).

Més tard, a principis de la dècada del 1960 es van publicar una sèrie d'estudis d'altres autors en els quals s'identificava un àcid triterpènic nou en l'*Olea europaea* L., tot i que amb certa controvèrsia. Caglioti *et al.* (1961) van aïllar de la pinyolada d'oliva un àcid triterpènic amb una fórmula molecular i estructura idèntiques a les de l'àcid crategòlic i el van anomenar àcid maslínic. Però uns anys més tard aquest estudi va ser qüestionat, ja que els resultats no es van poder reproduir i l'àcid maslínic es va considerar un producte derivat de l'envelliment del fruit, probablement per hidroxilació de l'àcid oleanòlic per part de microorganismes (Caputo *et al.*, 1974). En paral·lel al treball de Caglioti *et al.* (1961), Vioque i Morris (1961) van trobar dos àcids triterpènic en l'extracte acetònic de la pinyolada d'oliva, un dels quals va ser identificat com a àcid oleanòlic i l'altre es va definir com un àcid dihidroxitriterpènic, que bé podria ser l'àcid maslínic. No va ser fins tres dècades més tard que Bianchi *et al.* (1994) van aclarir la composició de l'oliva, quantificant l'àcid maslínic junt amb l'àcid oleanòlic com els components lipídics majoritaris de la cutícula del fruit.



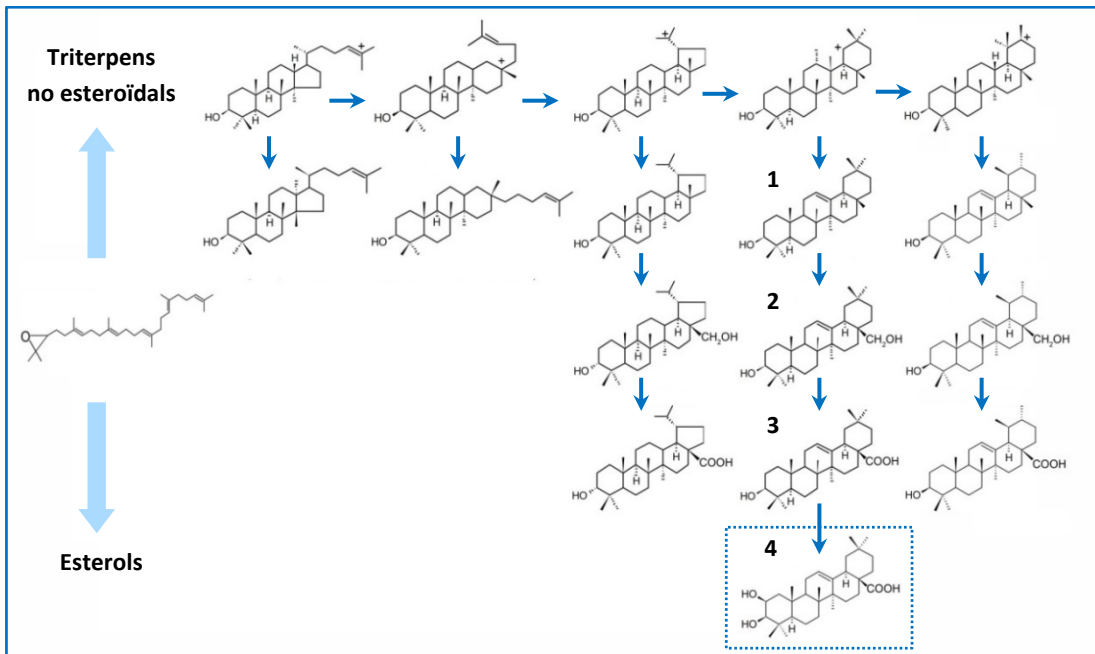
**Figura 1.1.** Al centre, estructura química de l'àcid maslínic. A l'esquerra, branca amb flors i fruits del *Crataegus oxyacantha* L., la primera espècie de la qual es va aïllar el compost; a la dreta, l'*Olea europaea* L., en la qual s'han trobat elevades quantitats d'àcid maslínic tant en les fulles com en els fruits.



### 1.1.2. Biosíntesi

Els triterpenoides, com l'àcid maslínic, són un grup de metabòlits secundaris que deriven de la ciclació de l'esqualè, l'oxidoesqualè o el bis-oxidoesqualè (Xu *et al.*, 2004). Aquests precursors (C<sub>30</sub>) són substrats de diferents tipus de sintases que catalitzen la ciclació a través de cations intermedis fins a un ampli ventall de triterpens. Segons el nombre d'anells els triterpens es classifiquen en alcohols monocíclics, bicíclics, tricíclics, tetracíclics o pentacíclics (Xu *et al.*, 2004). Alguns exemples de triterpens pentacíclics són el lupeol, l' $\alpha$ -amirina i la  $\beta$ -amirina, que no només són metabòlits secundaris per ells mateixos sinó que també són substrats de reaccions d'oxidació que donen lloc a altres derivats, com l'àcid betulínic, l'àcid ursòlic i l'àcid maslínic.

Poc després de la identificació de l'àcid maslínic en el *Crataegus oxyacantha* L., Tschesche *et al.* (1959) el van reconèixer com a derivat de la sèrie de la  $\beta$ -amirina. Més recentment, Stiti *et al.* (2007) han postulat la ruta biosintètica que condueix a la formació d'aquest compost en els fruits de l'*Olea europaea* L. (Figura 1.2), una de les principals fonts naturals d'aquest triterpè.



**Figura 1.2.** Ruta biosintètica dels triterpens no esteroïdals en el fruit de l'*Olea europaea* L. (1)  $\beta$ -Amirina, (2) eritrodíol, (3) àcid oleanòlic, (4) àcid maslínic, (5)  $\alpha$ -amirina, (6) uvaol i (7) àcid ursòlic (adaptada d'Stiti *et al.*, 2007).

### 1.1.3. Funció a la planta

Si bé el metabòlits secundaris en general no són indispensables per al creixement, desenvolupament i reproducció dels individus d'una espècie, poden contribuir notablement a la seva supervivència o proporcionar-los avantatges evolutius en situacions adverses. Les

fitoalexines són un cas particular de metabòlits secundaris, implicades en la protecció de la planta enfront d'agents patògens. L'àcid maslínic es pot considerar dins d'aquest grup, ja que diversos estudis han posat de manifest la seva capacitat protectora envers condicions desfavorables. Kombargi *et al.* (1998) van observar que si les olives es recobrien d'una solució d'àcid maslínic s'aconseguia prevenir la posta d'ous per part de les femelles de la mosca de l'olivera (*Bactrocera oleae*), que és una de les grans pestes que afecten els cultius d'olivera en els països mediterranis. A més, també s'ha vist que la ingestió d'àcid maslínic és tòxica per a l'escarabat de l'arròs (*Sitophilus oryzae*), una altra pesta devastadora de cereals emmagatzemats (Pungitore *et al.*, 2005).

#### 1.1.4. Fonts

L'àcid maslínic s'ha aïllat d'una gran diversitat de fonts vegetals, que inclouen des de plantes usades en medicina tradicional asiàtica fins a fruites i verdures molt presents en la dieta mediterrània (Taula 1.1).

**Taula 1.1.** Fonts alimentàries d'àcid maslínic.

	Àcid maslínic (mg/kg pes sec)	Referències
<b>Olives de taula</b>		
Kalamata	1318	Romero <i>et al.</i> (2010)
Hojiblanca	905	Romero <i>et al.</i> (2010)
Gordal	414	Romero <i>et al.</i> (2010)
Manzanilla	384	Romero <i>et al.</i> (2010)
Cacereña	295	Romero <i>et al.</i> (2010)
<b>Verdures</b>		
Espinacs	1260	Lin <i>et al.</i> (2011)
Albergínia	840	Lin <i>et al.</i> (2011)
<b>Herbes aromàtiques</b>		
Mostassa	330	Yin <i>et al.</i> (2012)
Fulla de mostassa	1740	Lin <i>et al.</i> (2011)
Alfàbrega	350, 320	Lin <i>et al.</i> (2011), Yin <i>et al.</i> (2012)
<b>Llegums cuits</b>		
Llenties petites	26,3	Kalogeropoulos <i>et al.</i> (2010)
Llenties grans	39,5	Kalogeropoulos <i>et al.</i> (2010)
Cigrans	61,9	Kalogeropoulos <i>et al.</i> (2010)
<b>Fruites</b>		
Mandarina	1,18	Li <i>et al.</i> (2011a)
Magrana	10,8	Li <i>et al.</i> (2011a)

Pel que fa les fonts alimentàries (Taula 1.1), l'àcid maslínic s'ha quantificat en diverses varietats d'olives de taula (Romero *et al.*, 2010), en espinacs i albergínies (Lin *et al.*, 2011), en plantes aromàtiques com la mostassa i l'alfàbrega (Yin *et al.*, 2012), en lleties i cigrons (Kalogeropoulos *et al.*, 2010), i en menor mesura en fruites com la mandarina i la magrana (Li *et al.*, 2011). Per tant, les dietes basades en fruites, verdures i hortalisses són una font d'àcid maslínic, que es podria considerar, entre molts altres factors, parcialment responsable dels efectes beneficiosos observats en aquest tipus de dietes.

Entre els remeis naturals hi ha les fulles del nesprer (*Eriobotrya japonica*) (Lu *et al.*, 2009), emprades per les seves propietats antitussives i antiinflamatòries per al tractament de la bronquitis, i també com a diürètiques, digestives i antipirètiques (Banno *et al.*, 2005); les flors de la trompeta xinesa (*Campsis grandiflora*), usades en trastorns femenins com l'hemorràgia uterina (Kim *et al.*, 2005); la planta sencera de *Geum japonicum* (Xu *et al.*, 1996) com a diürètic (Yoshida *et al.*, 1985), i la menta coreana (*Agastache rugosa*) (Zou *et al.*, 1991), per al tractament de l'anorèxia, vòmits i altres trastorns intestinals (Shin i Kang, 2003).

### **1.1.5. Efectes biològics**

#### **1.1.5.1. Efecte antitumoral**

L'activitat antitumoral de l'àcid maslínic ha estat la que ha despertat més interès en els darrers anys. La majoria d'estudis en aquest camp s'han realitzat *in vitro* i han demostrat no només l'efecte antiproliferatiu i proapoptòtic del triterpè, sinó també els mecanismes pels quals exerceix aquesta acció. Alguns estudis en models animals, però, també han aportat resultats positius que reforcen el potencial de l'àcid maslínic com a agent anticancerigen.

#### **a) Activitat antiproliferativa**

L'estudi realitzat per Juan *et al.* (2006) va demostrar per primera vegada la potent activitat antiproliferativa d'un extracte d'oliva amb un elevat percentatge d'àcid maslínic en la línia cel·lular d'adenocarcinoma de còlon HT-29. Posteriorment es va emprar àcid maslínic pur i es va veure que l'efecte antiproliferatiu tenia lloc amb una  $CI_{50}$  de 101,2  $\mu M$  a les 72 h i sense citotoxicitat inespecífica fins a 250  $\mu M$  (Juan *et al.*, 2008). En paral·lel, Reyes *et al.* (2006) també van observar aquest efecte en el mateix model experimental ( $CI_{50}$  de 61  $\mu M$ ) i en cèl·lules Caco-2 ( $CI_{50}$  de 85  $\mu M$ ). A més, es va observar que l'àcid maslínic exerceix aquesta acció per mitjà de l'aturada del cicle cel·lular, en tant que la població de cèl·lules en les fases G0/G1 es va trobar incrementada, mentre que el nombre de cèl·lules en la fase S era notablement menor (Reyes *et al.*, 2006). En ambdós estudis es va comprovar que l'efecte antiproliferatiu coincidia amb la mort cel·lular per apoptosi.

L'efecte antiproliferatiu de l'àcid maslínic ha estat posteriorment estudiat en una gran varietat d'altres línies cel·lulars, que es recullen en la Taula 1.2. juntament amb els respectius valors de  $CI_{50}$ .

**Taula 1.2.** Efecte antiproliferatiu ( $CI_{50}$ ) de l'àcid maslínic en les diferents línies cel·lulars en les quals ha estat demostrat.

Origen (humà)	Línia cel·lular	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )	Referències
<b>Adenocarcinoma colorectal</b>			
	HT-29	101,2	Juan <i>et al.</i> (2008)
	HT-29	61	Reyes <i>et al.</i> (2006)
	Caco-2	85	Reyes <i>et al.</i> (2006)
	Caco-2	15,4	He i Liu (2007)
<b>Carcinoma hepatocel·lular</b>			
	HepG2	69,1	He i Liu (2007)
<b>Adenocarcinoma de mama</b>			
	MCF-7	136,0	He i Liu (2007)
<b>Carcinoma quístic adenoide de glàndula salival</b>			
	ACC-2 (baixa metàstasi)	43,7	Wu <i>et al.</i> (2011)
	ACC-M (alta metàstasi)	45,8	Wu <i>et al.</i> (2011)
<b>Carcinoma de bufeta urinària</b>			
	T24	33,0	Zhang <i>et al.</i> (2014a)
	253J	71,8	Zhang <i>et al.</i> (2014a)
	TCCSUP	28,0	Zhang <i>et al.</i> (2014a)
<b>Papil·loma de bufeta urinària</b>			
	RT4	42,7	Zhang <i>et al.</i> (2014a)
<b>Sarcoma sinovial</b>			
	SW 982	45,3	Villar <i>et al.</i> (2014)
<b>Leiomioma d'úter</b>			
	SK-UT-1	59,1	Villar <i>et al.</i> (2014)

### b) Activitat proapoptòtica

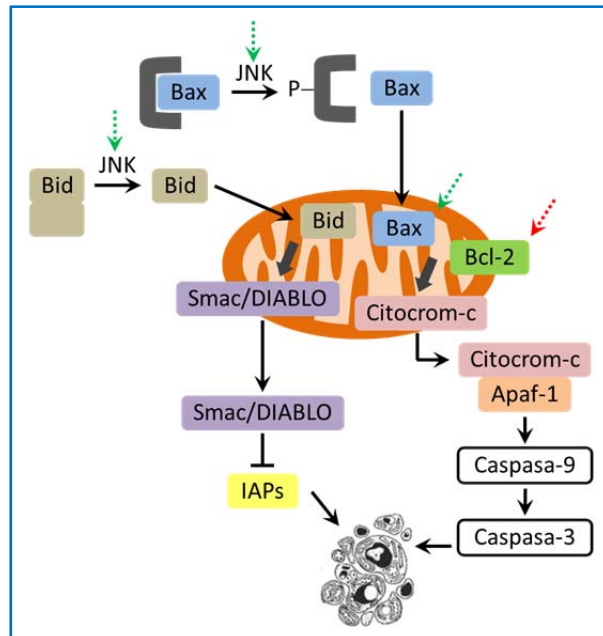
L'apoptosi, també anomenada mort cel·lular programada, consisteix en una cascada de reaccions bioquímiques que condueixen a la desintegració de la cèl·lula en fragments, que posteriorment són eliminats per cèl·lules fagocítiques sense que es produeixi una resposta inflamatòria. Aquest procés pot tenir lloc a través dels receptors de mort cel·lular, fet que es coneix com la via extrínseca, o per mitjà de la via intrínseca, que implica la participació dels mitocondris. Ambdues rutes convergeixen en la caspasa-3, que és un dels enzims efectors de

l'apoptosi (Hengartner, 2000). A continuació es presenten una sèrie d'estudis que demostren que l'àcid maslínic exerceix el seu efecte antiapoptòtic afectant ambdues vies.

*Efecte de l'àcid maslínic sobre la via intrínseca.* Juan *et al.* (2008) van observar que el tractament de les cèl·lules HT-29 amb el triterpè produïa una activació de la caspasa-3 que era 60 vegades major que en les cèl·lules incubades amb el vehicle. A fi de dilucidar quina via apoptòtica estava implicada en aquest efecte es va examinar la producció d'anions superòxid, ja que és un dels possibles inductors de la via intrínseca (Ott *et al.*, 2007), i es va veure que els nivells d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> eren més alts com a resultat de l'addició d'àcid maslínic (150 µM durant 4 h) al medi d'incubació. La desintegració de la membrana plasmàtica i la fragmentació nuclear van confirmar que s'estava produint l'apoptosi. En l'estudi de Reyes *et al.* (2006) també es va observar l'activació de la caspasa-3 en ambdues línies cel·lulars, HT-29 i Caco-2, i canvis morfològics característics de l'apoptosi, com són l'engoniment (*shrinkage*) de la cèl·lula i la condensació de la cromatina.

A continuació l'atenció es va centrar a definir els processos que induïen la via apoptòtica mitocondrial (Figura 1.3). Aquest orgànul és un reservori de proteïnes proapoptòtiques que en resposta a determinats estímuls són alliberats al citosol, on la interacció amb altres elements desencadena finalment a l'activació de la caspasa-3. En la regulació d'aquest procés hi ha implicats diversos factors, dels quals la família Bcl-2 és especialment rellevant (Hengartner, 2000). En experiments realitzats en cèl·lules HT-29 es va observar que l'àcid maslínic activava

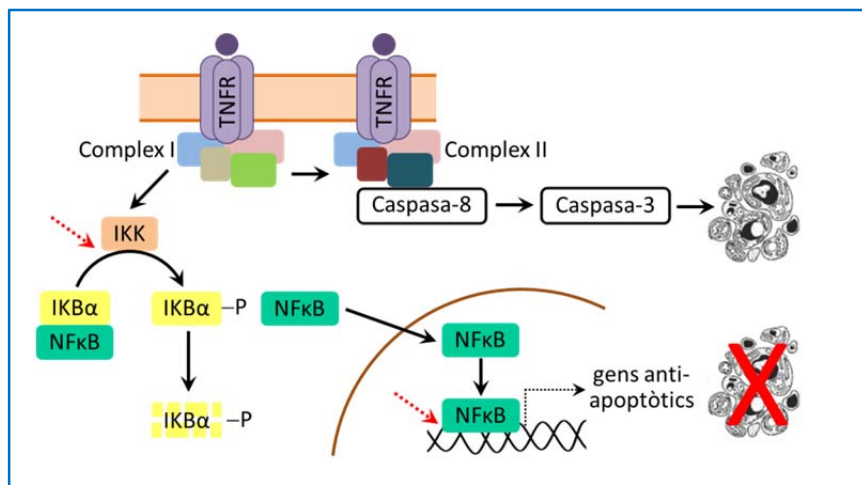
l'expressió de Bax (proapoptòtic) alhora que inhibia l'expressió de Bcl-2 (antiapoptòtic), fet que resultava en la disrupció del mitocondri i l'alliberament del citocrom-c (Reyes-Zurita *et al.*, 2009). Se sap que quan aquest factor es troba en el citosol s'uneix a Apaf-1 i que seguidament s'activa la caspasa-9 seguit de la caspasa-3 (Li *et al.*, 1997). Si bé en aquest estudi no es va determinar la formació del complex citocrom-c–Apaf-1, sí que es va observar la proteòlisi d'ambdues caspases, en funció de la dosi i del temps. Més recentment, els mateixos autors van postular que l'efecte de l'àcid maslínic sobre les proteïnes de la



**Figura 1.3.** Cascades de senyalització implicades en la via apoptòtica mitocondrial o intrínseca. Les fletxes verdes i vermelles indiquen activació i inhibició, respectivament, per part de l'àcid maslínic sobre els factors assenyalats.

família Bcl-2 podia estar mediat per la quinasa JNK, ja que la seva expressió es va trobar incrementada després del tractament de les cèl·lules amb el triterpè durant 12 h (Reyes-Zurita *et al.*, 2011). De fet, anteriorment s'havia descrit que JNK promou la translocació de Bax cap al mitocondri per mitjà de la fosforilació (inactivació) d'un factor que manté Bax ancorat al citoplasma (Tsuruta *et al.*, 2004). Una altra conseqüència de l'activació de JNK és la proteòlisi de Bid (proapoptòtic), que seguidament transloca al mitocondri i resulta en l'alliberament d'Smac/DIABLO al citosol (Deng *et al.*, 2003), on aquesta proteïna indueix l'apoptosi per mitjà de la neutralització dels inhibidors de l'apoptosi (IAPs) (Wilkinson *et al.*, 2004). A part de l'activació de JNK també es va observar que l'àcid maslínic incrementava l'expressió de p53, un factor de transcripció supressor de tumors que regula l'expressió de gens implicats en l'apoptosi, entre els quals es troben les proteïnes anteriorment mencionades Bcl-2 i Bax (Miyashita *et al.*, 1994).

*Efecte de l'àcid maslínic sobre la via extrínseca.* Pel que fa la via apoptòtica extrínseca (Figura 1.4) és iniciada per mitjà de la unió d'un lligand amb un receptor de la superfamília de receptors del factor de necrosi tumoral (TNFR), fet que resulta en el reclutament de diferents elements que constitueixen el complex I (Micheau i Tschopp, 2003). Seguidament es poden iniciar dues cascades que regulen l'apoptosi de manera oposada.



**Figura 1.4.** Cascades metabòliques implicades en la via apoptòtica extrínseca o mediada per receptors de mort cel·lular. Les fletxes vermelles indiquen els punts en els quals l'àcid maslínic exerceix un efecte inhibitori.

Per una banda, el complex I pot activar la quinasa IKK, responsable de la fosforilació d'IκBα i la seva conseqüent degradació. IκBα normalment recluta NF-κB al citosol, però després de la seva degradació el factor de transcripció és alliberat i transloca al nucli (Napetschnig i Wu, 2013), on incrementa l'expressió de gens antiapoptòtics (Karin, 2006). Per altra banda, alguns elements del complex I poden ser intercanviats, incloent la unió de la procaspasa-8, fet que porta a la

formació d'un complex secundari (complex II) (Micheau i Tschopp, 2003). En aquest cas, l'activació de la caspasa-8 resulta en la proteòlisi de caspases efectores, com la caspasa-3, i la propagació del senyal apoptòtic (Stennicke *et al.*, 1998).

La implicació de l'àcid maslínic en la via extrínseca va ser demostrada per primera vegada per Li *et al.* (2010) en la línia cel·lular de càncer de pàncrees Panc-28. Es va observar que el triterpè exercia un efecte sinèrgic amb el TNF- $\alpha$  tant en la inhibició de la proliferació com en la inducció de la mort cel·lular per apoptosi, evidenciada per l'activació de la caspasa-3. A més, el tractament amb àcid maslínic va afectar la via de l'NF- $\kappa$ B, en tant que la fosforilació d'I $\kappa$ B $\alpha$  es va trobar inhibida i, en conseqüència, també la translocació al nucli i la unió a l'ADN de l'NF- $\kappa$ B. La unió d'aquest factor de transcripció amb l'ADN també es va trobar impedita en la línia cel·lular de limfoma Raji B en resposta al tractament amb àcid maslínic (Hsum *et al.*, 2011). En aquest estudi, però, la manca de funció de l'NF- $\kappa$ B va servir per explicar la reduïda expressió de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), conegut pel seu paper en el procés inflamatori i que s'ha trobat sobreexpressat en un ampli ventall de teixits malignes (Dannenberg i Subbaramaiah, 2003).

L'activitat transcripcional de l'NF- $\kappa$ B pot ser modulada per mitjà de la fosforilació de diversos membres de la família de proteïnes MAPK, incloent JNK i p38 (Schulze-Osthoff *et al.*, 1997). Wu *et al.* (2011) van descriure que l'àcid maslínic interacciona amb la cascada de p38 de manera que finalment es produeix un efecte propapoptòtic. Els experiments es van realitzar en dues línies cel·lulars de carcinoma quístic adenoide de glàndula salival, ACC-2 i ACC-M, amb capacitat metastàtica baixa i alta, respectivament. L'activitat antiproliferativa després de la incubació amb el triterpè durant 24 h (CI<sub>50</sub> de 45  $\mu$ M, aproximadament, per a ambdues línies) es va atribuir a un procés apoptòtic, evidenciat per l'observació tant de cossos apoptòtics com de canvis microestructurals, és a dir, la condensació de l'ADN cromosòmic i la pèrdua de microvil·lis. A més, en les cèl·lules exposades al triterpè es va determinar l'activació de la caspasa-3 com a conseqüència de la fosforilació de la p38, que al seu torn va resultar d'un increment de la concentració intracel·lular de Ca<sup>2+</sup>. El mecanisme pel qual el tractament amb àcid maslínic va incrementar els nivells d'aquest electròlit és encara desconegut. En canvi, la implicació de la p38 en la iniciació de l'apoptosi per part de l'àcid maslínic també s'ha observat en dues línies cel·lulars de carcinoma de bufeta urinària (T24 i 253J) (Zhang *et al.*, 2014a). La incubació amb el triterpè va incrementar la fosforilació d'aquesta proteïna en funció de la dosi i del temps, fet que es va correlacionar amb una disminució de la supervivència cel·lular (CI<sub>50</sub> de 33,0 i 71,8  $\mu$ M per a les respectives línies cel·lulars).

El darrer estudi sobre l'activitat antiproliferativa de l'àcid maslínic s'ha realitzat en les línies cel·lulars de sarcoma sinovial SW982 i leiomioma SK-UT-1, en les quals s'han calculat CI<sub>50</sub> d'entre 45  $\mu$ M i 60  $\mu$ M (Villar *et al.*, 2014). L'aportació més rellevant d'aquests experiments, però, ha estat que l'àcid maslínic s'ha proposat com a adjuvant del fàrmac anticancerigen doxorubicina, fet que constitueix una nova aproximació terapèutica. En concret, en les cèl·lules

tractades simultàniament amb ambdós compostos s'ha observat una major sensibilitat a la doxorubicina com a conseqüència d'una major acumulació intracel·lular del fàrmac. Donat que la doxorubicina és substrat dels transportadors P-gp i MRP1, responsables de l'excreció de xenobiòtics de les cèl·lules, es va hipotetitzar que l'àcid maslínic inhibia aquestes proteïnes. L'estudi cinètic va revelar que els paràmetres  $V_{\max}$  i  $K_m$  (obtinguts per mitjà de l'equació de Michaelis-Menten) de la P-gp no resultaven afectats pel tractament amb el triterpè, mentre que els de l'MRP1 disminuïen en funció de la dosi, indicatiu que el compost es comportava com un inhibidor no competitiu d'aquest transportador (Villar *et al.*, 2014).

### c) Altres dianes de l'àcid maslínic en el càncer

La proliferació cel·lular descontrolada que es produeix durant el creixement d'un tumor dona lloc a un ambient hipòxic a l'interior de la massa tumoral que estimula l'angiogènesi. El factor d'hipòxia induïble  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) és un dels principals reguladors d'aquest procés en resposta a la deficiència d'oxigen i s'ha trobat sobreexpressat en molts càncers humans (Zhong *et al.*, 1999). Aquest factor induïx l'expressió de molècules proangiogèniques, com són el factor de creixement endotelial vascular (VEGF) i els seus receptors (Rankin i Giaccia, 2008), entre altres. D'altra banda, aquests nous vasos sanguinis poden servir per tal que cèl·lules que s'alliberin del tumor assoleixin la circulació sistèmica, es distribueixin per tot l'organisme i acabin colonitzant altres teixits. Aquest procés requereix la participació de proteïnes que degradin la matriu extracel·lular, com són les metal·loproteïnases (MMPs) i l'activador del plasminogen de tipus uroquinasa (uPA), que secreten de forma inactiva les cèl·lules tumorals o de l'estroma (Bourboulia i Stetler-Stevenson, 2010; Mekkawy *et al.*, 2009). En relació amb el descrit anteriorment, l'HIF- $1\alpha$  pot induir l'expressió de l'MMP-2, l'MMP-9 i l'uPA (Rankin i Giaccia, 2008).

En aquest context, l'efecte de l'àcid maslínic sobre la capacitat metastàtica s'ha assajat en la línia cel·lular de càncer de pròstata DU145 (Park *et al.*, 2013). La incubació amb el triterpè va reduir de manera dosi-dependent (10–25  $\mu\text{M}$ ) la migració de les cèl·lules, tant la basal com la induïda pel factor de creixement epidèrmic (EGF). Aquest efecte es va correlacionar amb una disminució dels nivells de l'ARNm i de la secreció de les proteïnes pro-MMP-2 i pro-MMP-9, així com també amb una menor activitat i nivells de l'ARNm de l'uPA. Donat que aquestes proteases estan regulades per l'HIF- $1\alpha$ , també es va estudiar la implicació d'aquest factor i es va demostrar que en condicions d'hipòxia el triterpè no només contrarestavat l'elevada expressió d'HIF- $1\alpha$  sinó que també n'inhibia la translocació al nucli i en disminuïa la semivida (Park *et al.*, 2013).

Per altra banda, l'activitat antiangiogènica de l'àcid maslínic s'havia estudiat anteriorment en tres línies cel·lulars de càncer de fetge (Hep3B, Huh7 i HA227) (Lin *et al.*, 2011). La incubació amb el triterpè (4  $\mu\text{M}$ ) va resultar en una reducció dels nivells de l'ARNm de l'HIF- $1\alpha$  i del VEGF.



En aquest cas, però, els efectes es van atribuir a l'activitat antioxidant de l'àcid maslínic, ja que en paral·lel es va observar una disminució de les espècies reactives d'oxigen (ROS) i de l'òxid nítric (NO). Posteriorment s'ha descrit que en cèl·lules tumorals aquestes molècules potencien l'expressió de l'HIF-1 $\alpha$  i el VEGF (Pialoux *et al.*, 2009). Per últim, i en concordança amb l'anterior estudi, l'exposició al triterpè també va inhibir la migració i la invasió cel·lulars, així com l'expressió de l'uPA.

#### **d) Efecte antitumoral *in vivo***

El primer estudi que va evidenciar l'activitat anticancerígena de l'àcid maslínic *in vivo* es va dur a terme en ratolins nu/nu als quals es van implantar cèl·lules pancreàtiques tumorals (Li *et al.*, 2010). En els animals tractats amb àcid maslínic per via subcutània a dosis de 50 i 100 mg/kg es va observar una reducció significativa en el volum i el pes dels tumors, que alhora mostraven un major nombre de cèl·lules apoptòtiques i una menor expressió de dos gens antiapoptòtics regulats per la via de l'NF- $\kappa$ B, survivin i Bcl-x.

Més recentment, Sánchez-Tena *et al.* (2013) han assajat l'efecte d'una dieta enriquida amb àcid maslínic (100 mg/kg) en ratolins Apc<sup>Min/+</sup>, un model de poliposi intestinal espontània. Després de 6 setmanes de tractament el triterpè va inhibir l'aparició de pòlips en l'intestí prim en un 45%. L'anàlisi del perfil d'expressió gènica va suggerir que el compost alterava vies de senyalització d'inflamació i de supervivència cel·lular.

Finalment, l'efecte anticancerígen de l'àcid maslínic també s'ha assajat en càncer de bufeta després d'implantar cèl·lules de les línies T24 i 253J a ratolins *nude* (Zhang *et al.*, 2014a). De nou, tant la grandària com el pes dels tumors van resultar disminuïts en els animals que havien rebut injeccions intraperitoneals del triterpè (20 mg/kg) cada dos dies al llarg de 35 dies.

#### **1.1.5.2. Efecte antidiabètic**

La primera evidència de l'efecte de l'àcid maslínic sobre el metabolisme de la glucosa la van aportar Wen *et al.* (2005), que van demostrar que el triterpè inhibia la glucogen fosforilasa (GP), enzim que catalitza el primer pas de la glucogenòlisi. En un primer experiment *in vitro* amb GP $\alpha$  (forma activada) aïllada de fetge de rata l'àcid maslínic va inhibir l'enzim amb una CI<sub>50</sub> de 99  $\mu$ M. Posteriorment, l'efecte hipoglucemiànt del triterpè es va posar de manifest en un model animal de diabetis induïda per adrenalina, que estimula indirectament la glucogenòlisi i incrementa així la concentració plasmàtica de glucosa. Després de l'administració oral d'àcid maslínic (100 mg/kg) durant 7 dies la concentració de glucosa en dejú va ser fins a un 46% menor en comparació amb els animals que havien rebut el vehicle. Més endavant els mateixos autors van determinar l'estructura cristal·lina del complex GP $\beta$  (forma inactivada)-àcid maslínic, que va revelar que el triterpè ocupava el lloc d'unió de l'AMP (Wen *et al.*, 2008), l'activador al·lostèric de l'enzim en condicions fisiològiques.

L'efecte antidiabètic *in vivo* de l'àcid maslínic també s'ha provat en ratolins KK-A<sup>Y</sup> (Liu *et al.*, 2007a), un model animal d'obesitat i diabetis tipus 2. L'administració de dosis úniques del triterpè (10 i 30 mg/kg) va reduir significativament la concentració plasmàtica de glucosa al cap de 2 h i 4 h, i a la dosi major l'efecte es va mantenir fins a les 7 h. Quan el tractament es va aplicar diàriament durant dues setmanes la disminució dels nivells de glucosa plasmàtica va ser d'aproximadament un 30% en ambdues dosis, respecte els animals control. A més, també es va observar un efecte dependent de la dosi en la reducció de la concentració plasmàtica d'insulina (Liu *et al.*, 2007a).

Un altre model murí emprat habitualment per a l'estudi de la diabetis són les rates hiperglicèmiques induïdes per estreptozotocina. Kathi *et al.* (2013) van assajar en aquests animals l'efecte de l'àcid maslínic (80 mg/kg) sobre la glucosa postprandial i van observar que l'administració del triterpè juntament amb sucrosa o midó disminuïa la glucosa plasmàtica fins als 120 min. En aquest estudi també es van dilucidar mecanismes d'acció de l'àcid maslínic; es va veure que el triterpè no només revertia l'elevada expressió dels transportadors SGLT1 i GLUT2, sinó que també reduïa l'expressió de l' $\alpha$ -glucosidasa i l' $\alpha$ -amilasa en l'intestí prim.

Per últim, Liu *et al.* (2014) han abordat en detall els mecanismes d'acció de l'àcid maslínic en la diabetis mitjançant experiments en la línia de carcinoma hepatocel·lular HepG2. A part de confirmar l'activitat inhibidora del triterpè sobre l'enzim GPα (CI<sub>50</sub> de 6,9 μM), es va hipotetitzar que l'àcid maslínic afectava la via de senyalització de la insulina (Saltiel i Kahn, 2001), ja que la incubació amb el compost va resultar en un increment de la fosforilació del receptor β de la insulina (IRβ). Com a conseqüència de l'activació d'aquest receptor es produeix la fosforilació d'Akt, que alhora fosforila i inactiva la glucogen sintasa quinasa 3β (GSK3β). Aquest enzim és un dels principals implicats en la regulació del metabolisme de la glucosa, ja que una de les seves dianes és la glucogen sintasa. Així, la manca d'activitat de la GSK3β permet que la glucogen sintasa sigui funcional. Tant la fosforilació d'Akt com l'activitat de l'enzim GSK3β es van trobar incrementades en les cèl·lules HepG2 en resposta al tractament amb àcid maslínic, fet que es va relacionar amb un increment del contingut de glucogen. Seguidament, l'efecte antidiabètic de l'àcid maslínic es va assajar *in vivo* administrant el triterpè per via oral (50 i 100 mg/kg) durant els darrers 15 dies d'un període experimental de 12 setmanes durant el qual els ratolins van rebre una dieta rica en greixos. Com a conseqüència del tractament la concentració de glucosa va disminuir notablement i a la dosi major es va observar una millora de l'adipositat i de la hiperinsulinèmia, així com també un increment del contingut de glucogen hepàtic (Liu *et al.*, 2014).

### 1.1.5.3. Efecte antioxidant i antiinflamatori

L'efecte antioxidant de l'àcid maslínic va ser descrit per primera vegada per Montilla *et al.* (2003) en un model animal d'estrès oxidatiu induït per CCl<sub>4</sub>. El pretractament de les rates amb

una dosi diària d'àcid maslínic de 50 o 100 mg/kg durant tres dies va resultar en una reducció de gairebé un 20% de les concentracions plasmàtiques de peròxids lipídics i una disminució de la susceptibilitat del plasma a la peroxidació lipídica d'un 6,5% i 19%, a les respectives dosis. De manera semblant, el triterpè aïllat de les flors de *Punica granatum* va evitar en un 30% aproximadament la oxidació induïda per  $\text{CuSO}_4$  de partícules LDL aïllades del plasma de conill (Wang *et al.*, 2006). En un estudi més recent i exhaustiu sobre les propietats antioxidants de diferents triterpens pentacíclics s'ha posat de manifest que l'àcid maslínic no només endarrereix l'inici i disminueix el grau d'oxidació de partícules LDL sinó que també neutralitza els radicals peroxil i té una lleugera activitat quelant del coure (Allouche *et al.*, 2010).

En aquest camp també s'han realitzat experiments en macròfags, implicats en el sistema immunitari de l'organisme. Márquez-Martín *et al.* (2006) van emprar aquestes cèl·lules aïllades del peritoneu de ratolins i les van activar amb lipopolisacàrid (LPS), un agent que indueix una resposta inflamatòria mediada per la producció de citocines, com el  $\text{TNF-}\alpha$ , i d'espècies reactives d'oxigen i de nitrogen, entre altres. Si bé la incubació amb el triterpè no va tenir cap efecte directe sobre la formació d'NO i de l'anió superòxid, va reduir la síntesi de peròxid d'hidrogen ( $\text{CI}_{50}$  de 46,3  $\mu\text{M}$ ). A més, també es va observar una disminució de l'alliberament de les citocines proinflamatòries IL-6 i  $\text{TNF-}\alpha$ .

L'efecte antiinflamatori de l'àcid maslínic també s'ha observat en cultius primaris d'astròcits (Huang *et al.*, 2011). Les cèl·lules, prèviament exposades a LPS, es van incubar amb tres concentracions del triterpè (0,1; 1 i 10  $\mu\text{M}$ ) durant 24 h i se'n va analitzar la via de senyalització del  $\text{TNF-}\alpha$ , en part mediada pel factor de transcripció NF- $\kappa\text{B}$ . Tal com s'ha descrit anteriorment, aquest factor es troba retintut en el citosol per la proteïna I $\kappa\text{B}\alpha$ . En resposta a un estímul, l'I $\kappa\text{B}\alpha$  és fosforilada i la subunitat p65 del factor de transcripció és alliberada, fet que en permet la translocació al nucli (Napetschnig i Wu, 2013). En aquest context, el tractament amb àcid maslínic va reduir l'expressió del  $\text{TNF-}\alpha$  i va impedir la translocació de p65, fet que es va correlacionar amb una menor fosforilació de l'I $\kappa\text{B}\alpha$ . A més, el triterpè va inhibir la formació d'NO i va disminuir els nivells de proteïna i ARNm dels enzims NO sintasa induïble (iNOS) i COX-2.

#### **1.1.5.4. Efecte cardioprotector**

L'acció preventiva envers malalties cardiovasculars s'ha estudiat des de diferents vessants, entre les quals hi ha la reducció de factors de risc com la hipertensió o la hiperlipidèmia. En experiments amb anells d'aorta aïllats de rates hipertenses, als quals es va induir una contracció amb fenilefrina, es va observar que la incubació amb el triterpè n'afavoria la relaxació (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2006) de manera dosi-dependent ( $\text{CI}_{50}$  de 14,1  $\mu\text{M}$ ) i per una via que implicava l'endoteli. A fi de dilucidar el mecanisme d'acció es van preincubar anells intactes

(amb endoteli) amb un inhibidor de l'NO sintasa i es va veure un menor grau de relaxació, fet que indicava que la vasodilatació induïda per l'àcid maslínic tenia lloc a través de l'NO.

Per altra banda, l'àcid maslínic també va exercir un efecte hipolipemiant en rates alimentades amb una dieta rica en colesterol durant 30 dies (Liu *et al.*, 2007b). L'administració del triterpè (100 mg/kg) per via oral en el decurs de les dues darreres setmanes del període experimental va resultar en una reducció superior a un 70% de la concentració sèrica de triglicèrids, colesterol total i colesterol-LDL. El tractament també va reduir els nivells dels enzims marcadors de la funcionalitat hepàtica lactat deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (ALP), aspartat aminotransferasa (AST) i alanina aminotransferasa (ALT) i va revertir el contingut de glucogen i les alteracions morfològiques dels hepatòcits trobades en els animals control.

Finalment, l'efecte cardioprotector també ha estat avaluat *in vivo* en un model d'infart de miocardi induït per isoproterenol en rates Wistar (Hussain Shaik *et al.*, 2012). Els animals que havien rebut àcid maslínic (15 mg/kg) durant 7 dies van mostrar una millora del perfil lipídic, amb una reducció significativa de les concentracions de triglicèrids, colesterol total, colesterol-LDL i colesterol-VLDL, un increment del colesterol-HDL i una disminució dels nivells dels enzims marcadors de funcionalitat cardíaca creatina quinasa, ALT, AST i  $\gamma$ -glutamil transferasa. A més, l'estat oxidatiu de les rates tractades es va valorar mitjançant la determinació de malondialdehid, un indicador de la peroxidació lipídica, i de la paraoxonasa, un enzim ateroprotector present en les partícules HDL (Mackness i Mackness, 2013). En ambdós casos els resultats van posar de manifest la capacitat antioxidant de l'àcid maslínic en aquest model animal.

#### **1.1.5.5. Efecte neuroprotector**

L'àcid maslínic s'ha descrit com un agent neuroprotector en diverses situacions patològiques. En cultius primaris de neurones corticals de rata la incubació amb diferents concentracions del triterpè (0,1; 1 i 10  $\mu$ M) va atenuar el dany neuronal provocat per la privació d'oxigen (Qian *et al.*, 2011a). En concret, l'activitat de la caspasa-9 i de la caspasa-3 es van trobar disminuïdes, fet que es va atribuir a una reducció de la concentració d'NO. Aquesta molècula gasosa és sintetitzada per l'enzim iNOS en resposta a la hipòxia (Moro *et al.*, 1998) i elevats nivells poden desencadenar la mort cel·lular per apoptosi (Moncada i Erusalimsky, 2002). En neurones privades d'oxigen i tractades amb àcid maslínic (10  $\mu$ M), la concentració d'NO en el medi de cultiu va ser semblant a la trobada en condicions de normòxia i es va correlacionar amb una reducció dels nivells de proteïna i d'ARNm de l'iNOS (Qian *et al.*, 2011a).

Un estudi similar va concloure que l'àcid maslínic també exerceix un efecte neuroprotector enfront de la toxicitat induïda per glutamat (Qian *et al.*, 2011b). Aquest aminoàcid és el principal neurotransmissor excitador del sistema nerviós central, però un excés d'estimulació s'ha relacionat amb dany neuronal (Lau i Tymianski, 2010). El glutamat és eliminat de l'espai

sinàptic per mitjà dels transportadors d'alta afinitat GLAST i GLT1, localitzats en els astròcits (Kanai i Hediger, 2004), fet que permet finalitzar la transmissió del senyal excitatori. Si bé l'àcid maslínic no va tenir cap efecte directe en cultius primaris de neurones corticals de rata exposats a glutamat, es va observar que en cultius d'astròcits la incubació amb el triterpè (10  $\mu\text{M}$ ) incrementava l'aclariment del glutamat extracel·lular per mitjà de l'increment de l'expressió de GLAST i GLT1. En cocultius d'ambdós tipus cel·lulars l'àcid maslínic va revertir els efectes del glutamat sobre les neurones en termes de morfologia cel·lular i supervivència (Qian *et al.*, 2011b).

Un tercer estudi *in vitro* relacionat amb l'efecte neuroprotector de l'àcid maslínic és el que s'ha presentat anteriorment en el marc de l'activitat antiinflamatòria del triterpè (Huang *et al.*, 2011). Però a més de l'evidència en cultius cel·lulars, la capacitat de l'àcid maslínic per prevenir el dany neuronal en el sistema nerviós central també s'han assajat en un model murí d'isquèmia transitòria (Guan *et al.*, 2011). L'administració oral del triterpè a les rates durant 14 dies a dosis de 5 i 50 mg/kg no només va reduir l'àrea infartada en un 70%, aproximadament, sinó que també va compensar els conseqüents dèficits neurològics.

#### 1.1.5.6. Efecte antiparasitari

La primera referència més rellevant sobre els efectes biològics de l'àcid maslínic va ser publicada per Xu *et al.* (1996) i descrivia l'activitat anti-HIV de diversos àcids triterpènics aïllats de l'extracte metanòlic de *Geum japonicum* L. Tot i que l'estudi no proporcionava detalls del mecanisme d'acció, l'àcid maslínic va ser el compost amb un efecte inhibidor més potent sobre la proteasa del virus. Més recentment l'activitat antibacteriana d'aquest triterpè, aïllat de les fulles de *Symplocos lancifolia* L., s'ha avaluat en diferents espècies tot determinant-ne la mínima concentració inhibidòria (Acebey-Castellón *et al.*, 2011). Els valors més baixos, i per tant la major eficàcia, s'ha trobat enfront d'*Enterococcus faecalis* (33,8  $\mu\text{M}$ ) i *Staphylococcus aureus* (135,4  $\mu\text{M}$ ). Però l'efecte antiinfecció més estudiat de l'àcid maslínic ha estat l'antiparasitari, assajat tant *in vitro* com *in vivo*.

De Pablos *et al.* (2010a) van observar que el triterpè blocava l'entrada de *Toxoplasma gondii* en la línia cel·lular Vero ( $\text{CI}_{50}$  8  $\mu\text{M}$  a les 4 h de tractament), probablement mitjançant la inhibició de proteases secretades pel paràsit que són necessàries per a la proteòlisi d'altres proteïnes implicades en la invasió de les cèl·lules hoste. L'àcid maslínic va suprimir la capacitat motriu del paràsit i va induir alteracions morfològiques en els sistemes endomembranosos. Els mateixos autors també van evidenciar l'activitat antiparasitària d'aquest compost en pollets de *Gallus domesticus* L. infectats amb *Eimeria tenella* (De Pablos *et al.*, 2010b). L'alimentació dels animals amb una dieta enriquida amb àcid maslínic (90 ppm) durant 21 dies va disminuir en un 80% l'excreció d'oocists en les femtes i va atenuar l'aparició de lesions característiques en el cec.

L'acció antiinfecciosa de l'àcid maslínic també s'ha avaluat en el gènere *Plasmodium*, al qual pertany el paràsit causant de la malària. Experiments *in vitro* amb eritròcits infectats amb *Plasmodium falciparum* van demostrar que el triterpè inhibia el creixement del paràsit (Moneriz *et al.*, 2011a), si bé no l'eliminava completament. Aquest efecte també va ser observat en ratolins ICR infectats amb una soca letal de *Plasmodium yoelii* (Moneriz *et al.*, 2011b). L'administració intraperitoneal d'una dosi de 40 mg/kg del triterpè durant 4 dies va incrementar la supervivència dels animals fins a un 80%, en comparació amb una taxa del 20% en els animals que no van rebre cap intervenció, i aquest fet es va atribuir a l'aturada del procés de maduració del paràsit a l'interior dels eritròcits. A més, els ratolins que havien sobreviscut a la infecció primària van ser infectats de nou 40 dies més tard i el paràsit no es va detectar en sang en cap de les anàlisis realitzades durant els 30 dies següents, indicatiu que els ratolins estaven completament protegits enfront de la infecció.

#### 1.1.5.7. Efecte sobre el creixement

A l'àcid maslínic també se li ha atribuït una activitat estimulants del creixement en truites de riu (*Oncorhynchus mykiss*) (Fernández-Navarro *et al.*, 2006 i 2008), fruit d'estudis que tenien per objectiu determinar si el triterpè podia ser usat com a additiu alimentari per incrementar les taxes de producció en el camp de l'aqüicultura. Els animals van ser alimentats amb una dieta enriquida amb àcid maslínic a diferents concentracions (1, 5, 25 o 250 mg/kg) al llarg de 225 dies i al final del període experimental les truites que havien rebut la dosi major van assolir un pes corporal gairebé un 30% més elevat que el dels animals control. Mentre que el primer estudi es va centrar en els efectes de l'àcid maslínic sobre el fetge, el segon va determinar les conseqüències sobre el teixit muscular. En ambdós casos es van trobar resultats similars en totes les variables analitzades. Tant el pes de fetge com el pes del múscul en els animals alimentats amb una dieta enriquida amb 250 mg/kg d'àcid maslínic van incrementar notablement respecte els que havien rebut la dieta estàndard, en concret un 52% i un 40%, respectivament. El contingut total d'ADN, indicatiu d'hiperplàsia, es va trobar més elevat en ambdós teixits, així com també l'ARN total. Aquests resultats es van correlacionar amb una increment de l'eficiència de la síntesi proteica. A més, en els animals que havien rebut la dieta amb el contingut més alt d'àcid maslínic es va observar un grau més alt d'empaquetament cel·lular en el parènquima del fetge, així com també una major proporció de reticle endoplasmàtic rugós, un nombre més gran de mitocondris i una quantitat més elevada de grànuls de glucogen perifèrics (Fernández-Navarro *et al.*, 2006).

Més recentment, un estudi similar ha identificat les diferències en el perfil proteic del fetge entre peixos (*Sparus aurata*) alimentats amb una dieta enriquida amb 100 mg/kg d'àcid maslínic i els corresponents controls (Rufino-Palomares *et al.*, 2011). L'anàlisi proteòmica va posar de manifest que l'expressió de 19 proteïnes estava modificada i, en conseqüència, quedaven

afectades les vies metabòliques de la glucosa i d'aminoàcids, la síntesi i el plegament proteics, l'estrès oxidatiu, el metabolisme de xenobiòtics i la proliferació cel·lular, entre altres.

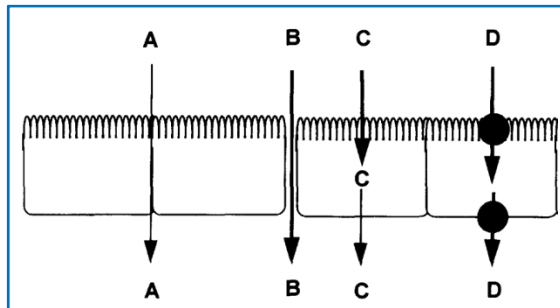
### 1.1.5.8. Altres efectes biològics

Si bé les activitats biològiques descrites anteriorment han estat les que han centrat més atenció, en tant que cadascuna d'elles ha estat abordada per diversos estudis, a l'àcid maslínic també se li han atribuït puntualment altres efectes, com són la inhibició de l'elastasa (Sultana i Lee, 2007) i de la tirosinasa (Ullah *et al.*, 2007) *in vitro*, la supressió de l'osteoclastogènesi en cultius cel·lulars i la prevenció de la pèrdua òssia induïda per ovariectomia en ratolins (Li *et al.*, 2011b), una acció antinociceptiva i antial·lodínica en diferents models murins de dolor (Nieto *et al.*, 2013), la capacitat per alterar les propietats estructurals de membranes biològiques (Prades *et al.*, 2011) i un efecte protector sobre l'hepatotoxicitat aguda induïda per alcohol en ratolins (Yan *et al.*, 2014).

## 1.2. ABSORCIÓ I METABOLISME INTESTINAL

### 1.2.1. Absorció intestinal

L'epiteli intestinal permet l'absorció de nutrients alhora que proporciona una barrera física a l'entrada de xenobiòtics. Les cèl·lules epitelials generen aquesta selectivitat mitjançant dues vies, la paracel·lular i la transcel·lular (Figura 1.5) (Suzuki *et al.*, 2013). La via paracel·lular consisteix en el pas de substàncies a través de l'espai que hi ha entre cèl·lules adjacents. El costat apical d'aquestes cèl·lules es



**Figura 1.5.** Vies d'absorció intestinal de compostos, paracel·lular (A–B) i transcel·lular (C–D) (adaptada de Hunter i Hirst, 1997).

troba envoltat d'uns complexos proteics, anomenats unions estretes, que determinen la permeabilitat selectiva als soluts, de manera que permeten l'entrada d'aigua, alguns ions i determinades molècules de mida petita i hidrofíliques però impedeixen el pas de molècules més grans o lipofíliques. La difusió paracel·lular de compostos pot tenir lloc sense participació de cap mecanisme regulador (Figura 1.5, via A) o pot ser potenciada per moduladors de les unions estretes (Figura 1.5, via B). D'altra banda, l'absorció de nutrients així com també de compostos bioactius dels aliments i fins i tot fàrmacs es produeix majoritàriament per la via transcel·lular, fet que implica el pas a través de la membrana plasmàtica des de la llum intestinal fins al citosol (membrana apical) i posteriorment a través de la membrana basolateral dels enteròcits per assolir els vasos sanguinis (Hunter i Hirst, 1997).

El pas de substàncies a través de la membrana plasmàtica es pot produir per diferents mecanismes. En la difusió simple (Figura 1.5, via C) les substàncies es mouen a favor de gradient de concentració d'un costat a l'altre de la membrana solubilitzant-se en els fosfolípids que la constitueixen, per la qual cosa només és possible per a molècules de mida petita, liposolubles i sense càrrega elèctrica, com són gasos, hormones esteroïdals o determinats fàrmacs, entre altres (Boron i Boulpaep, 2009). La majoria de ions i soluts hidrofílics d'interès biològic, però, no són solubles en els lípids de la membrana, per tant la difusió simple és negligible. Així, per aquest tipus de compostos generalment calen mecanismes específics, és a dir, proteïnes integrals de membrana que permeten el pas de substàncies cap a l'interior de la cèl·lula (Figura 1.5, via D). Aquestes proteïnes són els porus o canals i els transportadors. Els canals són estructures que poden estar permanentment obertes, de manera que hi ha un pas constant de substàncies cap a ambdós costats de la membrana a favor del seu gradient electroquímic, o bé poden obrir-se o tancar-se si disposen d'una comporta. Pel que fa als transportadors, són proteïnes que tenen afinitat per a determinats substrats, de manera que els compostos que han de ser transportats s'uneixen al corresponent lloc d'unió i per mitjà d'un canvi conformacional de la proteïna són alliberats a l'altre costat de la membrana. El pas de substàncies per mitjà de transportadors pot produir-se a favor de gradient de concentració, procés conegut com a transport mediat equilibratiu, o en contra de gradient, fet que requereix energia i és anomenat transport mediat concentratiu o transport actiu.

### **1.2.2. Tècniques per a l'estudi de l'absorció intestinal**

En la recerca sobre els components bioactius dels aliments una de les qüestions rellevants és conèixer la seva absorció intestinal. D'aquest mecanisme depèn que els compostos puguin arribar al torrent sanguini més o menys ràpidament, fet que alhora influeix en la biodisponibilitat del compost i, per tant, en els seus efectes biològics.

Per a l'estudi de l'absorció intestinal existeixen diferents models experimentals, des de cultius cel·lulars, que permeten abordar els mecanismes d'acció implicats, fins a tècniques *in vivo*, que proporcionen informació sobre la seva biodisponibilitat.

#### **1.2.2.1. Tècniques *in vitro***

Els cultius cel·lulars són una eina habitualment emprada per estudiar la permeabilitat intestinal *in vitro*. A fi de mimetitzar la situació fisiològica cal que es tracti d'un sistema polaritzat, en el qual el compost d'interès s'introdueix en el costat apical i se'n determina el pas cap al costat basolateral. Si bé els cultius primaris d'enteròcits serien el sistema més proper a les condicions *in vivo*, s'ha vist que són poc viables i que difícilment formen una monocapa organitzada i ben diferenciada (Moyer, 1983). Per això s'empren freqüentment cultius derivats de línies cel·lulars immortalitzades, en general obtingudes de diferents tipus de càncer de còlon humà i que són capaces de diferenciar-se, distribuir-se en una capa monocapa i de polaritzar-se (Alqahtani *et*



*al.*, 2013). Tot i que existeixen diverses línies que compleixen aquestes característiques, entre les quals es troben les HT-29 i les T84, és la Caco-2 la més comuna per a l'estudi de l'absorció intestinal. Aquesta línia cel·lular deriva originalment d'un carcinoma de còlon humà i creix fins la confluència formant una monocapa polaritzada. Morfològicament s'assemblen als enteròcits de l'intestí prim, amb una vora en raspall definida en el costat apical i unions estretes ben formades entre les cèl·lules. Aquest darrer tret fa que els cultius de cèl·lules Caco-2 siguin un sistema adequat per a l'estudi del pas de compostos tant per la via transcel·lular com per la via paracel·lular. A més, la presència de les unions estretes s'empra per monitoritzar la integritat de l'epiteli, ja sigui mesurant la resistència transepitelial (TEER) com emprant petites molècules hidrofíliques (mannitol o sucrosa) que travessen la monocapa de cèl·lules per la via paracel·lular (Bohets *et al.*, 2001). Els principals inconvenients de les cèl·lules Caco-2 són la baixa expressió d'enzims del citocrom P450, important per a aquells compostos que siguin substrat de reaccions metabòliques, i l'absència de la capa de muc protectora, per la qual cosa són més vulnerables als medis d'incubació (Stappaerts *et al.*, 2014).

### **1.2.2.2. Tècniques *ex vivo***

Les tècniques *ex vivo* per a l'estudi de l'absorció intestinal de compostos consisteixen en obtenir una secció o un segment de l'intestí i mantenir-los fora de l'organisme en unes condicions que reproduïen el més fidelment possible les fisiològiques. En general, el principal inconvenient dels mètodes *ex vivo* és la viabilitat del teixit, ja que malgrat que s'apliquin les condicions fisiològiques quant a composició dels medis d'incubació, temperatura i oxigenació, és limitada en comparació amb l'observada en altres tècniques. Dins d'aquest grup es troben les cambres de Ussing i els sacs evertits.

#### **a) Cambres de Ussing**

Les cambres de Ussing són un sistema en el qual s'empra una secció de mucosa intestinal fixada entre dos compartiments, cadascun dels quals conté medi fisiològic, generalment també bicarbonat, juntament amb una aportació d'oxigen i diòxid de carboni per compensar la manca d'irrigació sanguínia i mantenir el pH a 7,4 (Clarke, 2009). El compost en estudi es pot afegir tant a la cambra del costat mucosal per estudiar-ne l'absorció, com en el medi serosal per estudiar-ne l'excreció. Com en els cultius de cèl·lules Caco-2, mitjançant les cambres de Ussing es pot valorar el metabolisme intestinal de compostos, així com també monitoritzar la integritat del teixit mitjançant la mesura de la TEER, el corrent de curt circuit o determinant la permeabilitat de marcadors. Rozehnal *et al.* (2012) han realitzat experiments en cambres Ussing emprant seccions d'intestí prim i còlon d'origen humà i han vist que aquesta tècnica *ex vivo* prediu adequadament la taxa d'absorció intestinal observada en humans.

## b) Sacs evertits

La tècnica dels sacs evertits va ser descrita per primera vegada per Wilson i Wiseman (1954) per a l'estudi del transport de sucres i aminoàcids. A diferència de l'anterior, en el qual s'empren les capes més externes de la paret intestinal (mucosa i submucosa), en aquest cas s'usen sacs confeccionats a partir de segments de l'intestí d'uns 4 cm de longitud que s'han evertit, de manera que la capa mucosa queda exposada a l'exterior mentre que el costat serosal es troba en l'interior. Els sacs s'omplen i s'incuben amb medis fisiològics que contenen (o no) el compost en estudi, fet que posarà de manifest el mecanisme de pas des d'un costat a l'altre.

### 1.2.2.3. Tècniques *in situ*

La perfusió intestinal consisteix en fer passar una solució amb el compost en estudi per l'interior d'un segment intestinal que es manté a l'interior de la cavitat abdominal de l'animal anestesiats (Stappaerts *et al.*, 2014). La desaparició del compost de les solucions perfundides s'atribueix a l'entrada als enteròcits i constitueix una aproximació a la seva absorció intestinal. Aquest model mimetitzava la situació que es produeix *in vivo*, en tant que es manté la irrigació sanguínia i nerviosa del teixit, i s'ha observat una molt bona correlació amb el procés d'absorció en humans (Cao *et al.*, 2006). El principal desavantatge d'aquesta tècnica és la seva complexitat, sumada al fet que l'anestèsia de l'animal pot afectar el procés d'absorció.

### 1.2.2.4. Tècniques *in vivo*

Les tècniques *in vivo* impliquen l'administració del compost per via oral seguit de la presa de mostres de sang a diferents temps, en les quals es determina la concentració de la substància en estudi. La representació gràfica de les dades permet obtenir l'àrea sota la corba, indicativa de la quantitat total de compost que ha assolit la sang, que es compara amb el mateix paràmetre obtingut després de l'administració intravenosa per obtenir la biodisponibilitat. El principal avantatge d'aquesta tècnica és que s'empra un organisme intacte, però que contrasta amb la dificultat d'estudiar els mecanismes implicats en l'absorció dels compostos (Balimane *et al.*, 2000). Per aquest motiu, en els darrers anys s'han generat diversos ratolins modificats genèticament amb els quals és possible dilucidar les proteïnes que participen en l'absorció oral i la distribució tissular dels compostos (Tang *et al.*, 2013).

## 1.2.3. Metabolisme

Històricament el metabolisme de xenobiòtics es referia a les modificacions químiques que es produeixen en les molècules a fi d'incrementar-ne la solubilitat i facilitar-ne l'excreció de l'organisme a través dels fluids biològics (Benedetti *et al.*, 2009). El metabolisme es classificava en les fases I i II segons el tipus de reacció que tenia lloc sobre la molècula original. En els darrers anys, però, el concepte de les fases ha estat ampliat, de manera que actualment es refereix no només a la modificació de l'estructura química de les molècules sinó també al

transport d'entrada i sortida de les cèl·lules. Així, la denominació "fase III" s'atribueix a Ishikawa (1992), que va descriure per primera vegada l'existència d'una bomba responsable de l'excreció de fàrmacs conjugats amb glutatió, que va anomenar "membre del sistema de fase III". Posteriorment es va determinar que aquesta bomba era la proteïna MRP1, pertanyent a la família de transportadors ABC. D'altra banda, Petzinger i Geyer (2006) van definir la fase 0 com l'entrada dels xenobiòtics a les cèl·lules, ja sigui des de la sang a través de la membrana basolateral, com ocorre en els hepatòcits i en les cèl·lules dels túbuls proximals, com des de la llum intestinal cap a l'interior dels enteròcits a través de la membrana apical.

#### **1.2.3.1. Fase 0**

L'entrada de xenobiòtics a les cèl·lules té lloc per mitjà de transportadors de la família SLC, que permeten el pas de compostos estructuralment molt diversos. Alguns exemples d'aquestes proteïnes són els polipèptids transportadors d'anions orgànics (OATPs), que presenten afinitat per àcids orgànics febles i compostos neutres (Hagenbuch i Meier, 2003), els transportadors d'anions orgànics (OATs) i els transportadors de cations orgànics (OCTs) (Burckhardt i Wolff, 2000).

#### **1.2.3.2. Fase I**

El metabolisme de fase I consisteix en reaccions enzimàtiques d'oxidació, reducció o hidròlisi, que habitualment impliquen la incorporació o l'exposició de grups funcionals com poden ser -OH, -SH, -COOH, -O-, -NH<sub>2</sub> o dobles enllaços, entre altres (Benedetti *et al.*, 2009). Els principals responsables d'aquestes reaccions són els enzims del citocrom P450, localitzats majoritàriament en el reticle endoplasmàtic de les cèl·lules. Tot i que aquestes modificacions incrementen lleugerament la hidrosolubilitat dels compostos és més rellevant el fet que el metabolisme de fase I augmenta la reactivitat dels xenobiòtics i els fa susceptibles a reaccions de fase II.

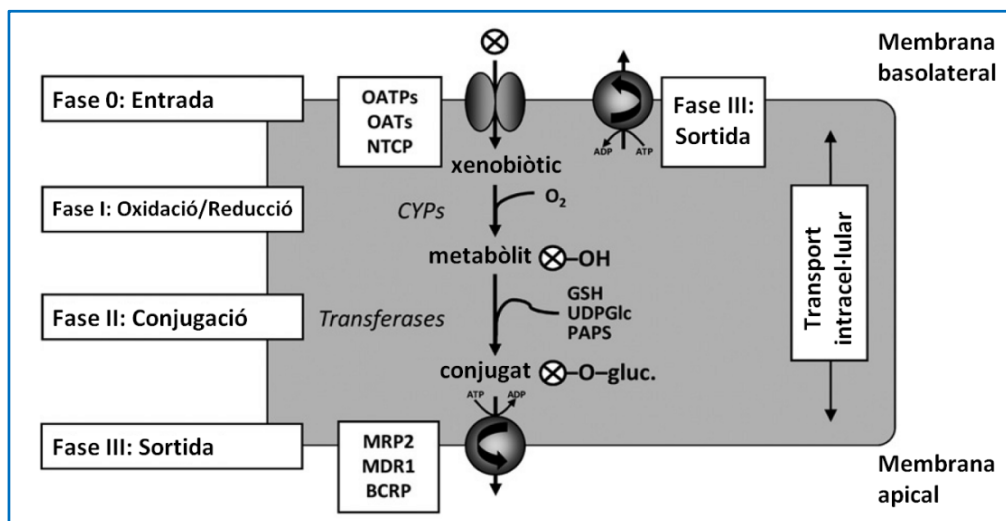
#### **1.2.3.3. Fase II**

Per mitjà d'enzims tipus transferasa, les reaccions de fase II resulten en la conjugació dels xenobiòtics intactes o dels derivats anteriors amb espècies hidrofíliques endògenes que incrementen notablement la hidrosolubilitat dels xenobiòtics (Benedetti *et al.*, 2009). Les reaccions de conjugació més freqüents són les que incorporen àcid glucurònic, grups sulfats i glutatió. La conjugació amb àcid glucurònic té lloc per mitjà dels enzims uridin-difosfat-glucuronosil transferases (UGTs), que en condicions fisiològiques són responsables de la conjugació de la bilirubina. Les sulfotransferases catalitzen la incorporació de grups sulfat amb una especificitat molt més ampla que les UGTs. Per últim, la conjugació amb glutatió es produeix mitjançant els enzims glutatió-S-transferases. Altres reaccions de conjugació inclouen la metilació, l'acetilació i la conjugació amb aminoàcids com la taurina, la glicina o la glutamina.

### 1.2.3.4. Fase III

El metabolisme de fase III és un concepte que ha sorgit més recentment i que es refereix a aquells transportadors actius implicats en l'excreció de compostos de les cèl·lules (Omiecinski *et al.*, 2011). Els inicis d'aquesta àrea de recerca daten de la dècada de 1970, amb el descobriment per part de Juliano i Ling (1976) d'un complex proteic glucosilat modulador de la permeabilitat a fàrmacs present a la membrana de les cèl·lules de l'ovari en el hamster xinès, i que van anomenar *permeability glycoprotein* (P-gp, glucoproteïna de permeabilitat). La P-gp va ser el primer membre del que actualment es coneix com la família de transportadors ABC. Aquesta proteïna es localitza principalment en cèl·lules epitelials de diferents òrgans, com per exemple en la membrana apical dels enteròcits (Thiebaut *et al.*, 1987), i tot i que els seus substrats són estructuralment molt diversos el tret comú és la seva elevada hidrofobicitat. Així, doncs, aquells xenobiòtics que hagin entrat als enteròcits poden ser retornats a la llum intestinal, fet que en limita la biodisponibilitat oral. En teràpia anticancerígena la P-gp també és d'especial rellevància, ja que la seva sobreexpressió en cèl·lules tumorals és la causant de la resistència a múltiples fàrmacs (Choi i Yu, 2014), d'aquí que també rebi el nom d'MDR1. Un altre transportador de la família ABC és l'MRP1, en aquest cas localitzat en la membrana basolateral de cèl·lules epitelials (Evers *et al.*, 1996). Generalment transporta anions orgànics amfipàtics, així com també compostos conjugats amb glutatió, àcid glucurònic o sulfat. Com la P-gp, l'MRP1 també confereix resistència a múltiples fàrmacs en cèl·lules cancerígenes (Choi i Yu, 2014).

Les diferents fases implicades en l'eliminació de xenobiòtics, ja sigui per mitjà del metabolisme o del transport a través de membranes, es recullen en la Figura 1.6.



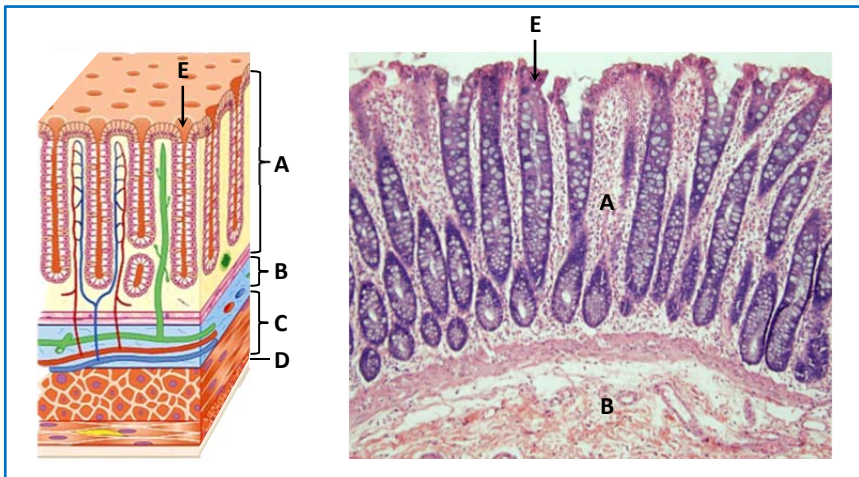
**Figura 1.6.** Fases de l'eliminació de xenobiòtics en una cèl·lula mitjançant reaccions metabòliques de fase I i II i transport a través de membranes (fases 0 i III) (adaptada de Döring i Petzinger, 2006).

### 1.3. CÀNCER COLORECTAL

Segons l'informe publicat recentment per la Sociedad Española de Oncología Médica (2014), que recull dades de l'estudi GLOBOCAN2012, a Espanya el càncer colorectal és el que presenta una major incidència (15%). En homes, aquest càncer és el tercer més freqüent, després del càncer de pròstata i de pulmó, mentre que en dones és el segon més habitual, després del càncer de mama.

#### 1.3.1. Anatomia del còlon

Anatòmicament el còlon de l'home es divideix en els segments ascendent, transvers, descendent i sigmoide, que en rata es corresponen amb els segments proximal, medial i distal. A nivell histològic, la paret del còlon presenta una estructura similar a la de la resta del tracte gastrointestinal, dividida en quatre capes de teixit: mucosa, submucosa, muscular i serosa (Figura 1.7) (Tortora i Derrickson, 2006). La **mucosa** comprèn l'epiteli, de tipus simple i cilíndric, la làmina pròpia, que és una capa subjacent de teixit connectiu lax on es troben els capil·lars sanguinis i limfàtics, les neurones entèriques i les cèl·lules del sistema immunitari, i finalment una capa estreta de múscul llis coneguda com *muscularis mucosae*. L'epiteli es disposa en tota la superfície colònica en forma d'invaginacions que donen lloc a glàndules mucoses tubulars denominades criptes de Lieberkühn. La **submucosa** està formada per teixit connectiu dens que conté vasos més grans i algunes zones amb teixit adipós. La **muscular** inclou dues capes de múscul llis, la interior conté fibres circulars mentre que en l'exterior són longitudinals. Per últim, la **serosa** és una capa molt prima de teixit connectiu recoberta de cèl·lules epitelials escamoses.



**Figura 1.7.** Estructura de la paret del còlon. A l'esquerra, dibuix esquemàtic; a la dreta, secció del còlon de rata tenyit amb hematoxilina-eosina. A: mucosa; B: submucosa; C: muscular; D: serosa; E: cripta (adaptat de Tortora i Derrickson, 2006).

### 1.3.2. Procés carcinogènic

La carcinogènesi és un procés pel qual una cèl·lula normal esdevé una massa neoplàsica invasiva com a conseqüència de l'acumulació de canvis genètics i epigenètics (Binefa *et al.*, 2014). Aquest procés inclou les etapes d'iniciació, promoció i progressió. Durant la iniciació es produeix una alteració irreversible en l'ADN de les cèl·lules, ja sigui espontàniament o com a resultat de l'exposició a dosis suficients d'un agent carcinogen, que pot ser físic, químic o biològic. La promoció implica l'expansió clonal de les cèl·lules iniciades, que pot produir-se immediatament després de la iniciació o passat un període de latència. Finalment, la progressió és el procés mitjançant el qual les cèl·lules tumorals adquireixen trets genotípics i fenotípics malignes que els confereixen capacitat invasora i metastàtica (Porth, 2006).

El càncer colorectal, en concret, és generalment un procés llarg que en molts casos té origen en unes estructures anomenades pòlips (Canadian Cancer Society, 2014). Els pòlips colorectals són els tumors benignes més freqüents en el còlon. A nivell histològic els pòlips poden ser hiperplàsics o adenomatosos. Els pòlips hiperplàsics solen tenir un diàmetre inferior a 0,5 cm, es troben habitualment en el còlon sigmoide i el recte i constitueixen la forma més habitual de pòlips benignes. D'altra banda, els pòlips adenomatosos tenen el potencial d'esdevenir un tumor maligne. Generalment l'evolució d'un pòlip adenomatós cap a un càncer colorectal invasiu té lloc en el decurs d'uns 10–15 anys (Binefa *et al.*, 2014).

En la recerca dels mecanismes moleculars implicats en l'origen del càncer colorectal el model de Vogelstein (Fearon i Vogelstein, 1990) va suposar un avenç important. Aquest model descrivia l'acumulació seqüencial de mutacions en quatre gens que es correlacionaven amb característiques histològiques que s'observen durant la progressió del càncer colorectal, i que eren les següents: mutacions inactivants en el gen *APC*, mutacions activants en el gen *K-ras*, mutacions inactivants en el cromosoma 18 (gen *DCC* i membres de la família *SMAD*) i mutacions inactivants en el gen *tp53*. Des de llavors s'han realitzat anàlisis detallades de la seqüència del genoma en un gran nombre de tumors colorectals i s'ha vist que de mitjana contenen unes 75 mutacions somàtiques i 1–2 amplificacions o delecions cromosòmiques (Wood *et al.*, 2007; Leary *et al.*, 2008). Algunes d'aquestes mutacions afecten directament les vies moleculars que regulen el procés carcinogènic, alhora que determinen la morfologia del tumor i la localització, en còlon ascendent o descendent.

### 1.3.3. Models animals de càncer colorectal

L'objectiu dels models animals de càncer colorectal és reproduir l'etiologia molecular, el fenotip i la progressió clínica de la malaltia, si bé la seva complexitat dificulta que en un sol animal es puguin representar totes les característiques. Johnson i Fleet (2013) han definit tres aspectes que són importants per poder traslladar els resultats dels models animals a humans. Primerament, el càncer hauria de limitar-se al còlon, de manera que es pugui estudiar el

desenvolupament de la malaltia sense que hi hagi interferències procedents d'alteracions en altres teixits o òrgans. En segon lloc, les lesions colòniques haurien de mostrar trets histològics i moleculars similars als que s'observen en humans. Finalment, els models haurien de reproduir les interaccions cel·lulars que s'observen en el càncer colorectal en humans; en aquest sentit, els models consistents en la implantació de tumors d'origen humà a ratolins *nude* (amb el sistema immunitari inhibit) són considerats molt rellevants pel fet que permeten estudiar directament teixit humà, però presenten l'inconvenient que els manca la resposta immunitària que es produeix habitualment en l'home quan el sistema immunitari està intacte.

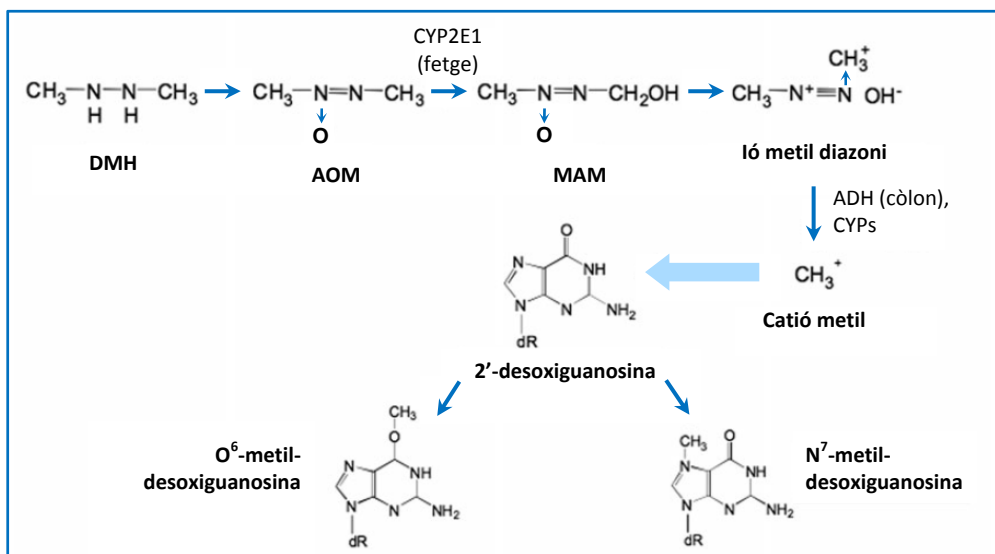
Actualment es consideren tres categories de models de càncer colorectal: càncers intestinals espontanis en diverses espècies animals, càncers induïts químicament o per mitjà de la dieta en rosegadors i càncers induïts mitjançant la manipulació genètica de ratolins (Johnson i Fleet, 2013). A continuació se centrarà l'atenció en el càncer colorectal induït per agents químics, concretament per 1,2-dimetilhidrazina (DMH), en tant que és un dels models animals més valorats per la seva similitud morfològica amb el càncer colorectal en humans (Perše i Cerar, 2005) i el que s'ha utilitzat en la present tesi.

### **1.3.3.1. Càncer colorectal induït per agents químics**

Entre altres agents químics usats per a la inducció de càncer colorectal en animals, la DMH i l'azoximetà (AOM) són els més freqüentment emprats, ja que són més potents i econòmics que altres compostos, com són les nitrosamines o les amines heterocícliques (Perše i Cerar, 2011). A més, a part de la similitud morfològica aquests models també reproduïen la resposta a agents promotors i preventius del càncer observada en humans (Corpet i Pierre, 2005). Per aquest motiu en l'actualitat són habitualment emprats no només per estudiar l'efecte d'agents ambientals, dietètics i quimiopreventius sobre el procés carcinogènic, sinó també per dilucidar els mecanismes moleculars i identificar noves dianes terapèutiques (Chen i Huang, 2009).

#### **a) Activació metabòlica dels agents carcinògens**

La DMH i l'AOM són procarcinògens, de manera que per exercir el seu efecte requereixen ser metabolitzats a derivats actius (Figura 1.8). Aquesta reacció té lloc per mitjà del citocrom P450, concretament de la isoforma CYP2E1 (Sohn *et al.*, 2001). En primer lloc la DMH és sotmesa a una N-oxidació per formar azoximetà, que posteriorment és hidroxilat i dóna lloc a la molècula de metilazoximetanol. Aquesta espècie és inestable i es descomposa en formaldehid i un ió metildiazoni altament reactiu, que alquila les bases de l'ADN formant adductes com l'O<sup>6</sup>-metilguanina i l'N<sup>7</sup>-metilguanina (Rosenberg *et al.*, 2009). La persistència de l'O<sup>6</sup>-metilguanina pot conduir a la mutació d'oncògens amb la conseqüent iniciació de la tumorigènesi (Takahashi *et al.*, 2004).

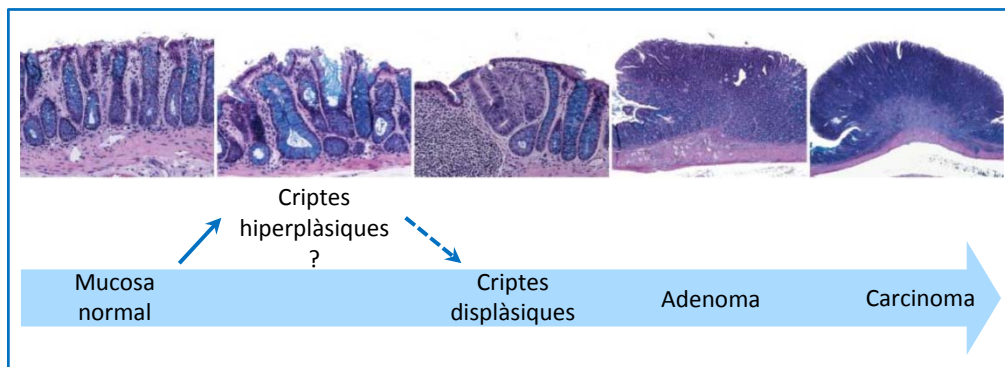


**Figura 1.8.** Via metabòlica de la DMH i l'AOM que condueix a la formació dels derivats actius (adaptada de Rosenberg *et al.*, 2009).

Si bé anteriorment es considerava que la DMH era metabolitzada en el fetge i que a través de la sang o de la bilis els derivats actius arribaven al còlon (Fiala, 1977), posteriorment es va observar que les cèl·lules epitelials d'aquest teixit també poden metabolitzar la DMH sense necessitat de la intervenció d'altres òrgans o de la microflora colònica (Stralka i Strobel, 1991). Actualment s'admet que la bioactivació de l'agent carcinogen tant en el fetge com en el còlon contribueix a la iniciació del procés carcinogènic en el darrer teixit (Megaraj *et al.*, 2014).

### b) Efecte dels agents carcinògens

El càncer colorectal induït per agents com la DMH o l'AOM és un procés que implica diverses etapes amb característiques morfològiques i histològiques semblants a les observades en el desenvolupament del càncer de còlon esporàdic en humans (Tanaka, 2009) (Figura 1.9).



**Figura 1.9.** Alteracions fenotípiques que es produeixen durant el desenvolupament del càncer de còlon induït per DMH o AOM en rata (adaptada de Perse i Cerar, 2011).



Donat que la formació d'un tumor en aquests models animals és un procés relativament lent (6–8 mesos), habitualment s'empren les lesions preneoplàsiques que es descriuen a continuació com a biomarcadors per avaluar el risc de desenvolupar càncer colorectal o per estudiar l'efecte d'agents moduladors a curt termini.

*Focus de criptes aberrants.* Els focus de criptes aberrants (FCA) són les primeres lesions que es poden identificar microscòpicament en la superfície de la mucosa colònica. Aquestes lesions s'han trobat tant en rosegadors tractats amb agents carcinògens (Bird, 1995) com en humans que presenten un elevat risc de desenvolupar càncer de còlon (Pretlow *et al.*, 1991). Els FCA són un grup de lesions molt heterogeni, amb alteracions genètiques, epigenètiques i fenotípiques diverses (Pretlow i Pretlow, 2005), però que generalment presenten com a tret comú la hiperplàsia (Perše i Cerar, 2011). Si bé s'ha suggerit que els FCA hiperplàsics poden no estar directament relacionats amb la tumorigènesi (Magnusson *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 1999), s'ha vist que algunes d'aquestes lesions poden progressar fins a FCA displàsics (McLellan *et al.*, 1991).

*Focus de criptes amb depleció de mucines.* La displàsia es considera indicativa d'un major risc de progressió cap al càncer, i en termes de lesions preneoplàsiques en còlon es tradueix en la disminució o la pèrdua de la capacitat de síntesi de muc (Jass i Sobin, 1989). Com els FCA, els focus amb depleció de mucines (FDM) incrementen en nombre i en multiplicitat al llarg del temps; en canvi, són histològicament més homogenis i presenten alteracions genètiques i epigenètiques semblants a les que s'observen en el càncer de còlon (Femia *et al.*, 2008a), per la qual cosa es correlacionen millor amb la malaltia. L'absència de producció de mucines es deu a la manca d'expressió del gen codificant per a MUC2, l'apomucina més important en el còlon, en paral·lel amb la manca d'expressió del factor ITF o TFF3, un marcador del llinatge de les cèl·lules Goblet, responsables de conferir protecció a l'epiteli intestinal (Femia *et al.*, 2008b). D'altra banda, també s'ha observat que els FDM contenen nivells més elevats de COX-2, d'iNOS i una major infiltració de macròfags, la qual cosa indica la presència d'inflamació en les primeres fases del procés carcinogènic (Femia *et al.*, 2009).

*Criptes amb acumulació de  $\beta$ -catenina.* Es tracta de lesions intraepitelials displàsiques amb una producció de mucines molt baixa o absent i caracteritzades per una acumulació de  $\beta$ -catenina en el citoplasma i en el nucli i presència de mutacions en el gen codificant per aquesta proteïna (*Ctnnb1*) (Yamada *et al.*, 2000). A diferència dels FCA i dels FDM, que s'observen en la superfície mucosa del còlon, l'observació de criptes amb acumulació de  $\beta$ -catenina es realitza mitjançant un mètode immunohistoquímic en seccions de teixit. Si bé aquestes lesions es consideren un biomarcador de càncer de còlon rellevant (Mori *et al.*, 2005), la seva identificació i quantificació és costosa, fet que en limita l'ús.

**OBJECTIUS**



En el decurs de les darreres dècades la recerca en el camp de la nutrició ha centrat gran part de l'atenció a identificar components bioactius en els aliments, és a dir, aquells compostos que poden contribuir a millorar el benestar físic i mental dels individus i reduir el risc de malaltia. Entre aquests components destaca l'àcid maslínic, al qual se li han atribuït efectes biològics que s'estenen des d'antitumoral i antidiabètic fins a neuroprotector i antiparasitari (Lozano-Mena *et al.*, 2014; veure Annex I). La majoria d'aquests estudis s'han dut a terme *in vitro*, fet que ha permès dilucidar alguns dels mecanismes d'acció de l'àcid maslínic, però són poques les evidències obtingudes en éssers vius. Aquesta transició, des de les activitats biològiques demostrades en cultius cel·lulars fins a beneficis observables en humans, planteja una sèrie de qüestions que calen ser abordades i que constitueixen els objectius de la present tesi doctoral.

L'àcid maslínic es va aïllar inicialment de plantes emprades en medicina tradicional asiàtica (Shin i Kang, 2003; Banno *et al.*, 2005) però posteriorment també s'ha trobat en fruites (Li *et al.*, 2011a), verdures (Lin *et al.*, 2011) i llegums (Kalogeropoulos *et al.*, 2010) consumides habitualment en el marc de diversos patrons dietètics, com és el cas de la dieta mediterrània. Així, donat que actualment la principal aportació d'aquest compost a l'organisme es produeix per mitjà de la ingesta d'aliments, en primer lloc s'ha pretès **avaluar la seguretat de l'àcid maslínic després de la seva administració oral**. Per això, s'han realitzat estudis de toxicitat oral aguda i subaguda en ratolins, que han permès valorar si el compost té efectes adversos a diferents nivells.

Un cop a l'organisme, el fet que l'àcid maslínic exerceixi els efectes biològics descrits *in vitro* dependrà de si s'assoleixen en sang les concentracions efectives. Per això, el segon objectiu plantejat ha estat **posar a punt i validar un mètode analític per a la determinació de l'àcid maslínic en plasma de rata**. Per a tal fi, s'ha emprat la tècnica de cromatografia de líquids d'alta eficàcia, aplicada habitualment per a la determinació d'anàlits diversos en mostres biològiques donada la seva robustesa i reproductibilitat.

Un dels efectes biològics més estudiats de l'àcid maslínic és l'antitumoral. En experiments previs realitzats en el nostre grup es va posar de manifest una potent activitat antiproliferativa i proapoptòtica de l'àcid maslínic en una línia cel·lular d'adenocarcinoma colorectal (Juan *et al.*, 2008), per la qual cosa el còlon podria considerar-se un dels teixits diana d'aquest compost. Amb la finalitat de poder valorar la quantitat d'àcid maslínic que s'assoleix en la llum intestinal després de la seva administració oral s'ha plantejat **posar a punt i validar un mètode analític per a la determinació del compost en el contingut intestinal de rata** emprant la tècnica de cromatografia de líquids d'alta eficàcia acoblada a espectrometria de masses. El mètode desenvolupat s'ha aplicat per **quantificar l'àcid maslínic en el contingut dels diferents segments del tracte intestinal (duodè i jejú, ili, cec i còlon)** després de l'administració de tres dosis del compost durant dos dies consecutius, i també ha constituït la base per **identificar els**

**derivats que apareixen en el contingut intestinal** mitjançant espectrometria de masses d'alta resolució.

La quantitat d'àcid maslínic que es troba en la llum intestinal depèn tant de la biotransformació a la qual és sotmès el compost com del grau en el qual és absorbit. Alhora, aquest últim també permet explicar en part les concentracions assolides en sang. Per això, el següent objectiu d'aquesta tesi ha estat **estudiar l'absorció intestinal de l'àcid maslínic** emprant la tècnica *ex vivo* dels sacs evertits i la perfusió *in situ* en jejú de rata.

Finalment, en el marc de l'activitat antitumoral s'ha plantejat **estudiar l'efecte de l'àcid maslínic sobre lesions preneoplàsiques en còlon de rata**. S'ha emprat un model animal consistent en la inducció de lesions preneoplàsiques mitjançant injeccions intraperitoneals de l'agent carcinogen 1,2-dimetilhidrazina. L'àcid maslínic s'ha administrat diàriament per via oral a tres dosis al llarg de 49 dies, tant en rates mascles com en rates femelles.

En resum, la present tesi doctoral versa sobre diferents aspectes que caracteritzen el comportament de l'àcid maslínic *in vivo*. Així, es complementa el coneixement disponible fins l'actualitat, centrat en les activitats biològiques i habitualment obtingut d'estudis *in vitro*, per tal que en un futur es pugui plantejar l'ús d'aquest compost bioactiu en humans amb la finalitat de prevenir malalties o millorar l'estat de la seva salut.

**MATERIAL I MÈTODES**



### 3.1. DISSOLVENTS I REACTIUS

L'acetat d'etil, l'acetonitril, l'etanol i el metanol, tots de puresa HPLC, així com també l'àcid acètic glacial i l'àcid fòrmic són de J.T. Baker® (Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Holanda); l'acetonitril de puresa LC-MS és de Fluka® (Sigma-Aldrich Química S.L., Tres Cantos, Madrid). L'aigua ultrapura s'ha obtingut mitjançant el sistema de purificació Milli-Q® Gradient (Merck Millipore, Merck Chemicals and Life Science GesmbH, Madrid).

L'àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA) és de Carlo Erba Reagents-SdS (Sabadell, Barcelona) i les sals emprades per a la preparació de medis fisiològics són de Scharlau (Scharlab S.L., Sentmenat, Barcelona), excepte l'hidrogenfosfat de sodi anhidre (Panreac Química S.A.U., Castellar del Vallès, Barcelona) i el clorur de calci anhidre (Merck Millipore). La resta de productes són de Sigma-Aldrich.

### 3.2. EQUIPS CROMATOGRÀFICS

Per a la determinació de l'àcid maslínic en plasma s'ha emprat un cromatògraf de líquids d'alta eficàcia Agilent series 1100 (Agilent Technologies Spain S.L., Las Rozas, Madrid, Espanya); mentre que per a la determinació del triterpè en contingut intestinal s'ha usat un cromatògraf de líquids d'alta eficàcia Perkin-Elmer® series 200 (Perkin-Elmer, Tres Cantos, Madrid, Espanya) acoblat a un espectròmetre de masses de quadrupol senzill PE Sciex API 150 EX (AB SCIEX Spain S.L., Alcobendas, Madrid, Espanya) amb font de ionització química a pressió atmosfèrica (APCI). La identificació dels metabòlits de l'àcid maslínic s'ha dut a terme en un cromatògraf de líquids d'alta eficàcia Accela (Thermo Scientific, Fisher Scientific, Madrid, Espanya) acoblat a un espectròmetre de masses híbrid constituït per una trampa de ions lineal i un analitzador Orbitrap Velos (Thermo Scientific), amb la mateixa font de ionització. Els dos darrers equips estan disponibles als Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiT-UB).

### 3.3. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

S'han emprat ratolins de la soca Swiss CD-1 i rates de la soca Sprague-Dawley, tots procedents de la Unitat d'Establació Animal de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Els animals han estat mantinguts en gàbies ( $n = 3-4$ /gàbia per als ratolins i  $n = 2-3$ /gàbia per a les rates), en condicions controlades de temperatura ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ) i humitat ( $50 \pm 10\%$ ) i sotmesos a un cicle de llum-fosc de 12 hores. La dieta proporcionada ha estat pinso estàndard de manteniment (per a les rates, 2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet; per als ratolins, 2018 Teklad Global 18% Protein Rodent Maintenance Diet; ambdós de Harlan, Sant Feliu de Codines, Barcelona, Espanya) i aigua *ad libitum*. La manipulació dels animals s'ha dut a terme sempre a primera hora del matí a fi de minimitzar l'efecte dels ritmes circadianis. Tots els procediments han estat autoritzats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona i s'han realitzat seguint les recomanacions de la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (Nicklas *et al.*, 2002; Voipio *et al.*, 2008).



### 3.4. PREPARACIÓ DE SOLUCIONS D'ÀCID MASLÍNIC I D'ÀCID BETULÍNIC

L'àcid maslínic emprat en el present treball ha estat proporcionat pel Dr. García-Granados (Departamento de Química Orgánica, Universidad de Granada, Espanya). El compost s'obté dels residus de la mòlta de les olives, concretament de la pell, mitjançant un procediment patentat que consisteix en dues extraccions consecutives amb dissolvents orgànics, la primera amb hexà i la segona amb acetat d'etil. El producte resultant té una puresa del 95–100% (García-Granados, 1998). L'àcid betulínic, usat com a patró intern, ha estat subministrat per Extrasynthèse (Z.I. Lyon Nord, Genay, França) i té una puresa del  $\geq 97\%$ .

Ambdós anàlits es presenten en forma d'una pols blanca que és insoluble en aigua, de manera que per a l'obtenció de solucions estoc i solucions per administrar per via oral s'han emprat diferents solvents.

#### 3.4.1. Preparació de solucions estoc i solucions de treball d'àcid maslínic i d'àcid betulínic en metanol al 80%

S'han preparat solucions estoc d'àcid maslínic i d'àcid betulínic a concentracions de 250  $\mu\text{M}$  en metanol al 80%. Per a un volum final de 100 mL, s'han pesat 11,8 mg d'àcid maslínic o 11,4 mg d'àcid betulínic i s'han dissolt en 80 mL de metanol al 100% mitjançant agitació magnètica durant 30 min i immersió en un bany d'ultrasons durant 30 min més. Seguidament, les solucions s'han transferit a matrassos aforats i s'han enrasat al volum final amb aigua ultrapura. Per últim, les solucions s'han agitat de nou durant 15 min abans d'envasar-les en ampolles topazi per a la seva conservació a 4°C. Aquestes solucions s'han usat en un termini màxim de 4 setmanes. Per a la preparació de solucions de treball d'ambdós compostos s'han fet dilucions de les solucions estoc en metanol al 80%.

#### 3.4.2. Preparació de solucions d'àcid maslínic en (2-hidroxiopropil)- $\beta$ -ciclodextrina

Tant per a les administracions orals com per a la preparació de medis en els experiments d'absorció intestinal l'àcid maslínic s'ha formulat en solució aquosa amb (2-hidroxiopropil)- $\beta$ -ciclodextrina (HPBCD), el percentatge de la qual ha estat del 20% o del 40% en funció de la concentració del triterpè, com s'indicarà més endavant. A la solució d'HPBCD al 40% s'ha afegit, a més, carboximetilcel·lulosa sòdica (CMC) al 0,5%.

Per a la preparació de 100 mL d'una solució d'HPBCD al 20% s'han pesat 20 g d'HPBCD i s'han dissolt en 100 mL d'aigua ultrapura mitjançant agitació magnètica a temperatura ambient fins que s'ha observat la total dissolució de la pols. D'altra banda, per a 100 mL de la solució d'HPBCD al 40% i CMC al 0,5% s'han pesat 40 g d'HPBCD i s'han dissolt en 100 mL d'aigua ultrapura procedint de la mateixa manera. Seguidament, s'han pesat 0,5 g de CMC, s'han afegit a la solució anterior i s'ha deixat en agitació fins la completa dissolució. Ambdues solucions s'han envasat en ampolles topazi, conservat a 4°C i usat en un termini de 4 setmanes.

L'administració oral de l'àcid maslínic a rates s'ha realitzat a dosis d'1, 2, 5, 10, 25 i 50 mg/kg i a ratolins a dosis de 50 mg/kg i 1 g/kg, emprant en tots els casos un volum d'administració de 10 mL/kg. Per tant, les concentracions de les solucions preparades han estat de 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2,5; 5 i 100 mg/mL (212, 423, 1058, 2116, 5289 i 10578 i 211550 µM, respectivament). Per a les concentracions compreses entre 0,1 i 1 mg/mL, ambdues incloses, l'àcid maslínic s'ha solubilitzat en una solució d'HPBCD al 20%. En canvi, per a les concentracions més elevades (2,5; 5 i 100 mg/mL) s'ha emprat una solució d'HPBCD al 40% i CMC al 0,5%.

D'altra banda, per als experiments d'absorció intestinal s'han emprat solucions estoc d'àcid maslínic de 2 i 10 mM (0,95 i 4,73 mg/mL), respectivament. La primera s'ha preparat en HPBCD al 20% i la segona en HPBCD al 40% i CMC al 0,5%. Les solucions de treball d'àcid maslínic s'han obtingut per dilució de les solucions estoc en els corresponents vehicles.

La solubilització de l'àcid maslínic en les solucions d'HPBCD s'ha basat en el procediment descrit per Jaggi *et al.* (2002). En primer lloc, l'àcid maslínic s'ha dissolt en metanol al 100% mitjançant agitació magnètica durant 15 min i immersió en el bany d'ultrasons durant 15 min més. El volum de metanol emprat és igual al volum que tindrà la solució final. Tot seguit, s'ha barrejat la solució metanòlica d'àcid maslínic amb la solució del vehicle, s'ha agitat durant 15 min i s'ha introduït al bany d'ultrasons durant 15 min més. A continuació, el dissolvent s'ha evaporat en un concentrador (Concentrador 5301, Eppendorf Ibérica S.L.U., San Sebastián de los Reyes, Madrid) a 45°C. Donat que s'empra el mateix volum de metanol que de vehicle i que el dissolvent orgànic és més volàtil que l'aigua, es considera que s'ha evaporat totalment el metanol quan el volum inicial de la barreja s'ha reduït a la meitat. Finalment, la solució s'ha envasat en una ampolla topazi per a la seva conservació a 4°C. Aquestes solucions s'han usat en un termini màxim de 2 setmanes.

### 3.5. ESTUDI DE LA TOXICITAT DE L'ÀCID MASLÍNIC

#### 3.5.1. Toxicitat aguda

S'han emprat ratolins mascles de la soca Swiss CD-1 de 8 setmanes d'edat i un pes de 35–43 g. Els animals s'han distribuït aleatòriament en dos grups experimentals, corresponents a un grup control i un grup al qual se li ha administrat àcid maslínic. El darrer ha rebut una dosi única d'1 g/kg del triterpè per via oral mentre que l'altre ha rebut el vehicle (HPBCD al 40% i CMC al 0,5%), emprant en ambdós casos un volum d'administració de 10 mL/kg. S'ha emprat una sonda intragàstrica d'acer inoxidable d'una llargada de 38 mm, una amplada de 20G i un diàmetre de l'extrem de 2 mm (ref. ST1 75-0283, Panlab-Harvard Apparatus, Panlab S.L.U., Cornellà, Barcelona, Espanya). Durant els 15 dies següents s'ha registrat diàriament el pes corporal dels ratolins i se n'ha observat l'estat general i el comportament, a fi de detectar qualsevol signe de toxicitat, com són alteracions en l'aspecte del pèl (piloerecció, pèrdua de brillantor), secrecions mucoses anormals o trastorns en el sistema respiratori o locomotor. També s'ha controlat el

consum d'aigua i pinso cada dos dies. A partir de l'increment de pes i el consum de pinso s'ha calculat l'eficiència de la conversió d'aliment, que és una mesura de l'eficiència amb la qual l'aliment ingerit és transformat en increment de pes o creixement de l'individu. Aquesta variable es calcula per mitjà de l'expressió següent:

$$\text{Eficiència de la conversió d'aliment (\%)} = \frac{\text{Increment de pes setmanal}}{\text{Consum de pinso setmanal}} \times 100$$

Al final del període els animals s'han anestesiats amb ketamina (Imalgene 100 mg/mL, Merial Laboratorios S.A., Barcelona) a una dosi de 100 mg/kg i xilacina (Rompun®, Bayer Hispania S.L., Sant Joan Despí, Barcelona) a una dosi de 10 mg/kg per via intraperitoneal. Un cop comprovada la pèrdua dels reflexos podal i palpebral s'ha procedit a l'examen macroscòpic i la determinació del pes dels principals òrgans.

### **3.5.2. Toxicitat subaguda**

S'han emprat ratolins mascles de la mateixa soca i edat, amb un pes inicial d'entre 32 i 41 g. Els animals s'han dividit en dos grups, als quals s'ha administrat diàriament durant 28 dies i per via oral àcid maslínic a una dosi de 50 mg/kg o el vehicle, respectivament. Durant aquest temps s'ha registrat el pes corporal dels animals i se n'ha supervisat l'estat general i el comportament. En el decurs del tractament també s'ha controlat el consum de pinso i aigua cada dos dies. A l'acabar el període experimental els animals s'han anestesiats amb ketamina/xilacina i s'ha procedit al sacrifici i l'obtenció de mostres. Primerament s'ha extret sang per punció cardíaca, que s'ha distribuït en tubs amb anticoagulant EDTA-K<sub>3</sub> (ref. 41.1504.005, Sarstedt S.A., La Roca del Vallès, Barcelona) per a l'anàlisi hematològica, i tubs amb activador de la coagulació (ref. 41.1501.005, Sarstedt) per a l'obtenció del sèrum i la posterior determinació de les variables bioquímiques. El sèrum s'ha separat per centrifugació (centrífuga 5417R, Eppendorf) a 1500×g durant 15 min, després de deixar els tubs a temperatura ambient durant 45 min. Totes les mostres s'han analitzat en un termini de 4–6 h. A continuació s'ha realitzat la necròpsia i s'han obtingut els principals òrgans per determinar-ne el pes i fer-ne l'anàlisi histopatològica.

#### **3.5.2.1. Anàlisi hematològica i bioquímica**

Les variables hematològiques determinades han estat el recompte d'eritròcits, l'hematòcrit, el volum corpuscular mitjà, l'hemoglobina, l'hemoglobina corpuscular mitjana, la concentració d'hemoglobina corpuscular mitjana, el recompte de leucòcits (total i diferencial), el recompte de plaquetes i el volum plaquetari mitjà. Les mesures s'han realitzat en un analitzador Cell-Dyn (Abbott Diagnostics Division, Santa Clara, CA, EEUU).

Pel que fa les variables bioquímiques, s'ha determinat la glucosa, el colesterol total, el colesterol-HDL, els triglicèrids, l'alanina aminotransferasa, la bilirubina, la creatinina i els ions sodi, potassi i clorur. S'ha emprat un analitzador Roche/Hitachi 747 (Mannheim, Alemanya) i reactius de Roche Diagnostics.

Totes les determinacions s'han dut a terme en el Centre d'Atenció Primària Just Oliveras de L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona).

### 3.5.2.2. Necròpsia

En primer lloc s'ha realitzat una laparotomia per explorar la cavitat abdominal i obtenir-ne els principals òrgans (fetge, melsa, ronyons i testicles). També s'ha examinat la cavitat toràcica, de la qual s'han extret els pulmons, el cor i el timus, i finalment també s'ha obtingut el cervell. Dels diferents òrgans s'ha mesurat el pes humit, després de retirar amb cura restes de greix i de teixit connectiu. Els pes relatiu de cada òrgan, en percentatge, s'ha calculat en relació amb el pes corporal del ratolí en el moment del sacrifici, segons l'expressió:

$$\text{Pes relatiu de l'òrgan (\%)} = \frac{\text{Pes de l'òrgan (g)}}{\text{Pes corporal (g)}} \times 100$$

### 3.5.2.3. Anàlisi histopatològica

Els òrgans s'han fixat en formalina neutra tamponada al 10% per a l'estudi histopatològic, que ha estat realitzat pels Serveis Integrats de l'Animal de Laboratori (Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Espanya). Els òrgans s'han inclòs en parafina i se n'han obtingut talls de 5 µm abans de procedir a la tinció d'hematoxilina/eosina per a l'observació al microscopi òptic.

### 3.5.3. Expressió dels resultats, anàlisi estadística i obtenció d'imatges

Els resultats s'expressen en forma de mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística s'ha dut a terme mitjançant el programa GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EEUU) aplicant la prova t d'Student o el test de Mann-Whitney per avaluar les diferències entres grups, o l'ANOVA de dos factors seguit del test de Bonferroni per a les diferències entre els grups en funció del temps. En ambdós casos s'han considerat diferències amb tres nivells de significació,  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  i  $P < 0,001$ .

Les imatges dels talls histològics dels diferents òrgans s'han obtingut en un microscopi Olympus (BX41, Olympus Iberia S.A.U., L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona) que està acoblat a un sistema de captació d'imatges (càmera digital XC50, càmera de vídeo U-TV1X-2 i adaptador XC50, Olympus) controlat pel programa Cell^B 3.1 (Olympus).

## 3.6. POSADA A PUNT I VALIDACIÓ DE LA TÈCNICA DE CROMATOGRÀFIA DE LÍQUIDS D'ALTA EFICÀCIA PER A LA DETERMINACIÓ DE L'ÀCID MASLÍNIC EN PLASMA

### 3.6.1. Extracció de l'àcid maslínic del plasma

El plasma s'ha sotmès a una doble extracció líquid-líquid amb acetat d'etil. Un volum de 500 µL de mostra, ja siguin patrons de calibratge d'àcid maslínic en plasma de rata o mostres problema, s'ha transferit a un tub de vidre de 10 mL. Tot seguit, s'han afegit 4 mL d'acetat d'etil i s'ha

agitat vigorosament al vòrtex durant 3 min abans de centrifugar (Megafuge 1.0, Heraeus S.A., Boadilla del Monte, Madrid) a 3300×g, a 4°C i durant 30 min. Els sobrenedants s'han separat i s'han reservat mentre s'ha fet una segona extracció del residu procedint de la mateixa manera. Ambdues fraccions orgàniques s'han ajuntat abans d'evaporar el dissolvent a sequedat al concentrador a una temperatura de 45°C. La reconstitució s'ha fet amb 400 µL de metanol al 75% i agitació al vòrtex durant 30 s. Després d'una darrera centrifugació a 25000×g, a 4°C i durant 5 min, les mostres s'han transferit a vials topazi per a l'anàlisi.

### 3.6.2. Determinació de l'àcid maslínic en plasma per HPLC

#### 3.6.2.1. Instrument i condicions analítiques

*Instrument.* La determinació de l'àcid maslínic en plasma per HPLC s'ha realitzat en un cromatògraf Agilent 1100 equipat amb un desgasificador, una bomba quaternària, un injector automàtic i un detector de díodes UV-visible. El control de l'aparell i l'adquisició de les dades s'ha realitzat mitjançant el programa ChemStation for LC 3D A.10.02 (Agilent Technologies).

*Condicions cromatogràfiques.* La separació cromatogràfica de l'àcid maslínic de la resta de components de la matriu s'ha realitzat en una columna de fase reversa Luna C18, d'una longitud de 250 mm, un diàmetre interior de 4,6 mm, una mida de partícula de 5 µm i un diàmetre de porus de 100 Å (ref. 00G-4252-E0, Phenomenex®, Torrance, CA, EEUU). A l'entrada de la columna s'han col·locat dues precolumnes del mateix material (C18, 4,00 x 3,00 mm, ref. AJ0-4287, Phenomenex®) contingudes en un cartutx (ref. KJ0-4282, Phenomenex®) per minimitzar l'entrada de partícules.

La fase mòbil ha estat constituïda per una fase aquosa (fase A) d'aigua ultrapura acidificada amb àcid acètic al 0,05% i una fase orgànica (fase B) d'acetoni-tril al 100%. La fase mòbil s'ha mantingut a un flux constant d'1 mL/min i s'ha aplicat una elució en gradient (Taula 3.1). Al final del programa d'elució s'han reestablert les condicions inicials durant 5 min per reequilibrar la columna abans de la injecció de la següent mostra. La temperatura de la columna ha estat de 40°C i el volum de mostra injectat de 100 µL.

**Taula 3.1.** Gradient d'elució de la fase mòbil per a la determinació de l'àcid maslínic per HPLC.

Temps (min)	Fase A	Fase B
0	60%	40%
5	50%	50%
10	40%	60%
15	30%	70%
20	30%	70%
25	25%	75%
30	20%	80%
35	0%	100%
40	0%	100%

#### 3.6.2.2. Quantificació de l'àcid maslínic i expressió dels resultats

La quantificació de l'àcid maslínic en les mostres s'ha realitzat per mitjà de patró extern, és a dir, afegint àcid maslínic a una concentració coneguda a plasma blanc de rata. Aquests patrons de calibratge s'han preparat per a cada tanda de mostres problema i s'han sotmès al mateix procés

d'extracció. Les rectes s'han analitzat immediatament després de cada seqüència de mostres problema. La concentració d'àcid maslínic s'ha obtingut de la interpolació de les àrees del pic cromatogràfic d'anàlit a les rectes patró corresponents. Les concentracions es proporcionen en  $\mu\text{M}$  i els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard.

### 3.6.3. Validació del mètode analític

El mètode analític desenvolupat s'ha validat d'acord amb les guies establertes en *The United States Pharmacopeia and The National Formulary* (2008). Per això, s'han preparat patrons de calibratge d'àcid maslínic en plasma blanc, és a dir, plasma obtingut de rates que no han rebut mai el triterpè. Els animals s'han anestesiats amb ketamina (90 mg/kg) i xilacina (10 mg/kg) per via intraperitoneal i s'ha comprovat la pèrdua total dels reflexos podal i palpebral abans d'extreure sang per punció cardíaca. La sang s'ha recollit en tubs amb anticoagulant EDTA- $\text{K}_2$  (ref. 36.338, Sarstedt) i s'ha centrifugat a  $3300\times g$ , a  $4^\circ\text{C}$  i durant 15 min per separar-ne el plasma, que s'ha conservat a  $-20^\circ\text{C}$  fins al moment d'usar-lo.

Per als patrons de calibratge s'han emprat  $475\ \mu\text{L}$  de plasma blanc als quals s'han afegit  $25\ \mu\text{L}$  de diferents solucions de treball d'àcid maslínic (les concentracions finals del compost s'especificaran per a cada paràmetre de validació) i s'han sotmès al procés d'extracció detallat anteriorment. Aquests patrons han estat preparats immediatament abans del seu ús.

Els paràmetres de validació avaluats han estat els següents:

*Recuperació.* La recuperació es defineix com la capacitat d'un mètode per extreure l'anàlit de la matriu biològica durant el tractament de les mostres. La recuperació del mètode per determinar l'àcid maslínic en plasma s'ha avaluat a les concentracions d'1; 2,5; 5; 10; 15 i  $25\ \mu\text{M}$ . El càlcul de la recuperació s'ha realitzat, en percentatge, comparant l'àrea del pic de l'anàlit en patrons de calibratge en plasma amb l'àrea del pic de l'anàlit en patrons en metanol al 80% a les mateixes concentracions.

*Precisió i exactitud.* La precisió d'un mètode analític és un reflex de la dispersió del conjunt de valors obtinguts en diferents mesures de la concentració d'anàlit realitzades a les mateixes condicions. D'altra banda, l'exactitud és indicativa de la proximitat entre un valor mesurat i el valor teòric de la concentració d'anàlit. Ambdós paràmetres s'han determinat analitzant un nombre suficient de patrons de calibratge d'àcid maslínic en plasma a les concentracions 1; 2,5; 5; 10; 15 i  $25\ \mu\text{M}$ . Pel que fa la precisió, s'ha diferenciat entre intradia i interdia, segons si les mostres s'han preparat en un mateix dia o en tres dies diferents, respectivament. La precisió s'ha expressat com a coeficient de variació, en percentatge, i s'ha calculat segons l'equació:

$$\text{Precisió (\%)} = \left( \frac{\text{DE}}{\bar{x}} \right) \times 100$$

en la qual DE és la desviació estàndard i  $\bar{x}$  és la mitjana del grup de valors obtinguts en cadascuna de les concentracions d'àcid maslínic avaluades.

D'altra banda, l'exactitud, en percentatge, s'ha calculat d'acord amb l'expressió:

$$\text{Exactitud (\%)} = \left( \frac{C_T - C_M}{C_T} \right) \times 100$$

en la qual  $C_T$  és la concentració teòrica d'anàlit i  $C_M$  és la concentració proporcionada pel mètode analític.

Tant la precisió com l'exactitud han de trobar-se dins d'un límit de  $\pm 15\%$  (Bansal i DeStefano, 2007).

*Linealitat.* La linealitat és la capacitat d'un mètode analític per donar resultats que són directament, o per mitjà d'una transformació matemàtica definida, proporcionals a la concentració d'anàlit present a la mostra dins d'un rang determinat. La linealitat del mètode per determinar l'àcid maslínic en plasma s'ha avaluat a les concentracions de 0,5; 0,75; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 i 25  $\mu\text{M}$ . Les àrees dels pics d'àcid maslínic s'han representat enfront de la concentració de triterpè i l'anàlisi de regressió lineal s'ha fet mitjançant el mètode dels mínims quadrats per determinar el pendent, l'ordenada a l'origen i el coeficient de correlació.

*Sensibilitat.* La sensibilitat d'un mètode analític s'avalua per mitjà del límit de detecció (LOD) i el límit de quantificació (LOQ). Per establir-los, s'ha mesurat el nivell de soroll de fons en 6 mostres de plasma blanc analitzats emprant la màxima sensibilitat permessa per l'instrument. El LOD s'ha estimat com la concentració d'àcid maslínic que genera un pic cromatogràfic amb una àrea 3 vegades superior al valor del soroll de fons. De manera similar, el LOQ s'ha estimat com la concentració d'àcid maslínic que produeix un pic amb una àrea que és 10 vegades més gran que el soroll de fons. El LOQ s'ha validat analitzant 6 mostres de plasma a les quals s'ha afegit àcid maslínic a la concentració teòrica.

*Selectivitat.* La selectivitat d'un mètode analític és la capacitat per determinar un anàlit sense interferències procedents de la matriu biològica. Per avaluar la selectivitat del mètode per determinar l'àcid maslínic en plasma s'han comparat els cromatogrames de 6 mostres de plasma blanc amb els cromatogrames de 6 mostres de la mateixa matriu a la qual s'ha afegit àcid maslínic. El mètode és selectiu si en els cromatogrames de plasma blanc no hi ha pics als temps de retenció de l'anàlit.

#### **3.6.4. Determinació de l'àcid maslínic en plasma després de la seva administració oral a rates**

El mètode validat s'ha aplicat per a la quantificació de l'àcid maslínic en plasma de rates que han rebut el triterpè per via oral. S'han emprat rates mascle de la soca Sprague-Dawley d'un pes de  $350 \pm 16$  g. Després d'un dejuni de 8 h, se'ls ha administrat oralment una dosi de 50 mg/kg d'àcid maslínic, emprant un volum d'administració de 10 mL/kg. Per a tal fi s'ha emprat una sonda intragàstrica d'acer inoxidable d'una llargada de 76 mm, una amplada de 18G i un diàmetre de l'extrem de 2 mm (ref. ST1 75-0285, Panlab-Harvard Apparatus). S'han obtingut

mostres de sang per la vena safena als minuts 10, 15, 20, 25, 30, 45 i 60 recollint-les en tubs amb anticoagulant EDTA-K<sub>2</sub> (Microvette® CB300, ref. 16.444, Sarstedt). El plasma s'ha separat per centrifugació i s'ha conservat a -20°C fins al moment d'analitzar-lo mitjançant el mètode validat. Per a la quantificació del triterpè s'ha preparat una recta patró en plasma en el rang de concentracions de 0,5 µM a 15 µM.

A fi d'obtenir una aproximació a la farmacocinètica de l'àcid maslínic, les concentracions plasmàtiques del triterpè enfront del temps s'han analitzat mitjançant el programa WinNonlin Professional 5.3 (Pharsight, Certara™ L.P., Sant Louis, MO, EEUU).

### **3.7. POSADA A PUNT I VALIDACIÓ DE LA TÈCNICA DE CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDS D'ALTA EFICÀCIA ACOBLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSES PER A LA DETERMINACIÓ DE L'ÀCID MASLÍNIC EN EL CONTINGUT INTESTINAL**

#### **3.7.1. Extracció de l'àcid maslínic del contingut intestinal**

L'extracció de l'àcid maslínic de contingut intestinal de rata s'ha dut a terme emprant metanol al 80% com a solvent. El procés és lleugerament diferent segons el tipus de mostra de partida. Tal com s'especificarà més endavant, en l'obtenció del contingut d'alguns segments intestinals s'ha emprat PBS per facilitar-ne l'arrossegament. Aquestes mostres s'han centrifugat per separar el contingut intestinal pròpiament del PBS, de manera que a partir d'ara es farà la distinció entre ambdós tipus de mostres anomenant-les fracció sòlida i fracció líquida, respectivament.

*Extracció de la fracció sòlida.* Per a l'extracció de l'àcid maslínic de la fracció sòlida s'ha partit d'1 g de mostra que s'ha introduït en un tub de plàstic de fons rodó de 10 mL. Seguidament, s'hi han afegit 4 mL de metanol al 80%, dels quals 0,160 mL es corresponen a la solució estoc del patró intern (àcid betulínic 250 µM). Les mostres s'han sotmès a dues homogeneïtzacions de 30 s a velocitat 6 emprant un Polytron (PT10-35, Kinematica AG, Luzern, Suïssa) al qual se li ha acoblat el braç 7TS. Entremig de les dues homogeneïtzacions s'ha agitat al vòrtex durant 1 min. A continuació, l'homogeneïtzador s'ha rentat 4 vegades amb 1 mL del mateix solvent i tots els rentats s'han afegit a l'homogenat, de manera que el volum final ha estat de 8 mL. Les mostres s'han agitat vigorosament al vòrtex durant 5 min i s'han centrifugat a 25000×g, a 2°C i durant 15 min. Una alíquota dels sobrenedants s'ha filtrat (filtre de PTFE d'un diàmetre de 4 mm i un diàmetre de porus de 0,45 µm, ref. F2504-3, Thermo Scientific National, Rockwood, TN, EEUU) abans de transferir-la a vials topazi per a l'anàlisi.

*Extracció de la fracció líquida.* L'àcid maslínic s'ha extret de la fracció líquida partint d'un volum de mostra de 2 mL al qual s'han afegit 6 mL de metanol al 80%. D'aquests, 0,160 mL es corresponen a solució estoc del patró intern. Les mostres s'han agitat al vòrtex durant 5 min, s'han centrifugat a 25000×g, a 2°C i durant 15 min, i finalment una alíquota dels sobrenedants s'ha filtrat abans d'introduir-la a vials topazi per a l'anàlisi.



### 3.7.2. Determinació de l'àcid maslínic en el contingut intestinal per HPLC-MS

#### 3.7.2.1. Instrument i condicions analítiques

*Instrument.* Per a la determinació de l'àcid maslínic en contingut intestinal per cromatografia de líquids d'alta eficàcia acoblada a espectrometria de masses (HPLC-MS) s'ha emprat un cromatògraf Perkin-Elmer® series 200 equipat amb un desgasificador, una bomba quaternària i un injector automàtic amb safata refrigerada per a les mostres. El cromatògraf s'ha acoblat a un espectròmetre de masses de quadrupol senzill PE SCIEX API 150 EX amb font d'APCI operant en mode negatiu. El control de l'aparell i l'adquisició de les dades s'ha realitzat mitjançant el programa Analyst 1.4.2 (AB SCIEX).

*Condicions cromatogràfiques.* La separació cromatogràfica de l'àcid maslínic i l'àcid betulínic (patró intern) de la resta de components de la matriu s'ha dut a terme en una columna de fase reversa Luna C18 d'una longitud de 150 mm, un diàmetre interior de 2,00 mm, una mida de partícula de 5 µm i un diàmetre de porus de 100 Å (ref. 00F-4252-B0, Phenomenex®). A l'entrada de la columna s'han col·locat dues precolumnes del mateix material (C18, 4,00 x 3,00 mm, ref. AJ0-4287, Phenomenex®) contingudes en un cartutx (ref. KJ0-4282, Phenomenex®) per minimitzar l'entrada de partícules.

La fase mòbil ha estat constituïda per d'aigua ultrapura (fase aquosa o A) i acetonitril al 100% (fase orgànica o B). S'ha aplicat l'elució en gradient que es mostra en la Taula 3.2, amb un flux constant de 0,8 mL/min. Durant els darrers 8 min del programa d'elució s'han establert les condicions inicials per reequilibrar la columna abans de la injecció de la següent mostra. La safata per a les mostres s'ha mantingut a 10°C i el forn de la columna a 40°C. El volum d'injecció ha estat de 20 µL.

*Condicions de l'espectròmetre de masses.* L'optimització de les condicions dependents de l'àcid maslínic s'ha realitzat mitjançant la infusió d'una solució d'àcid maslínic de 50 µM a un flux de 5 µL/min, injectada directament a la fase mòbil a través d'una xeringa acoblada a

**Taula 3.2.** Gradient d'elució de la fase mòbil per a la determinació de l'àcid maslínic per HPLC-MS.

Temps (min)	Fase A	Fase B
0	95%	5%
4	50%	50%
8	40%	60%
12	25%	75%
15	0%	100%
19	0%	100%

**Taula 3.3.** Paràmetres de la font d'APCI per a la determinació de l'àcid maslínic per HPLC-MS.

Paràmetre	Valor
Temperatura	500°C
Gas cortina (N <sub>2</sub> )	12 ua
Gas nebulitzador (N <sub>2</sub> )	10 ua
Corrent del gas nebulitzador	-3 ua
Potencial de desagregació (DP)	-30 V
Potencial d'enfocament (FP)	-100 V
Potencial d'entrada (EP)	-5 V

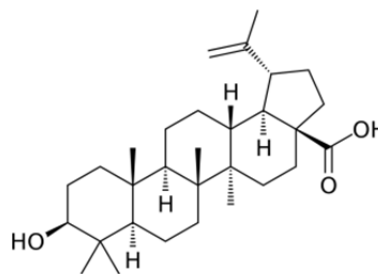
una bomba (Model 11, Panlab-Harvard Apparatus, Panlab S.L.U., Cornellà, Barcelona) i usant una connexió post-columna en T. Els valors òptims (Taula 3.3) han estat aquells que han proporcionat la màxima relació senyal-soroll.

Per a l'adquisició de dades s'ha emprat el mode consistent en la monitorització de ions seleccionats (SIM). Per als ions  $[M-H]^-$  de l'àcid maslínic i l'àcid betulínic s'han establert relacions massa/càrrega ( $m/z$ ) de 471,3 i 455,3, respectivament, amb un temps de durada (*dwell time*) de 165 ms.

### 3.7.2.2. Quantificació de l'àcid maslínic i expressió dels resultats

La quantificació de l'àcid maslínic en les mostres s'ha realitzat per mitjà de patró intern. Breument, aquest mètode consisteix en afegir a totes les mostres una quantitat coneguda i constant d'un compost que no es trobi a la matriu i que presenti unes característiques fisicoquímiques i un comportament en l'instrument similars al de l'anàlit. Un cop analitzades les mostres, s'obtenen les àrees dels pics cromatogràfics de l'anàlit i el patró intern, se'n calcula la ràtio i s'interpol·la a una recta patró construïda a partir de concentracions conegudes de l'anàlit.

Per a la quantificació de l'àcid maslínic en les mostres de contingut intestinal s'ha emprat com a patró intern l'àcid betulínic (Figura 3.1). Les rectes patró s'han preparat per a cada tanda de mostres problema i s'han analitzat immediatament després de la seqüència de mostres. Les concentracions es proporcionen en  $\mu\text{M}$  i els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard.



**Figura 3.1.** Estructura química de l'àcid betulínic, emprat com a patró intern per a la determinació de l'àcid maslínic en el contingut intestinal per HPLC-MS.

### 3.7.3. Validació del mètode analític

El mètode analític desenvolupat s'ha validat d'acord amb les guies per a la validació de mètodes bioanalítics de la *Food and Drug Administration* (2001) i de la *European Medicines Agency* (2011), així com també seguint les recomanacions descrites per Matuszewski *et al.* (2003). Per això, s'han preparat patrons de calibratge d'àcid maslínic en contingut intestinal blanc, és a dir, obtingut de rates que no han rebut mai el triterpè. Per a tal fi, els animals s'han anestesiats amb ketamina (90 mg/kg) i xilacina (10 mg/kg) per via intraperitoneal i s'ha comprovat la pèrdua dels reflexos podal i palpebral abans de realitzar una laparotomia per extreure el duodè i el jejú (conjuntament), l'ili, el cec i el còlon. El contingut del cec s'ha recollit directament en un tub de plàstic de 10 mL, mentre que el contingut dels altres segments intestinals s'ha obtingut fent passar 5 mL de PBS per la llum intestinal. Aquests últims, a més, s'han centrifugat a  $3300\times g$ , a

2°C i durant 5 min per separar la fracció sòlida de la fracció líquida. Ambdues s'han congelat a -20°C fins al moment d'usar-les.

El contingut intestinal blanc emprat per a la preparació de patrons de calibratge d'àcid maslínic ha estat una mescla de parts equivalents de la fracció sòlida del contingut dels diferents segments intestinals. Els patrons de calibratge s'han preparat en tubs de plàstic de fons rodó de 10 mL partint d'1 g de fracció sòlida al qual s'han afegit 4000 µL de metanol al 80%. D'aquest volum, 320 µL es corresponen a solucions de treball d'àcid maslínic de diferents concentracions i 160 µL es corresponen a solució estoc del patró intern (àcid betulínic 250 µM). Les concentracions finals d'àcid maslínic s'especifiquen per a cada paràmetre de validació. Els patrons de calibratge s'han sotmès al mateix procés d'extracció que les mostres.

Els paràmetres avaluats han estat els següents:

*Recuperació, efecte matriu i eficiència del procés.* La recuperació s'ha calculat, en percentatge, comparant les àrees dels pics d'àcid maslínic i d'àcid betulínic de patrons de calibratge en contingut intestinal blanc i sotmesos al procés d'extracció amb les àrees dels pics dels anàlits de patrons preparats en un extracte metanòlic de contingut intestinal blanc a les mateixes concentracions.

D'altra banda, l'efecte matriu descriu la influència que poden exercir components endògens de la matriu sobre la ionització dels anàlits, tant potenciant-la com suprimint-la. L'efecte matriu s'ha calculat, en percentatge, comparant les àrees dels pics d'àcid maslínic i d'àcid betulínic de patrons preparats en un extracte metanòlic de contingut intestinal blanc amb les àrees dels pics dels anàlits de patrons preparats en metanol al 80% a les mateixes concentracions.

Finalment, l'eficiència del procés és un paràmetre que engloba la recuperació i l'efecte matriu i es calcula comparant les àrees dels pics d'àcid maslínic i d'àcid betulínic de patrons de calibratge en contingut intestinal blanc i sotmesos al procés d'extracció amb les àrees dels pics dels anàlits de patrons preparats en metanol al 80% a les mateixes concentracions.

La recuperació, l'efecte matriu i l'eficiència del procés d'extracció de l'àcid maslínic de contingut intestinal s'han avaluat a les concentracions de 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20 i 30 µM per a l'àcid maslínic i de 5 µM per a l'àcid betulínic.

*Precisió i exactitud.* La precisió i l'exactitud s'han determinat analitzant un nombre suficient de patrons d'àcid maslínic en contingut intestinal a les concentracions de 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20 i 30 µM (patró intern a 5 µM). Quant a la precisió, s'ha diferenciat entre intradia i interdia segons si les mostres s'han preparat en un mateix dia o en dos dies diferents, respectivament. La precisió, expressada com a coeficient de variació, i l'exactitud s'han determinat mitjançant les expressions següents:

$$\text{Precisió (\%)} = \left( \frac{DE}{\bar{x}} \right) \times 100$$

$$\text{Exactitud (\%)} = \left( \frac{C_T - C_M}{C_T} \right) \times 100$$

De nou, els valors d'aquests paràmetres han de trobar-se dins d'un límit de  $\pm 15\%$  (Bansal i DeStefano, 2007).

*Linealitat.* La linealitat del mètode analític s'ha avaluat a concentracions d'àcid maslínic de 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 20; 25 i 30  $\mu\text{M}$  (patró intern a 5  $\mu\text{M}$ ). Les ràtios de les àrees dels pics d'àcid maslínic i de patró intern s'han representat enfront de la concentració de triterpè i s'ha emprat el mètode dels mínims quadrats per a l'anàlisi de regressió lineal a fi de determinar el pendent, l'ordenada a l'origen i el coeficient de correlació.

*Sensibilitat.* La sensibilitat del mètode analític s'ha avaluat mitjançant el LOD i el LOQ. El LOD s'ha definit com la concentració d'àcid maslínic que produeix un pic l'àrea del qual és 3 vegades superior al soroll de fons en una mostra de fracció sòlida de contingut intestinal blanc. El LOQ s'estableix quan aquesta relació senyal-soroll és de 10:1. A més, aquest paràmetre també ha de complir que la precisió i l'exactitud es trobin dins d'un límit de  $\pm 20\%$  i que el pic cromatogràfic de l'anàlit sigui fàcilment distingible, amb un temps de retenció i una forma acceptables. El LOQ s'ha validat mitjançant l'anàlisi de 6 mostres de fracció sòlida de contingut intestinal blanc a les quals s'ha afegit àcid maslínic a la concentració teòrica.

*Selectivitat.* S'han comparat els cromatogrames de 6 mostres de fracció sòlida de contingut intestinal blanc (sense l'anàlit ni el patró intern) amb els cromatogrames de 6 mostres de la mateixa matriu a la qual s'han afegit àcid maslínic i àcid betulínic. El mètode és selectiu si en els cromatogrames corresponents al blanc no hi ha pics als temps de retenció d'ambdós compostos.

### **3.8. DETERMINACIÓ DE L'ÀCID MASLÍNIC I ELS SEUS METABÒLITS EN EL CONTINGUT INTESTINAL I EN EL PLASMA DESPRÉS DE L'ADMINISTRACIÓ ORAL DEL TRITERPÈ A RATES**

#### **3.8.1. Animals d'experimentació, disseny experimental i obtenció de mostres**

S'han emprat rates mascle de la soca Sprague-Dawley d'un pes entre 250 i 280 g. Els animals s'han dividit en tres grups, cadascun dels quals ha rebut àcid maslínic per via oral a dosis d'1, 2 o 5 mg/kg, respectivament. L'administració s'ha realitzat mitjançant una sonda intragàstrica, emprant un volum d'administració de 10 mL/kg, durant dos dies consecutius.

Vint-i-quatre hores després de la darrera administració els animals s'han anestesiat amb ketamina/xilacina (90 i 10 mg/kg, respectivament) i s'ha extret sang per punció cardíaca. El plasma s'ha obtingut per centrifugació i s'ha conservat a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins al moment de l'anàlisi.

D'altra banda, s'ha practicat una laparotomia per extreure el duodè i el jejú (conjuntament), l'ili, el cec i el còlon. El contingut de cada segment s'ha recollit en tubs de plàstic de 10 mL prèviament tarats. Les mostres que s'han recollit amb PBS s'han centrifugat per separar-ne la

fracció sòlida i la fracció líquida. La fracció líquida s'ha transferit a uns altres tubs i se n'ha mesurat el volum. D'altra banda, els tubs amb la fracció sòlida s'han pesat i s'ha calculat el pes de la mostra per diferència. Totes les mostres s'han conservat a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins al moment d'analitzar-les.

Les mostres de contingut intestinal, tant de fracció sòlida com de fracció líquida, s'han sotmès al procés d'extracció detallat en l'apartat 3.7.1. abans de ser analitzades en l'espectròmetre de masses d'alta resolució per a la identificació de metabòlits de l'àcid maslínic, o en l'espectròmetre de masses de quadrupol senzill per a la quantificació dels anàlits.

### **3.8.2. Quantificació de l'àcid maslínic en el contingut del duodè i jejú, ili, cec i còlon per HPLC-MS**

*Instrument i condicions analítiques.* L'instrument i les condicions emprats per a la quantificació de l'àcid maslínic ha estat el cromatògraf de líquids d'alta eficàcia acoblat a l'espectròmetre de masses de quadrupol senzill amb font d'APCI detallat anteriorment (apartat 3.7.2.1).

*Quantificació de l'àcid maslínic.* Donada l'elevada quantitat de fracció sòlida de contingut intestinal blanc que es necessitaria per a les rectes patró (1 g per cada patró de calibratge), les rectes s'han preparat emprant com a matriu un extracte metanòlic blanc. Aquest extracte s'ha obtingut a partir de la fracció sòlida de contingut intestinal blanc, a la qual no s'ha afegit ni àcid maslínic ni patró intern i que ha estat sotmesa al procés d'extracció detallat en l'apartat 3.7.1. A 180  $\mu\text{L}$  d'extracte metanòlic s'han afegit 10  $\mu\text{L}$  de les corresponents solucions de treball d'àcid maslínic i 10  $\mu\text{L}$  de la solució de treball del patró intern (àcid betulínic). Després d'agitar al vòrtex durant 1 min, els patrons s'han filtrat i s'han introduït en vials topazi per a l'anàlisi. Abans d'aplicar de rutina aquesta estratègia s'ha comprovat que els resultats són equivalents als obtinguts en patrons de calibratge preparats en contingut intestinal, tal com es mostrarà en el corresponent apartat de resultats. Per a la quantificació de l'àcid maslínic en les mostres del present experiment s'ha preparat una recta patró en el rang de concentracions de 0,005 a 5  $\mu\text{M}$  i patró intern a 5  $\mu\text{M}$ .

### **3.8.3. Identificació dels metabòlits de l'àcid maslínic en el contingut dels diferents segments intestinals per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS**

*Instrument.* Les mostres s'han analitzat en un cromatògraf de líquids d'alta eficàcia Accela equipat amb un desgasificador, una bomba quaternària i un injector automàtic acoblat a un espectròmetre de masses LTQ-Orbitrap Velos amb font d'APCI operant en mode negatiu. El control de l'aparell i l'adquisició de les dades s'ha realitzat mitjançant el programa Xcalibur<sup>TM</sup> 2.0 (Thermo Scientific).

*Condicions cromatogràfiques.* Les condicions cromatogràfiques són les mateixes que les especificades a l'apartat 3.7.2.1, excepte el volum d'injecció, que ha estat de 10  $\mu\text{L}$ .

*Condicions de l'espectròmetre de masses.* Els paràmetres de l'espectròmetre de masses LTQ-Orbitrap s'han ajustat per a la determinació de l'àcid maslínic mitjançant la infusió d'una solució del triterpè de 100 µM en metanol al 80% a un flux 10 µL/min, injectada directament a la fase mòbil a través d'una xeringa acoblada a una bomba. Els valors òptims dels diferents paràmetres es recullen en la Taula 3.4.

L'adquisició de les dades s'ha fet en mode d'escombratge complet (*full scan*) amb transformada de Fourier i en un rang d' $m/z$  de 100 a 1000. S'ha treballat a uns poders de resolució de 60.000 o 100.000 (per a  $m/z$  de 400) i amb el *microscan count* fixat a la unitat. El control del guany automàtic (AGC) s'ha establert en  $1 \times 10^6$ .

L'equip s'ha calibrat diàriament d'acord amb les recomanacions del fabricant.

**Taula 3.4.** Paràmetres de la font d'APCI per a la determinació de l'àcid maslínic per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS.

Paràmetre	Valor
Temperatura	450°C
Gas camisa	50 ua
Flux del gas auxiliar	5 ua
Gas cortina	0 ua
Corrent de descàrrega	5 µA
Nivell de radiofreqüència de la lent S	70%
Temperatura del gas del capil·lar	300°C

*Processament de les dades.* La cerca de metabòlits de l'àcid maslínic en les mostres de contingut intestinal s'ha realitzat tant manualment amb el programa Xcalibur Qual Browser com de manera automàtica amb el programa MetWorks™ 1.3 (Thermo Scientific). El programa Xcalibur Qual Browser s'ha emprat per al processament de les dades i per al càlcul de les composicions elementals, que s'han seleccionat d'acord amb les masses exactes i la distribució isotòpica. L'exactitud s'ha calculat com la diferència entre la massa mesurada i la massa teòrica dividida pel valor teòric, expressada en mDa. D'altra banda, la identificació de metabòlits mitjançant el programa Metworks™ es basa en la comparació de les mostres problema amb el corresponent blanc, tot cercant les biotransformacions de fase I i de fase II més habituals. El criteri per a la selecció de metabòlits ha estat que la desviació de la massa respecte el valor predit sigui inferior a 5 ppm.

### 3.8.4. Determinació de l'àcid maslínic en el plasma

*Extracció del plasma.* El procés d'extracció és el mateix que l'emprat en el mètode d'HPLC, però adaptat a l'equip d'HPLC-MS (Sánchez-González *et al.*, 2013; veure annex). S'ha partit d'un volum de 200 µL de plasma al qual s'han afegit 10 µL de la solució de treball del patró intern (àcid betulínic 5 µM). Seguidament, s'han afegit 2 mL d'acetat d'etil i les mostres s'han agitat vigorosament al vòrtex durant 3 min abans de centrifugar-les a 3300xg, a 4°C i durant 15 min. Els sobrenedants s'han separat i s'han reservat mentre s'ha fet a una segona extracció del plasma procedint de la mateixa manera. Ambdues fraccions orgàniques s'han ajuntat i s'ha evaporat el dissolvent a sequedat al concentrador a 45°C. La reconstitució s'ha fet amb 100 µL de metanol al 80% i agitació al vòrtex durant 5 min, seguit d'immersió en el bany d'ultrasons

durant 1 min. Després d'una darrera centrifugació a 25000×g, a 4°C i durant 15 min les mostres s'han transferit a vials topazi per a l'anàlisi.

*Instrument i condicions analítiques.* L'anàlisi de les mostres s'ha dut a terme en l'equip d'HPLC-MS i a les condicions detallades en l'apartat 3.7.2.1. L'espectròmetre de masses, de quadrupol senzill, s'ha equipat amb una font d'APCI operant en mode negatiu. Per a l'adquisició de dades s'han monitoritzat les  $m/z$  de 471,3 i 455,3, corresponents a les formes desprotonades de l'àcid maslínic i l'àcid betulínic (patró intern), respectivament.

*Quantificació de l'àcid maslínic.* S'ha preparat una recta patró en plasma en el rang de concentracions de 50 a 500 nM i patró intern a 250 nM. A un volum de 190 µL de plasma blanc s'han afegit 10 µL de les corresponents solucions de treball d'àcid maslínic i 10 µL de la solució de treball del patró intern. Aquests patrons s'han sotmès al mateix tractament que les mostres problema i s'han analitzat immediatament després de la seqüència de mostres. La concentració d'àcid maslínic s'ha obtingut de la interpolació de la ràtio de les àrees dels pics cromatogràfics d'àcid maslínic i de patró intern a la recta patró. Les concentracions es proporcionen en nM i els resultats s'expressen en forma de mitjana ± error estàndard.

### **3.9. ESTUDI DE L'ABSORCIÓ INTESTINAL DE L'ÀCID MASLÍNIC**

#### **3.9.1. Tècnica *ex vivo* dels sacs evertits**

La primera aproximació a l'estudi de l'absorció intestinal de l'àcid maslínic s'ha realitzat mitjançant la tècnica *ex vivo* dels sacs evertits, proposada inicialment per Wilson i Wiseman (1954). Breument, aquesta tècnica consisteix a preparar sacs a partir de segments intestinals evertits, omplir-los i incubar-los amb medis fisiològics d'una composició salina determinada i amb o sense el compost d'interès, de manera que es posi de manifest el seu mecanisme de pas a través de la paret intestinal.

*Obtenció dels sacs evertits.* S'han emprat rates mascle de la soca Sprague-Dawley d'un pes entre 300 i 350 g. Els animals, sotmesos a dejuni previ, s'han anestesiats amb ketamina (90 mg/kg) i xilacina (10 mg/kg) per via intramuscular. Tot i que la via habitual per a l'administració d'aquests anestèsics és la intraperitoneal, en experiments d'absorció intestinal és preferible evitar-la ja que l'anestèsia podria exercir un efecte local sobre els processos de transport intestinal. Un cop s'ha comprovat la pèrdua dels reflexos podal i palpebral s'ha practicat una laparotomia per extreure el jejú.

La manipulació de l'intestí s'ha realitzat sempre al damunt d'una placa de vidre mantinguda en contacte amb gel per alentir el deteriorament del teixit i amb cura de no malmetre la mucosa. A més, el teixit s'ha anat humitejant periòdicament amb sèrum fisiològic (NaCl 0,9%) per evitar-ne l'assecamet. En primer lloc, s'han retirat restes de mesenteri i greix mesentèric i s'ha eliminat el contingut intestinal fent passar sèrum fisiològic a 4°C per la llum intestinal. Tot seguit, el segment s'ha evertit amb l'ajuda d'un ganxet. Per això, l'agulla s'ha introduït en tota la seva

longitud pel lumen del segment intestinal i per l'extrem corbat s'ha lligat al teixit mitjançant una doble lligadura. L'eversió s'ha realitzat fent avançar el teixit proper a la zona de la lligadura fins que tota la longitud del segment ha quedat evertida. Per a la confecció dels sacs el jejú s'ha tallat en segments d'uns 4 cm, que s'han lligat fortament per un extrem abans de pesar-los (P1). A continuació s'ha fet una lligadura a l'extrem contrari deixant-la oberta per poder omplir el sac amb el medi corresponent (anomenat a partir d'ara medi serosal). S'ha introduït una agulla de punta roma unida a una xeringa que conté aquest medi, s'ha estret la lligadura al voltant de l'agulla i el sac s'ha anat omplint fins que s'ha observat la turgència adequada. Finalment, s'ha retirat l'agulla i immediatament s'ha completat fortament la lligadura per tancar aquest extrem del sac. El segment intestinal s'ha tornat a pesar (P2), de manera que la diferència entre P1 i P2 correspon al volum de medi serosal introduït en el sac (Vi).

*Incubació dels sacs evertits i condicions experimentals.*

Els sacs s'han incubat durant 35 min en 20 mL de medi d'incubació (medi mucosal) mantenint-los en un bany termostatitzat a 37°C i amb oxigenació constant. La composició salina d'ambdós medis, mucosal i serosal, és la que es mostra en la Taula 3.5. En els medis d'incubació que contenen àcid maslínic el compost s'ha afegit a una concentració de 100 µM a partir d'una solució estoc de 10 mM, preparada en HPBCD al 40% i CMC al 0,5% segons el protocol descrit en l'apartat 3.4.2. Per tant, la concentració d'excipients al medi d'incubació ha estat del 0,38% per a la HPBCD i del 0,005% per la CMC.

**Taula 3.5.** Composició salina dels medis d'incubació per als experiments en sacs intestinals evertits.

Component	Concentració (mM)
NaCl	135
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,0
KCl	4,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,2
CaCl <sub>2</sub>	0,5

Pel que fa les condicions experimentals, per una banda s'han incubat sacs en medi mucosal amb àcid maslínic (100 µM) i medi serosal sense àcid maslínic, situació en la qual podrien coexistir els processos de difusió passiva i de transport actiu. Per altra banda, i a fi d'acotar el mecanisme de pas de l'àcid maslínic a través de la paret intestinal, s'han incubat sacs en medis mucosal i serosal amb la mateixa concentració del compost (100 µM), condició en la qual el triterpè només seria transportat activament.

*Tractament de les mostres.* Finalitzat el període d'incubació s'ha recuperat el medi serosal de cada sac i s'ha agafat una alíquota del medi mucosal corresponent. Les mostres s'han centrifugat a 25000×g, a 2°C i durant 15 min, i una alíquota de 100 µL del sobrenedant s'ha barrejat amb 400 µL de metanol al 80% (dilució 1:5). La dilució de les mostres ha estat necessària per tal que la concentració d'àcid maslínic es trobi en el rang entre 0,5 i 30 µM, en el qual prèviament s'ha comprovat que l'instrument és lineal. Per últim, s'han afegit 10 µL de



solució estoc del patró intern (àcid betulínic 250 µM) i les mostres s'han centrifugat a les condicions especificades anteriorment abans de transferir-les a vials topazi per a l'anàlisi.

Pel que fa als teixits, un cop buidats el sacs s'han introduït en tubs de vidre de 10 mL i s'hi han afegit 4,5 mL d'acetat d'etil. S'han agitat al vòrtex durant 2 min i s'han deixat a 4°C durant tota la nit. Els tubs s'han tornat a agitar durant 3 min més i s'han centrifugat a 3300×g, a 2°C i durant 30 min. Una alíquota de 4 mL s'ha evaporat a sequedat al concentrador a 45°C i el residu s'ha reconstituït en 250 µL de metanol al 80% mitjançant agitació al vòrtex durant 5 min i immersió en el bany d'ultrasons durant 5 min més. Després d'una breu centrifugació, a una alíquota de 100 µL del sobrenedant s'han afegit 400 µL de metanol al 80% (dilució 1:5) i 10 µL de solució estoc del patró intern. Finalment, les mostres s'han centrifugat a 25000×g, a 2°C i durant 15 min abans d'introduir-les en vials topazi per ser analitzades. El teixit s'ha deixat en una estufa a 60°C durant 48 h per determinar-ne el pes sec.

*Determinació de l'àcid maslínic i els seus metabòlits.* L'àcid maslínic i els seus metabòlits s'han determinat per HPLC-MS mitjançant el mètode detallat en l'apartat 3.7.2. S'han preparat rectes patró d'àcid maslínic en un rang de concentracions de 0,5 a 30 µM per dilució en metanol al 80% de medi amb àcid maslínic (100 µM) que no ha estat incubat. El patró intern s'ha afegit a 5 µM. Les mateixes rectes patró s'han emprat per a la quantificació dels metabòlits, ja que s'ha assumit que la resposta de l'instrument és la mateixa que per al compost pare.

*Càlcul del transport net.* S'entén per transport net la quantitat de substància transportada per 100 mg de teixit durant el període d'incubació. El transport net a la condició 1 s'obté matemàticament segons l'expressió:

$$\text{nmol}/100 \text{ mg teixit} = \frac{V_f \times [S]_f - V_i \times 100 \mu\text{M}}{P_1} \times 100$$

en la qual  $V_i$  i  $V_f$  (mL) són els volums serosal inicial i final, respectivament,  $[S]_f$  (µM) és la concentració d'àcid maslínic en el medi serosal al final de la incubació i  $P_1$  (mg) és el pes humit del sac intestinal abans d'omplir-lo.

A la condició 2, el transport net s'obté matemàticament segons l'expressió:

$$\text{nmol}/100 \text{ mg teixit} = \frac{V_f \times [S]_f}{P_1} \times 100$$

en la qual  $V_f$  (mL) és el volum serosal final,  $[S]_f$  (µM) és la concentració d'àcid maslínic en el medi serosal al final de la incubació i  $P_1$  (mg) és el pes humit del sac intestinal abans d'omplir-lo.

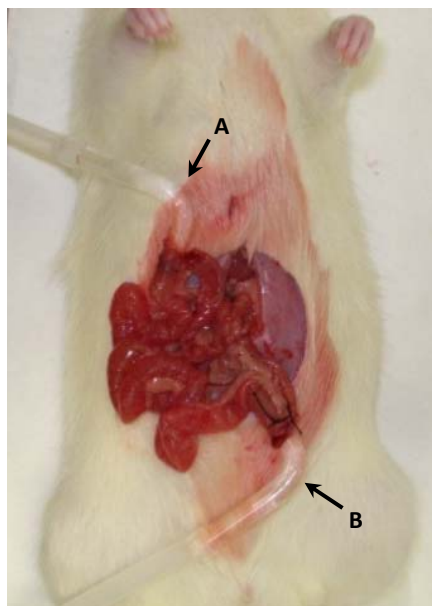
*Expressió dels resultats i anàlisi estadística.* Les concentracions d'àcid maslínic es proporcionen en µM o bé en nmol/100 mg teixit i les dels metabòlits en nM. Els resultats s'expressen en forma de mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística s'ha realitzat mitjançant el programa GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software).

### 3.9.2. Tècnica *in situ* de la perfusió intestinal

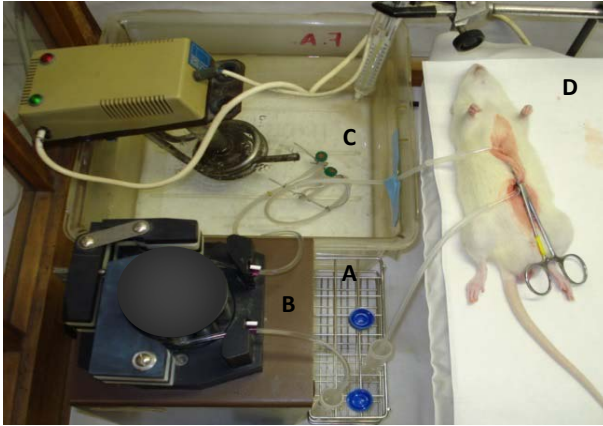
Per a l'estudi de l'absorció intestinal de l'àcid maslínic també s'ha emprat la tècnica de la perfusió intestinal en rata prèviament establerta en el grup (Juan *et al.*, 2010) i que es basa en la inicialment descrita per Ponz *et al.* (1979). Breument, aquesta tècnica consisteix en aïllar un segment intestinal en una rata anestesiada i perfundir-lo amb un medi salí que conté el compost que es vol estudiar a concentracions conegudes. La quantificació del compost en l'efluent permet dilucidar el/s mecanisme/s de transport implicat/s en el pas des de la llum intestinal fins a l'interior de l'enteròcit, així com també el metabolisme que té lloc sobre la molècula original.

*Preparació de l'animal.* S'han emprat rates mascle de la soca Sprague-Dawley i un pes de  $291 \pm 5$  g. Els experiments s'han realitzat en una cambra temperada i amb els animals damunt d'una manta elèctrica a fi de mantenir constant la temperatura corporal. Les rates, sotmeses a dejuni previ, s'han anestesiats amb ketamina/xilacina (90 i 10 mg/kg, respectivament) per via intramuscular. Els reflexos podal i palpebral s'han monitoritzat periòdicament i, en cas necessari, s'ha readministrat anestèsia. En primer lloc s'ha realitzat una incisió abdominal d'uns 3 cm de longitud i s'ha seleccionat el punt d'inserció de la cànula d'entrada, localitzat a uns 10 cm en sentit distal del lligament de Treitz. El vas sanguini principal que irriga aquesta regió s'ha lligat mitjançant un doble nus. A continuació, la cànula (de vidre i d'un diàmetre similar al de l'intestí, ref. E-16782, Vidrafoc S.A, Barcelona, Espanya) s'ha inserit a través d'un petit tall a la zona oposada del mesenteri, menys vascularitzada, i s'ha lligat també amb un doble nus. S'han mesurat uns 30 cm de jejú i s'ha localitzat el punt d'inserció de la cànula de sortida, que s'ha col·locat de la mateixa manera que la cànula d'entrada. La Figura 3.2 mostra les cànules d'entrada i de sortida inserides en el segment intestinal.

Durant tot el procediment la cavitat abdominal s'ha anat humitejant amb sèrum fisiològic per evitar-ne l'assecam. Per últim, el segment intestinal s'ha retornat a la cavitat abdominal, que s'ha tancat mitjançant una pinça de Kocher a fi de mantenir-lo en unes condicions el més similar possible a les fisiològiques.



**Figura 3.2.** Col·locació de les cànules d'entrada (A) i de sortida (B) en el segment de jejú de la rata.



**Figura 3.3.** Imatge del sistema de perfusió en funcionament. La bomba peristàtica (B) impulsa la solució continguda en el recipient (A, tub inferior) a través d'un bany termostatitzat (C) fins assolir el segment intestinal, que es troba dins de la cavitat abdominal de l'animal anestesià i mantingut al damunt de la manta elèctrica (D). La solució perfundida immediatament abans s'està recollint en el tub corresponent (A, tub superior).

*Sistema de perfusió i condicions experimentals.* El sistema de perfusió ha estat constituït per una bomba peristàtica (Minipuls 2, Gilson S.A.S., Villiers-le-Bel, França) acoblada a un tub de PVC d'un diàmetre intern de 2,06 mm (Gilson) que s'introdueix en el recipient que conté la solució que es vol perfundir (tub Falcon de 15 mL). La bomba impulsa la solució a través del primer conducte, que posteriorment està connectat a un tub de goma flexible. Aquest tub passa per un bany termostatitzat, adoptant forma de serpenti, abans d'unir-se amb la cànula d'entrada. La

cànula de sortida s'acobra a un altre tub de goma flexible, que desemboca en el recipient on es troba la solució. El sistema de perfusió complet es pot veure en la Figura 3.3.

La bomba peristàtica s'ha mantingut a un flux constant de 3,6 mL/min. El volum de cada solució perfundida ha estat de 12 mL, de manera que tot el circuit incloent el segment intestinal es manté ple de líquid i que a dins del tub Falcon hi ha sempre un volum restant de 2 mL.

Els volums inicial i final de solució perfundida s'han controlat per pesada. Durant tot l'experiment s'ha tingut cura que no es formin bombolles d'aire en el circuit, que podrien causar errors per la reducció de la superfície d'absorció.

El segment intestinal s'ha perfundit primer sense recirculació amb sèrum fisiològic a fi d'eliminar-ne el contingut. Quan el líquid sortint s'ha vist net s'ha permès l'entrada d'aire al circuit durant 2 min, temps suficient per eliminar tot el volum de sèrum fisiològic del segment. Transcorregut aquest període s'ha introduït el tub calibrat al recipient que conté la primera solució per perfundir i simultàniament s'ha posat en marxa el cronòmetre. La solució s'ha perfundit durant 5 min amb recirculació, és a dir, de manera que la solució recollida a la sortida del segment intestinal s'introdueix en el tub Falcon per ser perfundida de nou. Per últim s'ha deixat circular aire durant 2 min, alhora que s'ha anat obtenint tot el volum de solució perfundida. Finalitzat aquest temps ha començat la perfusió de la següent solució.

El medi de perfusió s'ha preparat abans de cada experiment i té la mateixa composició salina que el medi d'incubació emprat en la tècnica dels sacs evertits (Taula 3.6). L'addició de l'àcid

maslínic al medi de perfusió s'ha realitzat a partir d'una solució estoc de 2000  $\mu\text{M}$  en HPBCD al 20%, preparada prèviament segons el protocol descrit en l'apartat 3.4.2. A més, s'ha tingut en compte que a totes les concentracions d'àcid maslínic hi hagi el mateix percentatge d'HPBCD. Donat que a 20  $\mu\text{M}$  d'àcid maslínic, la màxima concentració perfundida, la HPBCD es troba en un 0,2%, a la resta de concentracions s'ha afegit el volum d'HPBCD necessari per assolir la mateixa proporció d'excipient i eliminar així un factor que podria introduir variabilitat en els resultats. A més, s'ha comprovat que totes les solucions tenien un pH de 7,3–7,4 i una osmolaritat de 280–300 mOsmol/kg.

*Estudi de la cinètica de transport intestinal de l'àcid maslínic.* Per a l'estudi de la cinètica d'absorció intestinal de l'àcid maslínic el triterpè s'ha afegit al medi de perfusió a les concentracions de 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 i 20  $\mu\text{M}$ . En cada experiment s'han assajat 5–6 concentracions d'àcid maslínic, començant sempre per la més baixa i totes elles perfundides per triplicat. Abans, però, s'ha perfundit medi blanc, necessari per a la posterior preparació de la recta patró.

*Estudi del mecanisme de transport intestinal de l'àcid maslínic.* La implicació de mecanismes de transport actiu en l'entrada de l'àcid maslínic als enteròcits s'ha avaluat mitjançant l'ús de 2,4-dinitrofenol (DNP), un agent desacoblant de la fosforilació oxidativa, a una concentració d'1 mM (Cheng *et al.*, 2010). En aquests experiments el segment intestinal s'ha perfundit inicialment durant 10 min i sense recirculació amb medi de perfusió sense àcid maslínic al qual s'ha afegit DNP. A continuació s'han perfundit solucions d'àcid maslínic (0,01; 0,5; 2,5 i 20  $\mu\text{M}$ ) que també contenien DNP seguint el protocol detallat anteriorment.

Al final de l'experiment s'ha obtingut el segment intestinal perfundit, extraient-lo amb les dues cànules encara fixades, a fi de prendre'n diferents mesures. En primer lloc, se n'ha determinat la longitud seguint una estratègia similar a la proposada per Ponz *et al.* (1979). La cànula d'entrada es manté lligada a l'intestí i se sosté en un punt fix mentre que la cànula de sortida es retira i en aquest extrem es penja un pes de 16 g. El valor obtingut (L) es multiplica per un factor de 0,8, que correspon a una estimació arbitrària de la relació entre L i la longitud del mateix segment a les condicions fisiològiques de l'experiment. La mesura de la longitud del segment intestinal subjectat a un pes constant i aplicant un factor de correcció constant permet reduir la variabilitat associada, ja que en estat relaxat diferents teixits poden presentar diferències en el to muscular.

A continuació, el segment intestinal s'ha obert longitudinalment sobre un vidre humitejat amb sèrum fisiològic i se n'ha determinat l'amplada en diferents punts. Per als càlculs posteriors s'ha obtingut l'amplada mitjana. També s'han mesurat el pes humit, assecant lleugerament el teixit, i el pes sec, després de mantenir el segment en una estufa a 60°C durant 48 h.

*Tractament de les mostres.* Els tubs amb les solucions perfundides s'han centrifugat a 3300×g, a 2°C i durant 15 min. Seguidament, una alíquota de 250 µL del sobrenedant s'ha barrejat amb 250 µL de metanol al 100% (dilució 1:2) i 10 µL de solució estoc del patró intern (àcid betulínic 250 µM). Per últim, les mostres s'han centrifugat a 20000×g, a 2°C i durant 15 min abans de posar-les en vials per a l'anàlisi.

*Determinació de l'àcid maslínic i els seus metabòlits.* L'àcid maslínic i els seus metabòlits s'han determinat per HPLC-MS mitjançant el mètode detallat en l'apartat 3.7.2. S'han preparat rectes patró d'àcid maslínic en medi blanc perfundit en el rang de concentracions entre 0,005 i 15 µM i patró intern a 5 µM. A un volum de 490 µL de medi blanc perfundit s'han afegit 10 µL de les corresponents solucions de treball d'àcid maslínic, se n'ha fet una dilució 1:2 en metanol al 100% i s'han afegit 20 µL de solució estoc del patró intern. Les mateixes rectes patró s'han emprat per a la quantificació dels metabòlits, ja que s'ha assumit que la resposta de l'instrument és la mateixa que per al compost pare.

*Càlcul de l'absorció intestinal.* L'absorció intestinal de l'àcid maslínic s'ha estimat a partir de la desaparició del compost de les solucions perfundides, segons l'expressió:

$$\text{pmol/5 min} \times \text{mg teixit} = \frac{V_i \times C_i - V_f \times C_f}{P}$$

en la qual  $V_i$  i  $V_f$  (mL) són els volums inicial i final de les solucions perfundides,  $C_i$  i  $C_f$  (µM) són les concentracions inicial i final d'àcid maslínic en aquestes solucions i  $P$  (mg) és el pes sec del segment intestinal perfundit.

L'aparició de metabòlits en les solucions perfundides s'ha calculat segons l'expressió:

$$\text{pmol/5 min} \times \text{mg teixit} = \frac{V_f \times C_f}{P}$$

en la qual  $V_f$  (mL) és el volum final de les solucions perfundides,  $C_f$  (µM) és la concentració final de metabòlits en aquestes solucions i  $P$  (mg) és el pes sec del segment intestinal perfundit.

*Expressió dels resultats i anàlisi estadística.* Les quantitats d'àcid maslínic i de metabòlits es proporcionen en pmol/5 min × mg teixit i en fmol/5 min × mg teixit, respectivament. Els resultats s'expressen en forma de mitjana ± error estàndard. Per establir el tipus de cinètica d'absorció intestinal de l'àcid maslínic s'ha emprat el programa Enzfitter (Biosoft®, Great Shelford, Cambridge, Regne Unit). Per a l'obtenció de la constant aparent d'absorció i per a l'anàlisi dels resultats en els assaigs amb DNP s'ha usat el programa GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software).

### 3.10. ESTUDI DE L'EFECTE DE L'ÀCID MASLÍNIC SOBRE LESIONS PRENEOPLÀSIQUES EN CÒLON DE RATA

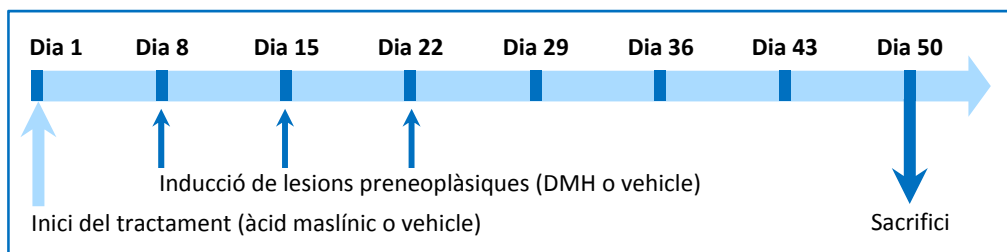
#### 3.10.1. Animals d'experimentació i grups experimentals

S'han emprat rates de la soca Sprague-Dawley, tant mascles com femelles, amb pesos inicials de  $190 \pm 4$  g i  $175 \pm 4$  g, respectivament. Els animals s'han dividit en diferents grups experimentals, segons si se'ls han induït lesions preneoplàsiques i també en funció de si se'ls ha administrat àcid maslínic.

Els grups tractats amb el triterpè l'han rebut per via oral, mitjançant una sonda intragàstrica, a dosis de 5, 10 o 25 mg/kg i emprant un volum d'administració de 10 mL/kg. Les administracions s'han realitzat diàriament al llarg de 49 dies.

D'altra banda, l'agent carcinogen emprat per a la inducció de lesions preneoplàsiques ha estat l'1,2-dimetilhidrazina (DMH) dissolta en EDTA (1 mM pH 6,5) administrada per mitjà d'injecció intraperitoneal a una dosi de 20 mg/kg i emprant un volum d'administració d'1 mL/kg. La DMH s'ha administrat un cop per setmana, concretament els dies 8, 15 i 22 del període experimental.

Per tant, els animals dels grups tractats han rebut l'àcid maslínic durant la setmana prèvia a la inducció de lesions, al llarg de les 3 setmanes en les quals s'han realitzat les injeccions de DMH i també durant les 4 setmanes següents (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Esquema del disseny experimental per a l'estudi de l'activitat quimiopreventiva de l'àcid maslínic sobre lesions preneoplàsiques induïdes en el còlon de rata.

En paral·lel amb el tractament amb àcid maslínic i les induccions amb DMH, els animals dels grups control han rebut únicament els vehicles (HPBCD i EDTA, respectivament) (Taula 3.6).

Al llarg de tots els períodes experimentals s'ha registrat diàriament el pes corporal dels animals i cada dos dies també s'ha controlat el consum de pinso i aigua, a fi de determinar si els tractaments tenen algun efecte sobre aquestes variables. A més, a partir de l'increment de pes i el consum de pinso setmanals s'ha calculat l'eficiència de la conversió d'aliment, tal com s'ha especificat per a l'estudi de la toxicitat aguda (apartat 3.5.1).

**Taula 3.6.** Grups experimentals inclosos en els estudis de l'activitat quimiopreventiva de l'àcid maslínic en rates mascles i femelles. També s'indiquen els corresponents productes administrats i el nombre d'animals inclosos en cada grup.

Grup	Tractament	Inducció de lesions	n
<b>RATES MASCLES</b>			
<i>Dosi d'àcid maslínic: 5 mg/kg</i>			
<b>Control</b>	HPBCD 20 %	EDTA 1 mM pH 6,5	3
<b>Àcid maslínic 5 mg/kg</b>	Àcid maslínic 0,5 mg/mL	EDTA 1 mM pH 6,5	6
<b>DMH</b>	HPBCD 20%	DMH 20 mg/mL	4
<b>DMH-Àcid maslínic 5 mg/kg</b>	Àcid maslínic 0,5 mg/mL	DMH 20 mg/mL	7
<i>Dosi d'àcid maslínic: 10 mg/kg</i>			
<b>Control</b>	HPBCD 20%	EDTA 1 mM pH 6,5	4
<b>Àcid maslínic 10 mg/kg</b>	Àcid maslínic 1 mg/mL	EDTA 1 mM pH 6,5	6
<b>DMH</b>	HPBCD 20%	DMH 20 mg/mL	4
<b>DMH-Àcid maslínic 10 mg/kg</b>	Àcid maslínic 1 mg/mL	DMH 20 mg/mL	6
<i>Dosi d'àcid maslínic: 25 mg/kg</i>			
<b>Control</b>	HPBCD 40% - CMC 0,5%	EDTA 1 mM pH 6,5	2
<b>DMH</b>	HPBCD 40% - CMC 0,5%	DMH 20 mg/mL	6
<b>DMH-Àcid maslínic 25 mg/kg</b>	Àcid maslínic 2,5 mg/mL	DMH 20 mg/mL	7
<b>RATES FEMELLES</b>			
<b>DMH</b>	HPBCD 20 %	DMH 20 mg/mL	9
<b>DMH-Àcid maslínic 5 mg/kg</b>	Àcid maslínic 0,5 mg/mL	DMH 20 mg/mL	5
<b>DMH-Àcid maslínic 10 mg/kg</b>	Àcid maslínic 1 mg/mL	DMH 20 mg/mL	5
<b>DMH-Àcid maslínic 25 mg/kg</b>	Àcid maslínic 2,5 mg/mL	DMH 20 mg/mL	5

### 3.10.2. Sacrifici i obtenció de mostres

Al final del període experimental s'ha procedit al sacrifici dels animals i a l'obtenció de mostres. Les rates, sotmeses a dejuni previ, s'han anestesiats amb ketamina/xilacina (90 i 10 mg/kg, respectivament) per via intraperitoneal. Un cop comprovada la pèrdua de reflexos s'ha obtingut sang per punció cardíaca en tubs amb anticoagulant per a la posterior determinació de l'àcid maslínic en plasma. Seguidament s'ha practicat una laparotomia per obtenir el còlon, que s'ha extret des de la unió amb el cec fins a l'alçada de la sínfisi púbica, punt de referència a partir del qual es considera que comença el recte. La manipulació del còlon s'ha realitzat al damunt d'una placa de vidre mantinguda en contacte amb gel, a fi d'alentir el deteriorament del teixit, i procurant no malmetre la mucosa. A més, el teixit s'ha anat humitejant periòdicament amb PBS a 4°C per evitar-ne l'assecamet. En primer lloc s'han retirat restes de mesenteri i greix mesentèric, que podrien dificultar la posterior observació de la mucosa al microscopi òptic. El contingut intestinal s'ha obtingut fent passar 5 mL de PBS per l'interior del còlon i recollint-lo en un tub de plàstic de 10 mL prèviament tarat. La fracció sòlida i la fracció líquida s'han separat per centrifugació i se n'ha mesurat el pes o el volum, respectivament. Fins al moment de

l'anàlisi, aquestes mostres s'han conservat a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A continuació s'ha practicat un tall longitudinal per obrir el còlon i s'ha dividit en tres parts d'aproximadament la mateixa longitud, corresponents als segments proximal, medial i distal. El segment proximal es distingeix clarament perquè presenta uns repliegaments característics de la mucosa. Tot seguit, la superfície de la mucosa s'ha netejat suaument amb una gasa humitejada amb PBS per eliminar completament restes de contingut intestinal. S'ha mesurat la longitud i l'amplada dels tres segments, així com també el pes humit, després d'haver-los assecat lleugerament. Cada segment s'ha disposat al damunt d'una placa de poliestirè, deixant el costat mucosal a la part superior, i s'ha fixat amb agulles alhora que s'ha anat estirant. La placa s'ha col·locat cap per avall en un recipient hermètic amb formalina, de manera que, en surar, els segments de còlon han quedat en contacte amb la formalina. Els teixits s'han mantingut a  $4^{\circ}\text{C}$  durant un mínim de 24 h abans de procedir a tenyir-los.

### **3.10.3. Tincions histològiques per al recompte de lesions preneoplàsiques**

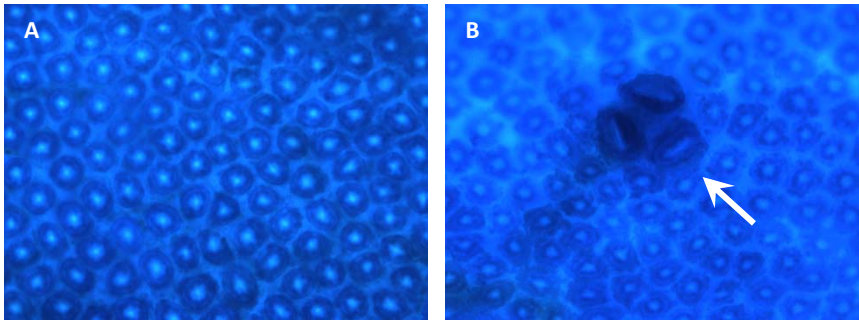
*Blau de metilè al 0,2% en PBS.* La tinció dels segments de còlon amb blau de metilè permet el recompte de focus de criptes aberrants (FCA) (Bird, 1987), és a dir, criptes hiperplàsiques indicatives de la primera etapa del procés carcinogènic (Perše i Cerar, 2011). El colorant s'ha preparat dissolent en calent 200 mg de blau de metilè en aproximadament 90 mL de PBS. La solució s'ha deixat refredar a temperatura ambient i llavors s'ha enrasat fins a un volum de 100 mL. Abans de cada ús el colorant s'ha filtrat per evitar la presència de partícules que podrien interferir en l'observació dels teixits al microscopi. Els temps de tinció varien segons el segment, el proximal s'ha tenyit durant 8 minuts, mentre que el medial i el distal s'han mantingut en el colorant durant 10 minuts. Un cop tenyits, els segments s'han disposat al damunt de portaobjectes i s'han cobert amb unes gotes de PBS i un cobreobjectes per evitar l'assecament del teixit. El recompte d'FCA s'ha realitzat a 6 augments al microscopi òptic (Leitz, Leica Microsistemas S.L.U., Barcelona). Els FCA es distingeixen de les criptes normals en els següents aspectes (Bird, 1987):

- es tenyeixen amb més intensitat que les criptes normals
- són 2 o 3 vegades més grans
- solen estar en un pla més elevat que la resta de la superfície del còlon
- presenten una obertura distorsionada, de forma allargada

Alhora que es realitzaven els recomptes els FCA s'han anat classificant segons el nombre de criptes aberrants que contenia cada focus. Al finalitzar els recomptes, els segments s'han conservat en PBS i a  $4^{\circ}\text{C}$  fins al moment de realitzar la següent tinció.

La Figura 3.5 mostra imatges de la superfície del còlon observada al microscopi després de la tinció amb blau de metilè.



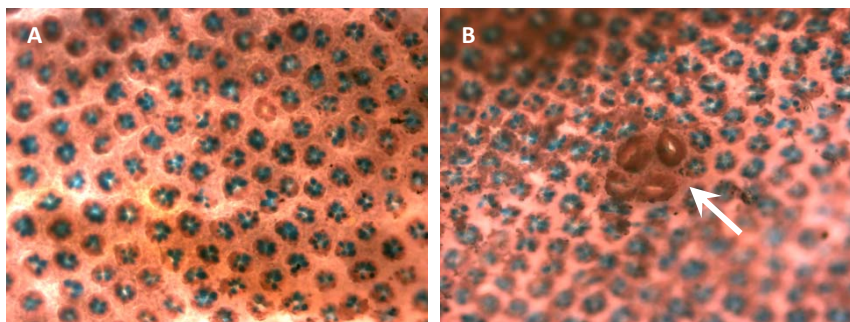


**Figura 3.5.** Superfície de la mucosa del còlon tenyida amb blau de metilè, sense lesions preneoplàsiques (A) i amb un focus de 3 criptes aberrants (B). Imatges obtingudes al microscopi òptic (Olympus) a 10 augments.

*Solució de diamines i ferro, blau alcià i vermell neutre.* La tinció dels segments de còlon amb diamines i ferro, blau alcià i vermell neutre permet observar en les criptes la producció de sulfomucines i mucines carboxilades, que queden tenyides de color blau fosc (Spicer, 1965) sobre un fons ataronjat. Aquells focus en els quals no s'observen mucines, anomenats a partir d'ara focus de criptes amb depleció de mucines (FDM), presenten un grau més elevat de displàsia que els FCA i són, per tant, indicatius d'un estadi més avançat del procés carcinogènic (Caderni *et al.*, 2003).

En una primera fase, els segments intestinals s'han submergit en una solució de diamines i ferro, en la qual s'han deixat entre 18 i 24 h a temperatura ambient i protegits de la llum. Per a la preparació d'aquesta solució ha estat necessari obtenir primer una solució de clorur de ferro (III) al 60%. Per això, s'han dissolt 60 g de clorur de ferro (III) en aproximadament 90 mL d'aigua ultrapura. La reacció és exotèrmica, per tant s'ha deixat refredar a temperatura ambient abans d'enrasar-la fins a un volum de 100 mL. A continuació, i per a un volum final de 100 mL de solució de diamines, s'han pesat i dissolt en aigua 240 mg de clorhidrat d'N,N-dimetil-*m*-fenilendiamina i 40 mg de clorhidrat d'N,N-dimetil-*p*-fenilendiamina. S'han afegit 2,8 mL de la solució de clorur de ferro (III) i s'ha agitat fins la total homogeneïtzació de la solució (Bancroft i Gamble, 2002). Donat que les diamines són fotosensibles, durant la preparació de la solució i la posterior tinció dels teixits s'ha treballat sota llum vermella. En una segona fase, passades 18–24 h, el teixit s'ha rentat amb PBS i s'ha procedit a la tinció amb els colorants blau alcià a l'1% i vermell neutre al 0,1%. El blau alcià s'ha preparat dissolent 1 g de colorant en aproximadament 90 mL d'una solució d'àcid acètic al 3% i enrasant fins a un volum de 100 mL. Així, el pH ha quedat ajustat a 2,5 (Bancroft i Gamble, 2002). Finalment, s'han afegit uns cristalls de timol com a conservant. El vermell neutre s'ha preparat a partir de 100 mg de colorant, que s'han dissolt en aproximadament 90 mL d'una solució d'àcid acètic al 0,002% abans d'enrasar-la fins a un volum de 100 mL. Tant el blau alcià com el vermell neutre s'han filtrat abans del seu ús. Els temps de tinció dels segments de còlon en aquests colorants han estat de 5 i 2 min, respectivament, amb rentats intermedis i finals amb PBS. Per últim, els teixits s'han muntat en

portaobjectes tal com s'ha explicat anteriorment. El recompte d'FDM s'ha realitzat a 6 augments al microscopi òptic Leitz, considerant només aquells que presenten absència o molt baixa producció de mucines alhora que compleixen almenys dos dels tres darrers criteris especificats per a la tinció amb blau de metilè. La Figura 3.6 mostra imatges de la superfície del còlon observada al microscopi després de la tinció amb les solucions de diamines i ferro, blau alcí i vermell neutre.



**Figura 3.6.** Superfície de la mucosa del còlon tenyida amb les solucions de diamines i ferro, blau alcí i vermell neutre, sense lesions (A) i amb un focus de 4 criptes amb depleció de mucines (B). Imatges obtingudes al microscopi òptic Olympus a 10 augments.

De manera simultània al recompte, els FDM s'han anat classificant segons el nombre de criptes pels quals estaven formats.

#### **3.10.4. Determinació de l'àcid maslínic en el contingut del còlon i en el plasma i identificació dels metabòlits en el contingut del còlon**

L'àcid maslínic s'ha quantificat en el contingut del còlon i en el plasma a fi de poder correlacionar l'efecte del triterpè sobre les lesions preneoplàsiques amb les concentracions assolides aquestes matrius.

Pel que fa el contingut del còlon, les mostres de fracció sòlida i de fracció líquida s'han extret seguint el procediment detallat en l'apartat 3.7.1 i posteriorment s'han analitzat per HPLC-MS mitjançant el mètode descrit en l'apartat 3.7.2. S'han preparat rectes patró en l'extracte metanòlic de contingut intestinal blanc en el rang de concentracions de 0,005 a 30  $\mu\text{M}$  i patró intern a 5  $\mu\text{M}$ .

Per a les mostres de plasma s'ha emprat el mètode d'extracció seguit de la determinació per HPLC-MS descrits en l'apartat 3.8.4. Donades les baixes concentracions d'àcid maslínic esperades al temps d'extracció de les mostres (aproximadament 24 h després de la darrera administració del triterpè) s'han preparat rectes patró en plasma en el rang de concentracions de 10 a 500 nM i patró intern a 250 nM.

D'altra banda, la identificació de metabòlits en les mostres de contingut de còlon s'ha realitzat mitjançant la tècnica d'HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS, usant el mètode detallat en l'apartat 3.8.3.

### **3.10.5. Expressió dels resultats, anàlisi estadística i captació d'imatges**

Els recomptes de lesions preneoplàsiques es proporcionen en nombre de focus (FCA o FDM) normalitzat per àrea, ja sigui en còlon total o per segments. Les concentracions es donen en nM per al plasma i en nmols/g per al contingut del còlon. En tots els casos els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard.

L'anàlisi estadística s'ha realitzat amb el programa GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software). Les diferències entre grups s'han avaluat mitjançant la prova *t* d'Student o l'ANOVA d'un factor seguit del test de Bonferroni, mentre que les diferències entre grups en funció del temps i del segment s'han comparat mitjançant l'ANOVA de dos factors seguit del test de Bonferroni. En tots els casos s'han considerat diferències amb tres nivells de significació,  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  i  $P < 0,001$ .

Les imatges de la superfície de la mucosa del còlon s'han obtingut en el microscopi Olympus, que està acoblat a un sistema de captació d'imatges controlat pel programa Cell<sup>^</sup>B 3.1 (Olympus).

**RESULTATS**



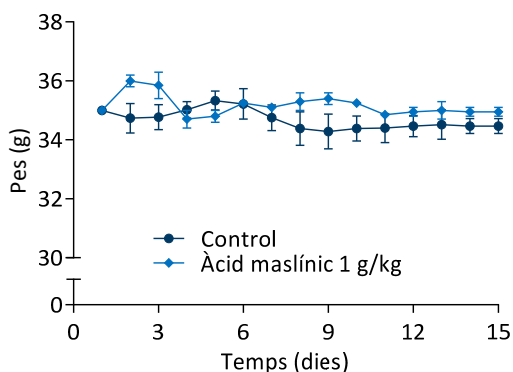
## 4.1. ESTUDI DE LA TOXICITAT DE L'ÀCID MASLÍNIC

### 4.1.1. Toxicitat aguda

En el decurs dels 14 dies posteriors a l'administració d'una dosi d'1 g/kg d'àcid maslínic, s'ha dut a terme un seguiment dels animals, a fi de detectar l'aparició d'efectes adversos. No s'han observat signes de toxicitat atribuïbles al triterpè ni tampoc s'ha registrat cap cas de mort entre els animals.

#### 4.1.1.1. Pes corporal

El pes corporal d'ambdós grups s'ha mantingut constant al llarg del període experimental (Figura 4.1). A l'inici el pes ha estat de 35,0 g de mitjana entre tots els animals, mentre que al final del tractament el pes dels ratolins control ha estat de  $34,5 \pm 0,3$  g i el dels ratolins que han rebut el triterpè ha estat de nou de  $35,0 \pm 0,2$  g.



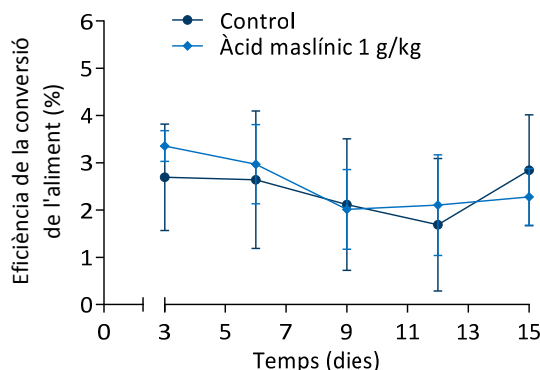
**Figura 4.1.** Evolució diària del pes corporal dels ratolins control i dels ratolins que han rebut una dosi única d'1 g/kg d'àcid maslínic. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 2/\text{grup}$ . No hi ha diferències.

#### 4.1.1.2. Consum de pinso i aigua

El consum de pinso i aigua dels ratolins d'ambdós grups s'ha mantingut constant en el decurs de l'experiment i ha estat similar entre els animals control i els tractats amb àcid maslínic. Mentre que en els primers el consum de pinso i aigua ha estat de mitjana de  $4,25 \pm 0,05$  g/dia i  $4,75 \pm 0,05$  mL/dia, respectivament, per als segons ha estat de  $4,85 \pm 0,08$  g/dia i  $5,54 \pm 0,20$  mL/dia, respectivament.

#### 4.1.1.3. Eficiència de la conversió de l'aliment

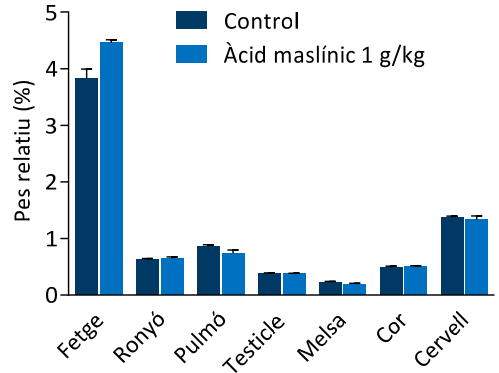
L'eficiència de la conversió de l'aliment, calculada a partir de l'increment de pes i el consum de pinso de cada animal, en percentatge, tampoc no ha mostrat diferències entre ambdós grups de ratolins (Figura 4.2). A l'inici del període experimental l'eficiència ha estat del 2,7% per als animals control i del 3,4% per als ratolins tractats, mentre que al final ha estat del 2,8% i del 2,3%.



**Figura 4.2.** Eficiència de la conversió de l'aliment dels animals inclosos en l'estudi de la toxicitat aguda. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 2/\text{grup}$ . No hi ha diferències.

#### 4.1.1.4. Necròpsia

L'examen macroscòpic realitzat en el moment del sacrifici dels animals no ha revelat alteracions en els principals òrgans de les cavitats abdominal i toràcica derivades de l'exposició a 1 g/kg d'àcid maslínic. Els òrgans s'han extret i se n'ha eliminat el greix i el teixit connectiu abans de determinar-ne el pes humit, a partir del qual s'ha calculat el pes relatiu per comparació amb el pes de cada animal el dia del sacrifici (Figura 4.3). En cap dels òrgans no s'han observat diferències entre els grups control i tractat.

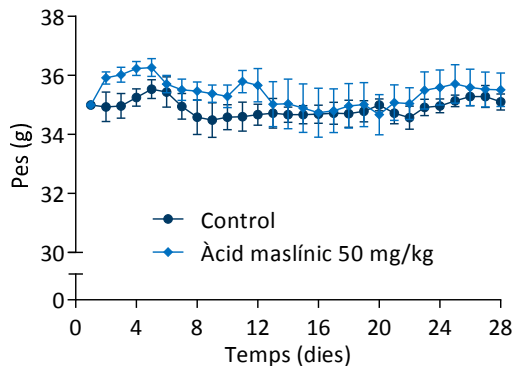


**Figura 4.3.** Pes relatiu dels principals òrgans dels animals inclosos en l'estudi de la toxicitat aguda. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 2/\text{grup}$ . No hi ha diferències.

#### 4.1.2. Toxicitat subaguda

##### 4.1.2.1. Pes corporal

El pes corporal dels ratolins, tant controls com tractats amb àcid maslínic a una dosi de 50 mg/kg, s'ha registrat diàriament al llarg dels 28 dies del període experimental. A la Figura 4.4. s'observa que el creixement dels animals d'ambdós grups ha estat similar. El primer dia el pes ha estat de 35,0 g de mitjana entre tots els animals, mentre que el darrer dia de tractament el pes dels ratolins control ha estat de  $35,1 \pm 0,3$  g i el dels ratolins als quals s'ha administrat el triterpè ha estat de  $35,5 \pm 0,6$  g.



**Figura 4.4.** Evolució diària del pes corporal dels ratolins control i dels ratolins tractats amb àcid maslínic (50 mg/kg) durant 28 dies. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 3-9$ . No hi ha diferències.

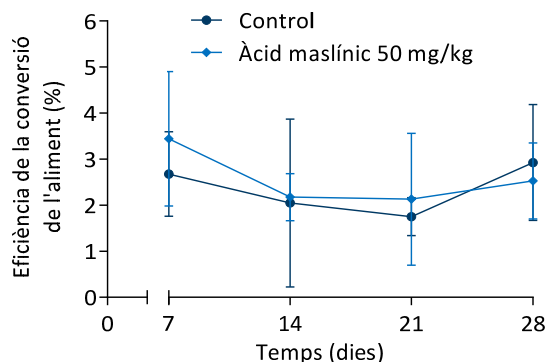
##### 4.1.2.2. Consum de pinso i aigua

El consum de pinso i aigua s'ha registrat cada dos dies a fi de calcular el consum setmanal de cada animal. Si bé el consum de pinso ha estat constant dins de cada grup en el decurs de les quatre setmanes de tractament, la ingesta per part dels ratolins que han rebut àcid maslínic s'ha mantingut lleugerament per sota de la dels ratolins control durant les tres primeres setmanes. Mentre que en aquest període el grup control ha consumit de mitjana  $31,2 \pm 0,3$  g,  $28,3 \pm 0,1$  g i  $28,5 \pm 0,2$  g, respectivament, en paral·lel el grup tractat amb el triterpè ha ingerit  $26,3 \pm 0,8$  g,  $23,7 \pm 0,9$  g i  $25,1 \pm 0,2$  g.

Pel que fa el consum setmanal d'aigua no s'han observat diferències entre ambdós grups al llarg del període experimental. La primera setmana el consum ha estat de  $34,4 \pm 0,9$  mL en els animals control i de  $30,5 \pm 0,6$  mL en els animals que han rebut àcid maslínic; mentre que la darrera setmana els ratolins han begut  $28,1 \pm 1,1$  mL i  $29,3 \pm 1,6$  mL d'aigua, respectivament.

#### 4.1.2.3. Eficiència de la conversió de l'aliment

L'eficiència de la conversió de l'aliment ha estat similar entre els ratolins control i els animals tractats amb el triterpè al llarg de les quatre setmanes de període experimental (Figura 4.5). A l'inici l'eficiència ha estat del  $2,7 \pm 0,9\%$  per als animals control i del  $3,4 \pm 1,5\%$  per als animals als quals s'ha administrat àcid maslínic, mentre que la darrera setmana l'eficiència ha estat del  $2,9 \pm 1,3\%$  i del  $2,5 \pm 0,8\%$ , respectivament.



**Figura 4.5.** Eficiència de la conversió de l'aliment dels animals inclosos en l'estudi de la toxicitat subaguda. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard,  $n = 3-9$ . No hi ha diferències.

#### 4.1.2.4. Anàlisi hematològica i bioquímica

Les anàlisis hematològica i bioquímica de la sang dels ratolins d'ambdós grups, control i àcid maslínic 50 mg/kg, no han mostrat diferències en cap de les variables determinades. El recompte d'eritròcits, així com també l'hematòcrit i la concentració d'hemoglobina, el recompte de leucòcits, tant total com diferencial, i el recompte de plaquetes han evidenciat que l'administració oral repetida del triterpè no indueix alteracions a nivell de les variables hematològiques dels animals (Taula 4.1).

D'altra banda, els resultats de l'anàlisi bioquímica també han evidenciat l'absència d'efectes adversos derivats de l'administració d'àcid maslínic (Taula 4.2). La concentració de colesterol total i colesterol-HDL, així com també de triglicèrids, han posat de manifest que el metabolisme lipídic no es troba alterat en els animals que han rebut el triterpè. La funcionalitat hepàtica, avaluada per mitjà de la determinació de bilirubina i de l'enzim alanina aminotransferasa, i la funcionalitat renal, avaluada mitjançant els nivells de creatinina, tampoc no han diferit respecte les dels animals control. Per últim, pel que fa la concentració sèrica de glucosa i electròlits, concretament els ions sodi, potassi i clorur, també han estat similars entre els animals tractats i els control.



**Taula 4.1.** Variables hematològiques dels ratolins control i dels ratolins als quals s'ha administrat diàriament àcid maslínic (50 mg/kg) durant 28 dies. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard; n = 5–6. No hi ha diferències.

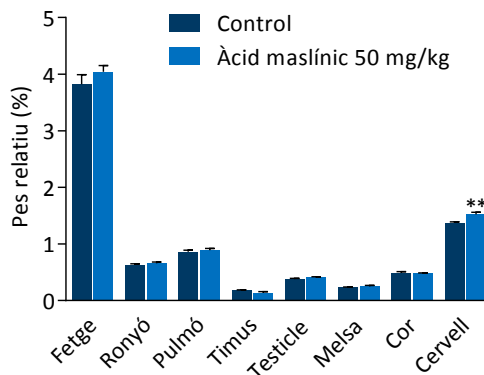
Variabls hematològiques	Control	Àcid maslínic 50 mg/kg
<b>Glòbuls vermells</b>		
Hematòcrit (%)	37,6 $\pm$ 0,8	40,0 $\pm$ 1,6
Eritròcits ( $10^{12}$ /L)	8,08 $\pm$ 0,13	8,55 $\pm$ 0,39
Volum corpuscular mitjà (fL)	46,2 $\pm$ 0,7	46,8 $\pm$ 0,3
Hemoglobina (mM)	7,76 $\pm$ 0,12	8,25 $\pm$ 0,37
Hemoglobina corpuscular mitjana (pg)	15,4 $\pm$ 0,2	15,5 $\pm$ 0,1
Concentració d'hemoglobina corpuscular mitjana (mM)	20,6 $\pm$ 0,06	20,6 $\pm$ 0,19
<b>Glòbuls blancs</b>		
Leucòcits ( $10^9$ /L)	3,52 $\pm$ 0,48	5,28 $\pm$ 1,03
Neutròfils (%)	13,6 $\pm$ 2,1	12,9 $\pm$ 2,2
Limfòcits (%)	83,5 $\pm$ 2,4	85,0 $\pm$ 2,6
Monòcits (%)	2,24 $\pm$ 0,74	1,52 $\pm$ 0,41
Eosinòfils (%)	0,22 $\pm$ 0,16	0,20 $\pm$ 0,18
Basòfils (%)	0,40 $\pm$ 0,11	0,32 $\pm$ 0,09
<b>Plaquetes</b>		
Plaquetes ( $10^9$ /L)	929 $\pm$ 102	980 $\pm$ 79
Volum plaquetari mitjà (fL)	5,88 $\pm$ 0,68	5,32 $\pm$ 0,26

**Taula 4.2.** Variables bioquímiques dels ratolins control i dels ratolins als quals s'ha administrat diàriament àcid maslínic (50 mg/kg) durant 28 dies. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard; n = 6–9. <sup>a</sup> ALT, alanina aminotransferasa. <sup>b</sup> n = 2 (control) i n = 5 (àcid maslínic 50 mg/kg). No hi ha diferències.

Variabls bioquímiques	Control	Àcid maslínic 50 mg/kg
Glucosa (mM)	10,2 $\pm$ 1,6	9,20 $\pm$ 1,02
Colesterol (mM)	3,58 $\pm$ 0,22	3,38 $\pm$ 0,14
Triglicèrids (mM)	0,84 $\pm$ 0,11	1,20 $\pm$ 0,15
HDL (mM)	3,23 $\pm$ 0,17	2,96 $\pm$ 0,15
ALT <sup>a</sup> (IU/L)	190 $\pm$ 58	206 $\pm$ 92
Bilirrubina ( $\mu$ M)	2,13 $\pm$ 0,18	2,08 $\pm$ 0,14
Creatinina ( $\mu$ M)	17,3 $\pm$ 1,8	12,9 $\pm$ 1,4
Sodi <sup>b</sup> (mM)	154 $\pm$ 1	154 $\pm$ 1
Potassi <sup>b</sup> (mM)	3,75 $\pm$ 0,16	4,34 $\pm$ 0,22
Clorur <sup>b</sup> (mM)	112 $\pm$ 2	112 $\pm$ 1

#### 4.1.2.5. Necròpsia

L'examen macroscòpic dels principals òrgans (fetge, ronyó, pulmó, timus, testicle, melsa, cor i cervell) en el moment del sacrifici dels ratolins no ha revelat alteracions, pel que fa a la mida, el color i la textura, derivades de l'administració oral de 50 mg/kg d'àcid maslínic durant 28 dies. Quant al pes relatiu d'aquests òrgans, l'exposició al triterpè no ha resultat en diferències entre els animals control i els tractats, excepte per al cervell, el pes del qual ha estat un 11% més elevat en els animals que han rebut àcid maslínic ( $P < 0,01$ ) (Figura 4.6).

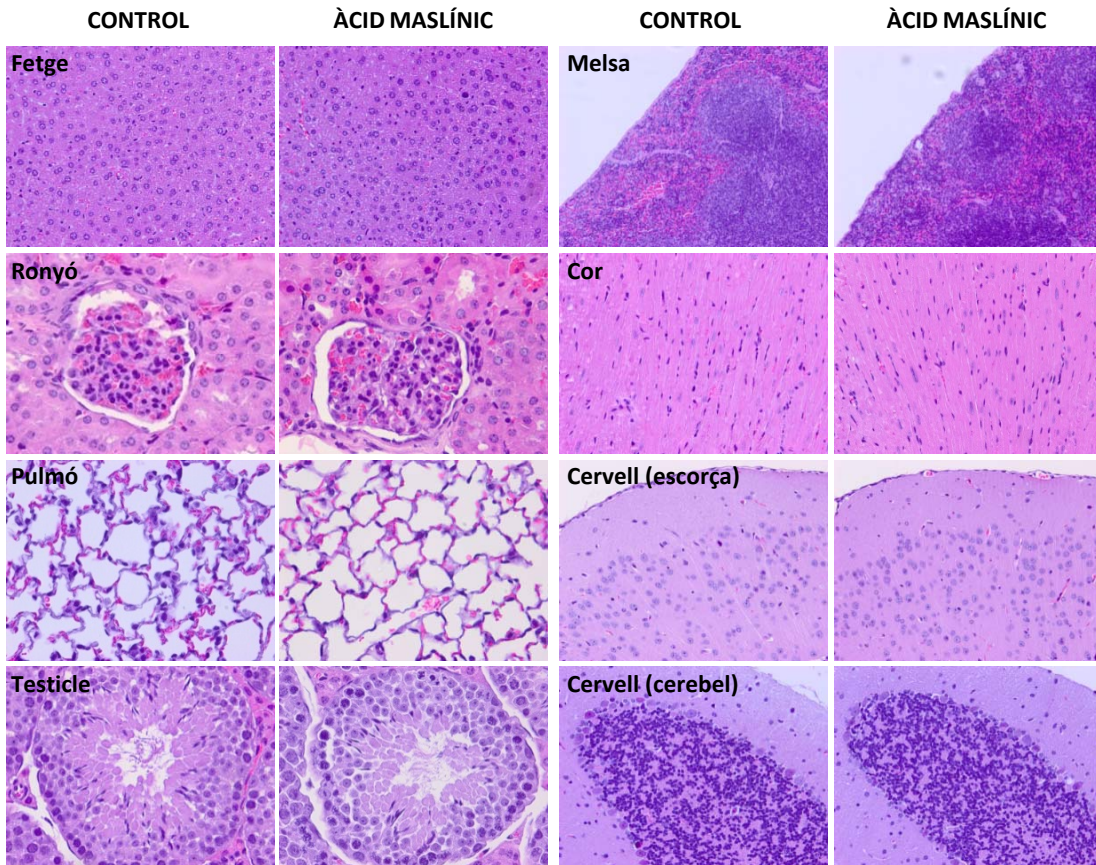


**Figura 4.6.** Pes relatiu dels principals òrgans dels ratolins control i dels ratolins als quals s'ha administrat àcid maslínic (50 mg/kg) durant 28 dies. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 6-9$ /grup. \*\* vs control ( $P < 0,01$ ).

#### 4.1.2.6. Anàlisi histopatològica

Els òrgans extrets i fixats amb formalina s'han inclòs en parafina a fi d'obtenir-ne seccions de 5  $\mu\text{m}$ , que s'han tenyit amb hematoxilina/eosina abans de l'observació al microscopi òptic. L'anàlisi histopatològica no ha revelat lesions en cap òrgan atribuïbles a l'administració diària d'una dosi de 50 mg/kg d'àcid maslínic al llarg de 28 dies (Figura 4.7).

El parènquima hepàtic ha mostrat una arquitectura normal, amb els hepatòcits disposats adequadament al voltant de la vena central en els diferents lobels. En les seccions de ronyó s'han observat els glomèruls íntegres i els túbuls renals sense signes evidents de necrosi tubular. De manera similar, en els talls histològics de pulmó s'ha apreciat un epitel·li alveolar intacte constituint els sacs alveolars. El tractament amb àcid maslínic tampoc no ha modificat l'aparença dels túbuls seminífers dels testicles, amb les cèl·lules de suport o de Sertoli i les cèl·lules espermatogèniques, i ben delimitats per teixit intersticial. Així mateix, en la melsa dels ratolins d'ambdós grups experimentals s'han observat fol·licles limfoides i sinus normals, i en el cor s'ha apreciat una arquitectura inalterada del múscul cardíac, tant en l'endocardi com en el miocardi. A nivell del cervell, cap de les estructures examinades, entre les quals es troben l'escorça i el cerebel, no ha evidenciat efectes adversos derivats de l'exposició repetida a l'àcid maslínic.



**Figura 4.7.** Microfotografies de talls histològics dels principals òrgans tenyits amb hematoxilina/eosina i observats al microscopi òptic. Fetge (x20), ronyó (x40), pulmó (x40), testicle (x40), melsa (x10), cor (x20), escorça cerebral (x10) i cerebel (x10).

## 4.2. POSADA A PUNT I VALIDACIÓ DE LA TÈCNICA DE CROMATOGRÀFIA DE LÍQUIDS D'ALTA EFICÀCIA PER A LA DETERMINACIÓ DE L'ÀCID MASLÍNIC EN PLASMA

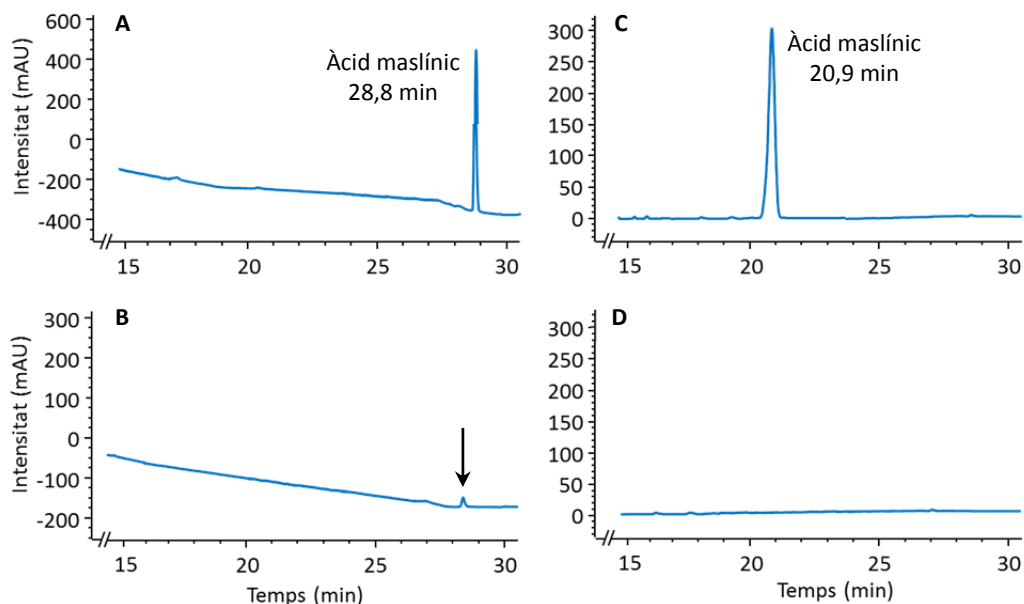
### 4.2.1. Optimització de les condicions cromatogràfiques

S'han emprat dos patrons d'àcid maslínic, un de concentració 250  $\mu\text{M}$  en metanol al 80% i l'altre de concentració 150  $\mu\text{M}$  en plasma. Les variables estudiades han estat les següents: la composició de la fase mòbil, així com també el gradient d'elució i el flux, la temperatura de la columna i la longitud d'ona de lectura del detector.

*Fase mòbil.* Donada la naturalesa hidrofòbica de l'àcid maslínic s'ha emprat una columna cromatogràfica de fase reversa C18 i una fase mòbil de polaritat moderada, constituïda per la combinació d'una fase aquosa o polar (fase A) i una fase orgànica o apolar (fase B). A més, per a l'anàlisi d'àcids per cromatografia de líquids d'alt eficàcia (HPLC) sovint s'acidifica la fase mòbil amb la finalitat de millorar la forma del pic cromatogràfic i el temps de retenció dels anàlits.

Pel que fa la fase aquosa, doncs, s'ha usat aigua ultrapura i s'ha estudiat l'efecte de l'acidificació sobre el temps de retenció i l'àrea del pic d'àcid maslínic. En primer lloc, s'ha provat d'afegir àcid fòrmic al 0,05%, al 0,1% i al 0,5%. Els pics del triterpè han aparegut ben definits a uns temps de retenció constants i amb àrees similars: amb àcid fòrmic al 0,05% el temps de retenció ha estat de 28,9 min i l'àrea de 5289,6 mAU·s; amb àcid fòrmic al 0,1% el temps de retenció pràcticament no s'ha modificat (28,8 min) i l'àrea ha incrementat fins a 5537,9 mAU·s; amb àcid fòrmic al 0,5% el temps de retenció ha tornat a ser de 28,8 min i l'àrea de 5389,1 mAU·s. Per tant, l'acidificació de la fase aquosa amb àcid fòrmic no ha resultat en canvis significatius en el temps de retenció de l'àcid maslínic ni en l'àrea del pic cromatogràfic. També s'ha provat d'acidificar la fase aquosa amb àcid acètic al 0,05%, a l'1,5% i al 3%. A les dues darreres condicions no s'ha observat cap pic en els cromatogrames corresponents, indicatius que el compost no ha eluït de la columna, però emprant àcid acètic al 0,05% el temps de retenció de l'àcid maslínic ha estat de 20,7 min i l'àrea del pic de 9387,7 mAU·s. Donat que aquests han estat els millors resultats, la fase aquosa ha quedat finalment constituïda per aigua amb àcid acètic al 0,05%.

Quant a la fase orgànica, inicialment s'ha provat metanol al 100% però s'ha vist que aquest dissolvent no permet eluir completament l'àcid maslínic de la columna (Figura 4.8).



**Figura 4.8.** (A) Cromatograma d'un patró d'àcid maslínic 250  $\mu$ M en metanol al 80% analitzat per HPLC usant com a fase orgànica metanol al 100%. (B) Cromatograma d'un control (aigua) analitzat immediatament després que el patró anterior; la fletxa assenya el pic corresponent a restes d'àcid maslínic que no han eluït completament de la columna. (C) Cromatograma d'un patró d'àcid maslínic 250  $\mu$ M en metanol al 80% analitzat per HPLC usant com a fase orgànica acetonitril al 100% i (D) un control analitzat just després.

Per això, s'ha canviat la fase apolar per acetonitril al 100%, que no només ha evitat el fenomen d'arrossegament (*carryover*) de l'anàlit d'una mostra a la següent, sinó que també presenta una menor absorptància en la regió de 200 – 210 nm.

*Tipus d'elució.* S'han provat dos tipus d'elució de la fase mòbil, isocràtica i en gradient. En les diferents proves d'elució isocràtica el pic d'àcid maslínic ha aparegut a uns temps de retenció d'entre 3 i 4 min, molt propers al front d'elució. Per això, aquest tipus d'elució ha estat descartat i s'ha centrat l'atenció en l'elució en gradient. S'han provat els gradients d'elució que es mostren a la Taula 4.3. El percentatge inicial de fase B es troba en tots els casos entre el 20 i el 40% i augmenta de manera progressiva, tot i que en diferent mesura segons el gradient, fins assolir el 100%. En aquest moment comença la fase de rentat, de 5 min de durada, per eluir tots els compostos retinguts en la columna. Seguidament, el percentatge de fase B davalla bruscament fins a les respectives condicions inicials, que es mantenen durant uns altres 5 min per reequilibrar la columna abans de la injecció de la següent mostra. Els temps de retenció de l'àcid maslínic en cadascun dels gradients han estat els següents: 20,9 min en el primer gradient; 20,7 min en el segon gradient; 33,0 min en el tercer gradient i 20,7 min en el quart gradient. En tots ells, l'àcid maslínic ha eluït quan el percentatge de fase B és d'aproximadament el 70%.

**Taula 4.3.** Gradients d'elució assajats en l'optimització de les condicions cromatogràfiques per a la determinació de l'àcid maslínic per HPLC. Es mostra el percentatge de fase orgànica (fase B); la proporció de aquosa (fase A) s'obté per diferència.

GRADIENT 1		GRADIENT 2		GRADIENT 3		GRADIENT 4	
Temps (min)	Fase B	Temps (min)	Fase B	Temps (min)	Fase B	Temps (min)	Fase B
0	30%	0	40%	0	20%	0	40%
5	50%	5	50%	2	20%	5	50%
10	60%	10	60%	7	30%	10	60%
15	70%	15	70%	10	30%	15	70%
20	70%	20	70%	14	40%	20	70%
25	100%	25	75%	18	50%	25	75%
30	100%	30	80%	22	60%	30	80%
		35	85%	27	70%	35	100%
		40	90%	30	70%	40	100%
		45	100%	35	75%		
		50	100%	40	80%		
				45	85%		
				47	90%		
				50	100%		
				55	100%		

Els criteris per a l'elecció del gradient d'elució han estat que el temps de retenció de l'àcid maslínic sigui adequat, és a dir, que no es trobi ni en el front d'elució ni en la fase de rentat, i que en aquest temps no s'observin pics d'altres components de la matriu (plasma), que podrien interferir en la quantificació de l'anàlit. També s'ha tingut en compte que la durada total del gradient sigui la menor possible. Per aquests motius, el darrer gradient és el que finalment s'ha escollit per a la determinació de l'àcid maslínic en plasma.

*Flux.* S'ha avaluat l'efecte del flux de la fase mòbil sobre el pic cromatogràfic d'àcid maslínic, considerant el temps de retenció i l'àrea. S'han comparat fluxos d'1 mL/min i d'1,5 mL/min i s'ha observat que en el primer l'elució de l'anàlit de la columna és més tardana (20,9 min respecte 17,2 min) però l'àrea del pic és 1,5 vegades superior (8499 mAU·s respecte 5665 mAU·s). Per això, el flux de la fase mòbil ha estat finalment d'1 mL/min.

*Temperatura de la columna.* La temperatura a la qual es manté la columna cromatogràfica també ha estat optimitzada, a fi de seleccionar aquella que proporciona el pic d'àcid maslínic de major intensitat. S'han provat temperatures de 25, 30 i 40°C i finalment s'ha escollit la de 40°C, ja que ha estat la que ha proporcionat les àrees més elevades.

*Longitud d'ona del detector.* La longitud d'ona de màxima absorbència de l'àcid maslínic en el detector de l'instrument d'HPLC depèn del solvent orgànic de la fase mòbil, de manera que emprant metanol aquesta longitud d'ona ha estat de 204 nm, mentre que amb acetonitril ha estat de 197 nm. Donat que en l'optimització de la fase mòbil l'acetonitril ha estat el solvent orgànic escollit, les longituds d'ona de lectura del detector que s'han assajat han estat de 195, 200, 205 i 210 nm. Aquesta variable afecta l'àrea del pic cromatogràfic, tal com es mostra en la Taula 4.4.

**Taula 4.4.** Efecte de la longitud d'ona del detector sobre l'àrea del pic d'àcid maslínic. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard; n = 6/longitud d'ona.

Longitud d'ona (nm)	Temps de retenció (min)	Àrea (mAU·s)
195	20,7 $\pm$ 0,1	8680 $\pm$ 5
200	20,7 $\pm$ 0,1	8518 $\pm$ 7
205	20,7 $\pm$ 0,1	7662 $\pm$ 22
210	20,7 $\pm$ 0,1	6003 $\pm$ 7

A les longituds d'ona inferiors (195 i 200 nm), les àrees del pic d'àcid maslínic només difereixen en un 2%, mentre que a 205 i 210 nm es produeix una reducció del 12% i del 31% en el valor de les àrees, respectivament. Tenint en compte que el límit inferior de la capacitat del detector és de 190 nm, la longitud d'ona escollida per realitzar les lectures ha estat de 200 nm.

#### 4.2.2. Validació de l'instrument

Un cop establertes les condicions cromatogràfiques per a la determinació d'àcid maslínic per HPLC, l'instrument s'ha validat seguint les directrius establertes en *The United States Pharmacopeia and The National Formulary* (2008). S'han emprat patrons d'àcid maslínic en



metanol al 80% a diferents concentracions. Els paràmetres avaluats han estat la precisió, la linealitat i la sensibilitat.

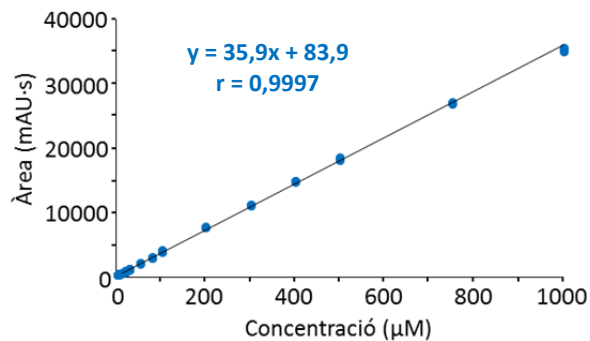
**Precisió.** La precisió intradia i interdia, calculades com a coeficient de variació, s'han avaluat a concentracions d'àcid maslínic d'1; 2,5; 5; 10; 15 i 25  $\mu\text{M}$  (Taula 4.5). En tots els casos la precisió ha estat inferior al 15%, indicatiu que el mètode és robust i reproduïble (Bansal i DeStefano, 2007).

**Linealitat.** La linealitat de l'instrument s'ha assajat a concentracions d'àcid maslínic des de 0,25 fins a 1000  $\mu\text{M}$ . Tal com s'observa en la Figura 4.9, l'instrument és lineal en tot el rang de concentracions, amb coeficients de regressió ( $r$ ) superiors a 0,99.

**Sensibilitat.** La sensibilitat de l'instrument s'ha establert mitjançant el límit de detecció (LOD) i el límit de quantificació (LOQ), els valors dels quals han estat de 58,9 nM i de 103 nM, respectivament.

**Taula 4.5.** Precisió de l'instrument d'HPLC per a la determinació de l'àcid maslínic;  $n = 4-18/\text{concentració}$ .

Àcid maslínic ( $\mu\text{M}$ )	Precisió (CV, %)	
	Intradia	Interdia
1	3,57	3,74
2,5	2,13	3,97
5	2,93	4,63
10	3,88	2,76
15	1,03	5,43
25	1,75	3,79



**Figura 4.9.** Linealitat de l'instrument d'HPLC per a la determinació de l'àcid maslínic. Es representen els valors individuals.

#### 4.2.3. Optimització del procés d'extracció de l'àcid maslínic del plasma

Per a l'extracció de l'àcid maslínic de plasma s'han provat mètodes en fase sòlida i mètodes d'extracció líquid-líquid. Les mostres de partida han estat constituïdes per 475  $\mu\text{L}$  de plasma blanc al qual s'han afegit 25  $\mu\text{L}$  d'una solució de treball d'àcid maslínic per assolir una concentració final del triterpè de 150  $\mu\text{M}$ . Els diferents mètodes s'han valorat considerant la recuperació de l'anàlit.

**Extracció en fase sòlida.** Per a l'extracció en fase sòlida s'ha provat inicialment el sistema Sep-Pak® Classic C18 (ref. 051910, Waters, Waters Cromatografia S.A., Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Espanya). El procediment ha consistit, en primer lloc, en activar el cartutx fent-hi passar 5 mL de metanol al 100% i 10 mL d'aigua. Seguidament s'ha carregat la mostra i s'hi ha fet passar aigua per eliminar les impureses hidròfiles, seguit de metanol per tal que elueixi l'àcid maslínic. Per últim, el dissolvent s'ha evaporat fins a un volum d'aproximadament 500  $\mu\text{L}$ , que

posteriorment s'ha mesurat amb pipeta automàtica. Aquest mètode ha proporcionat una recuperació de l'àcid maslínic inferior al 5%, fet pel qual ha estat descartat.

Els altres sistemes d'extracció en fase sòlida que s'han provat han estat els filtres Ultrafree-MC i Microcon YM-3. Els primers són unes unitats de filtració que contenen una membrana microporosa Durapore® de PVDF amb un diàmetre de porus de 0,22 µm (ref. UFC30GV25, Merck Millipore, Merck Chemicals and Life Science GesmbH, Madrid, Espanya). De manera similar, els filtres Microcon YM-3 contenen una membrana Ultracel® de cel·lulosa regenerada amb un límit de pes molecular nominal de 30 kDa (ref. 42403, Merck Millipore). En ambdós casos, la mostra es diposita a la part superior dels filtres i es força a passar mitjançant centrifugació, per a la qual s'han emprat condicions de 27000×g, 4°C i 30 min. La recuperació de l'àcid maslínic emprant aquests sistemes no ha superat el 15%: amb els filtres Ultrafree-MC la recuperació ha estat d'un  $13,5 \pm 1,5\%$ , mentre que amb els filtres Microcon YM-3 ha estat d'un  $1,30 \pm 0,21\%$ .

En resum, cap de les estratègies d'extracció en fase sòlida assajades ha proporcionat una recuperació adequada de l'àcid maslínic, per tant s'ha optat per optimitzar un procediment d'extracció líquid-líquid.

*Extracció líquid-líquid.* En primer lloc s'han provat diversos solvents orgànics. Les extraccions amb acetonitril i etanol han proporcionat recuperacions inferiors al 75%, mentre que amb metanol la recuperació ha estat d'un  $89,3 \pm 1,4\%$ . Tot i així, la millor capacitat d'extracció s'ha trobat emprant acetat d'etil, amb el qual no només la recuperació ha estat superior al 95% sinó que també s'han observat menys interferències de la matriu.

A fi de millorar la recuperació del mètode s'ha incrementat el nombre d'extraccions del plasma fins a tres i s'ha valorat el percentatge d'àcid maslínic recuperat en cadascuna. Com a resultat de la introducció d'aquesta millora la recuperació de l'àcid maslínic ha incrementat fins a un  $99,4 \pm 5,6\%$ . Si es consideren per separat les tres extraccions, la recuperació en la primera ha estat d'un  $95,1 \pm 6,2\%$ , en la segona d'un  $3,98 \pm 0,91\%$  i en la darrera d'un  $0,30 \pm 0,02\%$ , de manera que el conjunt de les dues primeres extraccions permet recuperar pràcticament tot l'àcid maslínic del plasma. Per aquest motiu, i valorant la durada del procediment, s'ha decidit fer dues extraccions consecutives del plasma.

#### **4.2.4. Validació del mètode analític**

El mètode d'HPLC desenvolupat per a la determinació de l'àcid maslínic en plasma s'ha validat d'acord amb les guies establertes en *The United States Pharmacopeia and The National Formulary* (2008). S'han emprat patrons de calibratge d'àcid maslínic en plasma i en metanol al 80% a diferents concentracions. Els paràmetres avaluats han estat la recuperació, la precisió, la linealitat, l'exactitud, la sensibilitat i la selectivitat.



*Recuperació.* La recuperació del mètode analític s'ha avaluat a concentracions d'àcid maslínic d'1; 2,5; 5; 10; 15 i 25  $\mu\text{M}$  i ha estat en tots els casos propera al 100% (Taula 4.5). La recuperació mitjana ha estat d'un  $98,8 \pm 0,74\%$ .

**Taula 4.6.** Recuperació, precisió i exactitud del mètode analític per a la determinació de l'àcid maslínic en plasma per HPLC. La recuperació s'expressa en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard; n = 5–8/concentració.

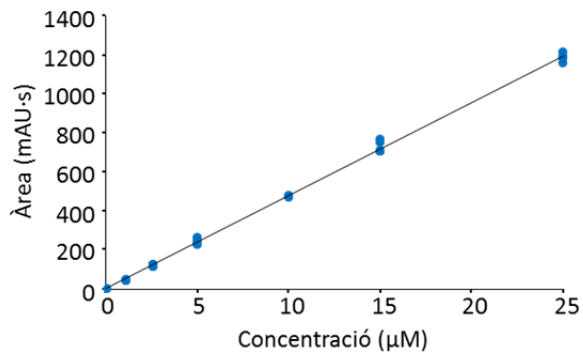
Àcid maslínic ( $\mu\text{M}$ )	Recuperació (%)	Precisió (CV, %)		Exactitud (%)
		Intradia	Interdia	
1	$99,7 \pm 4,0$	5,20	9,06	0,28
2,5	$99,4 \pm 1,4$	2,87	3,54	0,59
5	$98,1 \pm 1,7$	3,75	4,24	1,89
10	$99,4 \pm 0,5$	3,36	1,23	0,59
15	$99,0 \pm 1,6$	2,35	4,68	0,98
25	$97,4 \pm 1,5$	3,81	3,67	2,57

*Precisió i exactitud.* La precisió intradia i interdia, calculades com a coeficient de variació, i l'exactitud del mètode analític s'han avaluat a 6 concentracions d'àcid maslínic (Taula 4.6). Els valors d'ambdós paràmetres s'han trobat sempre per sota del 15%, indicatiu de la robustesa i la reproductibilitat del mètode (Bansal i DeStefano, 2007).

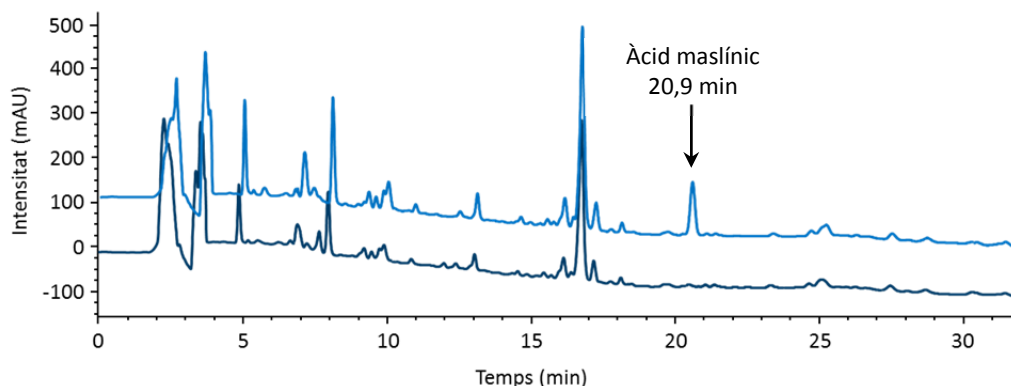
*Linealitat.* La linealitat del mètode analític s'ha avaluat en el rang de concentracions d'àcid maslínic de 0,5 a 25  $\mu\text{M}$ . S'ha observat que el mètode és lineal en tot el rang de concentracions (Figura 4.10), amb coeficients de regressió ( $r$ ) iguals o superiors a 0,99.

*Sensibilitat.* La sensibilitat del mètode per a la determinació de l'àcid maslínic en plasma s'ha establert per mitjà del LOD i el LOQ, que han estat de 0,02  $\mu\text{M}$  i de 0,32  $\mu\text{M}$ , respectivament.

*Selectivitat.* El mètode analític és selectiu per a l'àcid maslínic, ja que la superposició de cromatogrames de mostres de plasma blanc amb cromatogrames de mostres de la mateixa matriu a les quals s'ha afegit àcid maslínic ha posat de manifest que no hi ha cap pic al temps de retenció de l'anàlit (Figura 4.11).



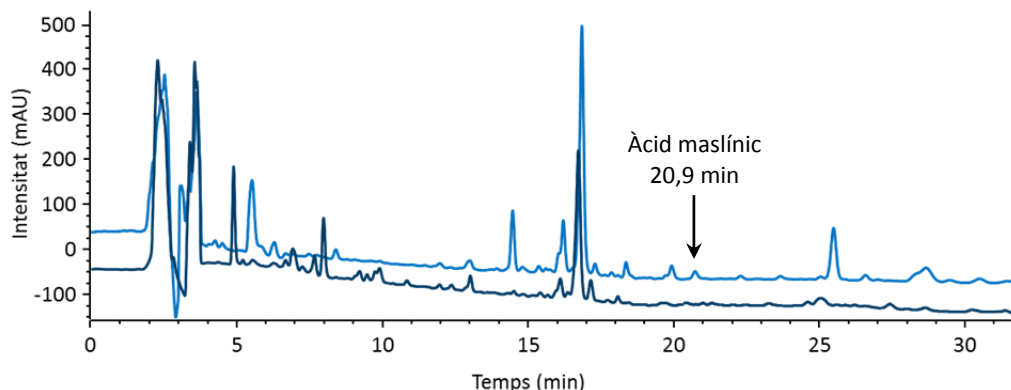
**Figura 4.10.** Linealitat del mètode analític per a la determinació de l'àcid maslínic en el plasma per HPLC. Es representen els valors individuals.



**Figura 4.11.** Cromatograma d'una mostra de plasma blanc (blau fosc) superposat amb el cromatograma d'una mostra de plasma blanc al qual s'ha afegit àcid maslínic a una concentració de 25 µM (blau clar).

#### 4.2.5. Determinació de l'àcid maslínic en el plasma després de la seva administració oral a rates

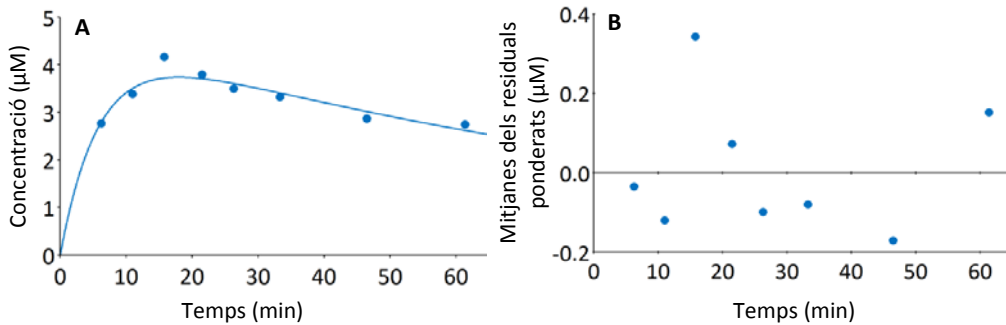
*Determinació de l'àcid maslínic en el plasma.* El mètode d'HPLC posat a punt i validat per a la determinació de l'àcid maslínic en plasma s'ha aplicat per a la quantificació del triterpè després de l'administració d'una dosi de 50 mg/kg per via oral a rates. S'han extret mostres de sang a diferents temps i el plasma s'ha sotmès a dues extraccions líquid-líquid seguit d'evaporació a sequedat i reconstitució en metanol al 75%. L'anàlisi de les mostres per HPLC ha proporcionat cromatogrames com el que es mostra en la Figura 4.12, corresponent a plasma obtingut 60 min després de l'administració del triterpè.



**Figura 4.12.** Cromatograma d'una mostra de plasma obtingut 60 min després de l'administració oral d'una dosi de 50 mg/kg d'àcid maslínic a rata.

*Anàlisi farmacocinètica.* Les concentracions plasmàtiques del triterpè s'han ajustat a un model farmacocinètic mitjançant el programa WinNonlin. S'han provat les aproximacions modelístiques d'un compartiment i de dos compartiments. Per a l'elecció del model que descriu millor la farmacocinètica de l'àcid maslínic s'han tingut en compte tres criteris: la distribució

dels residuals ponderats enfront la variable independent *temps*, la precisió amb la qual s'estimen els paràmetres i el valor d'AIC.



**Figura 4.13.** (A) Concentracions plasmàtiques mitjanes d'àcid maslínic després de l'administració oral d'una dosi de 50 mg/kg del triterpè a rata ( $n = 2-3$ /temps); la línia contínua correspon a la corba predita pel model matemàtic. (B) Distribució dels residuals ponderats enfront del temps.

El model monocompartimental ha estat el que millor ha ajustat les concentracions plasmàtiques d'àcid maslínic (Figura 4.13.A), ja que la distribució dels residuals ponderats no segueix cap tendència, sinó que és aleatòria al voltant del zero (Figura 4.13.B), els coeficients de variació dels paràmetres farmacocinètics estimats són inferiors al 25% (Taula 4.7) i el valor d'AIC (-6,61) ha estat inferior que el trobat en el model bicompartimental.

Entre els paràmetres farmacocinètics de l'àcid maslínic estimats destaquen la concentració màxima assolida en sang ( $C_{max}$ ), que ha estat de 3,74 µM, i el temps després de l'administració en el qual s'ha produït aquest pic ( $T_{max}$ ), que ha estat de 18 min (Taula 4.7). D'altra banda, el volum de distribució i l'aclariment, amb valors de 23,8 L/kg i 0,23 L/min/kg, respectivament, són paràmetres aparents, pel fet que no es disposa de dades procedents de l'administració intravenosa de l'àcid maslínic.

**Taula 4.7.** Paràmetres farmacocinètics de l'àcid maslínic estimats seguint una aproximació monocompartimental després de l'administració oral del triterpè (50 mg/kg) a rata, els seus valors i unitats i la precisió de l'estimació.

Paràmetre	Unitats	Valor estimat	CV (%)
V_F	L/kg	23,8	7,15
K01	1/min	0,17	17,3
K10	1/min	0,01	23,2
AUC	min·µmol/L	465	16,7
CL_F	L/min/kg	0,23	16,7
Tmax	min	18,0	8,17
Cmax	µmol/L	3,74	3,12
AIC		-6,61	

### 4.3. POSADA A PUNT I VALIDACIÓ DE LA TÈCNICA DE CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDS D'ALTA EFICÀCIA ACOBLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSES PER A LA DETERMINACIÓ DE L'ÀCID MASLÍNIC EN EL CONTINGUT INTESTINAL

#### 4.3.1. Optimització del mètode d'extracció

En l'optimització del procés d'extracció de l'àcid maslínic de contingut intestinal s'ha emprat una estratègia líquid-líquid per a la qual s'han assajat diversos solvents orgànics. Les mostres de partida han estat constituïdes per 1 g de contingut intestinal blanc al qual s'ha afegit àcid maslínic i patró intern (àcid betulínic), ambdós a una concentració final de 5 µM. Els diferents mètodes s'han valorat considerant la recuperació de l'anàlit.

Els solvents orgànics que s'han provat per a l'homogeneïtzació del contingut intestinal han estat acetat d'etil, metanol al 100%, metanol al 80% i metanol al 80% amb modificadors (NaOH al 0,1%, NaOH al 2,5%, HCl al 0,1% i HCl al 2,5%). L'ús d'acetat d'etil ha estat descartat perquè no s'ha aconseguit una homogeneïtzació adequada de les mostres; al mantenir-les en agitació magnètica intensa amb el solvent el contingut intestinal esdevenia una massa compacta enlloc d'una suspensió homogènia. Seguidament s'han provat la resta de solvents emprant l'homogeneïtzador Polytron. Abans, però, s'ha optimitzat el volum necessari per a la correcta homogeneïtzació de les mostres. S'ha establert que un volum de 4 mL és el mínim que permet obtenir una suspensió de consistència suficientment líquida de manera que la posterior agitació en el vòrtex sigui efectiva. Pel que fa la composició del solvent, la basificació del metanol al 80% amb NaOH al 0,1% ha proporcionat uns valors de recuperació erràtics, mentre que amb NaOH al 2,5% la recuperació ha estat inferior al 30%. D'altra banda, en acidificar amb HCl al 0,1% i amb HCl al 2,5% s'han obtingut recuperacions que no han superat el 80%. Els millors resultats s'han obtingut emprant metanol al 80% sense modificadors i metanol al 100%, per aquest motiu l'optimització del mètode s'ha centrat en aquests dos solvents, valorant-los en funció de la recuperació que proporcionen per a l'àcid maslínic i per al patró intern de manera individual. Així, emprant metanol al 80% s'ha obtingut unes recuperacions del  $95,1 \pm 4,1\%$  i del  $102,10 \pm 4,7\%$ , respectivament, mentre que amb metanol al 100% la recuperació ha estat del  $88,2 \pm 1,5\%$  i del  $88,8 \pm 1,1\%$  per a l'àcid maslínic i l'àcid betulínic, respectivament. En conseqüència, el solvent escollit per a l'extracció de l'àcid maslínic de contingut intestinal ha estat el metanol al 80%.

#### 4.3.2. Validació del mètode analític

El mètode d'HPLC-MS desenvolupat per a la determinació d'àcid maslínic en contingut intestinal s'ha validat d'acord amb les guies per a la validació de mètodes bioanalítics de la *Food and Drug Administration* (2001) i de la *European Medicines Agency* (2011), juntament amb les recomanacions detallades per Matuszewski *et al.* (2003). S'han emprat patrons de calibratge d'àcid maslínic en contingut intestinal i en metanol al 80% a diferents concentracions. Els

paràmetres avaluats han estat la recuperació, l'efecte matriu, l'eficiència del procés, la precisió i l'exactitud, la linealitat, la sensibilitat i la selectivitat.

*Recuperació, efecte matriu i eficiència del procés.* La recuperació del mètode d'extracció de l'àcid maslínic de contingut intestinal s'ha determinat de manera individual tant per a l'àcid maslínic com per al patró intern. A més, aquest paràmetre així com també l'efecte matriu i l'eficiència del procés s'han calculat per mitjà de les ràtios entre les àrees d'ambdós anàlits. Les concentracions d'àcid maslínic que s'han avaluat han estat de 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20 i 30  $\mu\text{M}$ , mentre que per al patró intern ha estat de 5  $\mu\text{M}$  (Taula 4.8).

**Taula 4.8.** Recuperació, efecte matriu i eficiència del procés per a la determinació de l'àcid maslínic en contingut intestinal per HPLC-MS. <sup>a</sup> Recuperació calculada individualment per a l'àcid maslínic; <sup>b</sup> paràmetres calculats a partir de les ràtios entre l'anàlit i el patró intern. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard; n = 3–12 /concentració.

Concentració ( $\mu\text{M}$ )	Recuperació <sup>a</sup> (%)	Recuperació <sup>b</sup> (%)	Efecte matriu <sup>b</sup> (%)	Eficiència del procés <sup>b</sup> (%)
0,1	97,2 $\pm$ 1,2	96,2 $\pm$ 1,2	102,7 $\pm$ 7,3	106,8 $\pm$ 7,1
0,5	96,8 $\pm$ 1,7	98,6 $\pm$ 1,2	105,0 $\pm$ 8,5	102,7 $\pm$ 3,2
1	97,8 $\pm$ 0,8	98,4 $\pm$ 2,1	107,6 $\pm$ 7,8	109,9 $\pm$ 3,9
5	97,4 $\pm$ 0,8	97,2 $\pm$ 1,0	91,8 $\pm$ 3,4	88,9 $\pm$ 2,4
10	96,4 $\pm$ 2,2	96,4 $\pm$ 0,9	96,2 $\pm$ 6,6	88,8 $\pm$ 3,7
20	91,2 $\pm$ 3,8	93,6 $\pm$ 0,7	126,2 $\pm$ 0,7	118,2 $\pm$ 0,9
30	100,0 $\pm$ 1,8	96,5 $\pm$ 0,9	129,6 $\pm$ 2,5	125,1 $\pm$ 1,2

La recuperació individual de l'àcid maslínic s'ha trobat entre el 91,2% i el 100,0%, mentre que la del patró intern ha estat d'un 94,9  $\pm$  1,0%. D'altra banda, la recuperació de l'àcid maslínic calculada per ràtios ha estat de mitjana d'un 97,6%.

L'efecte matriu, que reflecteix la interferència d'altres compostos presents en la mostra sobre la ionització dels anàlits, ha oscil·lat entre el 90% i el 110% a les concentracions més baixes d'àcid maslínic (0,1 – 10  $\mu\text{M}$ ), mentre que a 20 i 30  $\mu\text{M}$  ha estat lleugerament superior, al voltant del 128%.

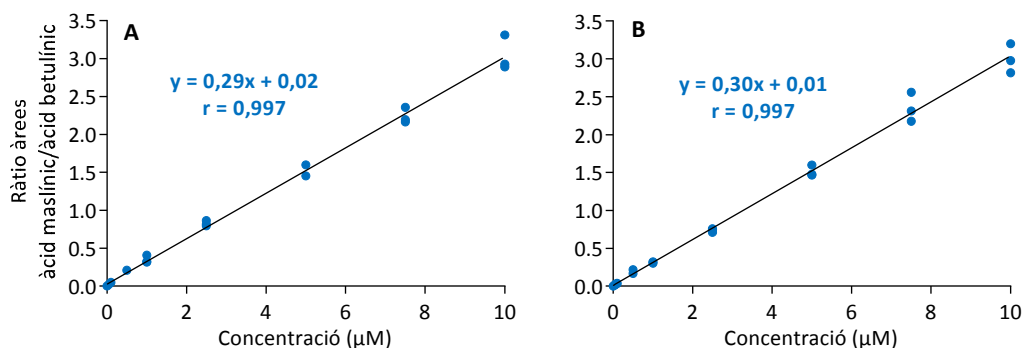
Per últim, l'eficiència del procés és un paràmetre que permet fer una valoració global del mètode analític, tenint en compte tant la recuperació com l'efecte matriu. En el present treball, l'eficiència del procés per a la determinació de l'àcid maslínic en contingut intestinal ha estat de mitjana d'un 105,3%.

*Precisió i exactitud.* Tant la precisió, intradia i interdia, com l'exactitud s'han avaluat a les concentracions d'àcid maslínic de 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20 i 30  $\mu\text{M}$  (patró intern a 5  $\mu\text{M}$ ) (Taula 4.9). Els valors obtinguts per a aquests paràmetres s'han trobat sempre per sota del 15%, fet que indica que el mètode és robust i reproduïble (Bansal i DeStefano, 2007).

**Linealitat.** Per valorar la linealitat del mètode analític cal preparar patrons de calibratge en un ampli rang de concentracions. En el present estudi es requereix 1 g de contingut intestinal blanc per obtenir un sol patró de calibratge, per tant la quantitat de matriu necessària per cobrir tot el ventall de concentracions seria notablement elevada. Per això, per a l'assaig de la linealitat s'ha procedit tal com s'indica a continuació. S'han preparat patrons de calibratge a concentracions de 0,1; 0,5; 1; 10; 20 i 30  $\mu\text{M}$ , emprats també per assajar els paràmetres de validació anteriors (recuperació, efecte matriu, eficiència del procés, precisió i exactitud). L'àrea del pic d'àcid maslínic i àcid betulínic en aquests patrons s'ha comparat amb l'àrea dels anàlits de patrons que s'han preparat afegint les concentracions corresponents a l'extracte metanòlic obtingut del processament d'una mostra de contingut intestinal blanc. S'ha observat que les diferències entre les àrees són d'aproximadament el 0,05% per a l'àcid maslínic i del 0,06% per a l'àcid betulínic, la qual cosa indica que els patrons preparats afegint els anàlits a l'extracte metanòlic són pràcticament equivalents als patrons de calibratge. A més, també s'ha comprovat que per preparar aquests nous patrons es pot emprar tant l'extracte metanòlic obtingut del processament del contingut intestinal (fracció sòlida) com l'extracte obtingut del processament del PBS (fracció líquida), ja que les rectes ajustades són pràcticament idèntiques (Figura 4.14.A i 4.14.B).

**Taula 4.9.** Precisió intradia i interdia i exactitud del mètode analític per a la determinació d'àcid maslínic en contingut intestinal per HPLC-MS. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard; precisió intradia:  $n = 3-11/$  concentració.

Concentració ( $\mu\text{M}$ )	Precisió (CV, %)		Exactitud (%)
	Intradia	Interdia	
0,1	8,90	10,1	2,65
0,5	4,45	4,80	0,85
1	3,10	4,25	0,83
5	4,00	5,28	6,42
10	1,87	6,66	1,39
20	2,51	4,32	2,61
30	2,45	3,18	6,44

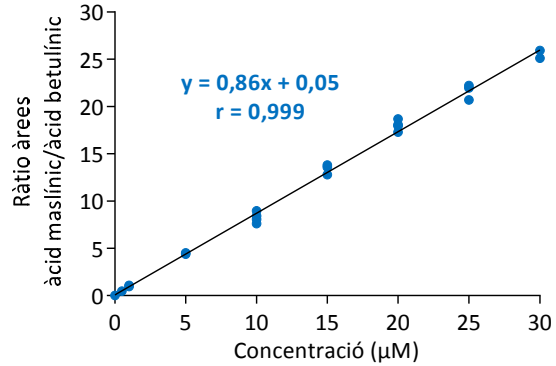


**Figura 4.14.** Comparació de les rectes patró preparades en extracte metanòlic del contingut intestinal (fracció sòlida) (A) i en extracte metanòlic del PBS (fracció líquida) (B). Es representen els valors individuals.

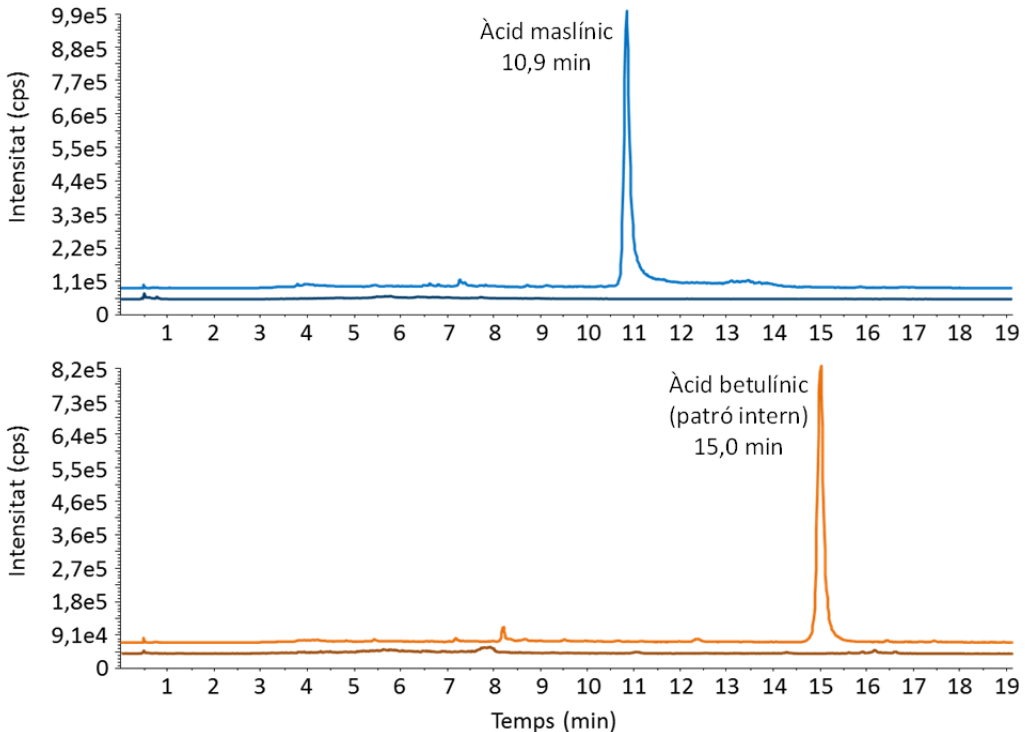
La linealitat del mètode analític, doncs, s'ha assajat mitjançant aquests nous patrons preparats per addició de concentracions conegudes d'àcid maslínic i patró intern a l'extracte metanòlic. S'ha vist que el mètode és lineal (Figura 4.15), amb coeficients de regressió ( $r$ ) iguals o superiors a 0,99.

**Sensibilitat.** La sensibilitat del mètode analític per a la determinació de l'àcid maslínic en contingut intestinal s'ha establert mitjançant el LOD i el LOQ, que han estat d'1,31 nM i de 4,37 nM, respectivament.

**Selectivitat.** Per avaluar la selectivitat del mètode analític s'han superposat cromatogrames de mostres de contingut intestinal blanc amb mostres de la mateixa matriu a les quals s'ha afegit àcid maslínic i patró intern (àcid betulínic) (Figura 4.16).



**Figura 4.15.** Linealitat del mètode analític per a la determinació de l'àcid maslínic en el contingut intestinal per HPLC-MS. Es representen els valors individuals.



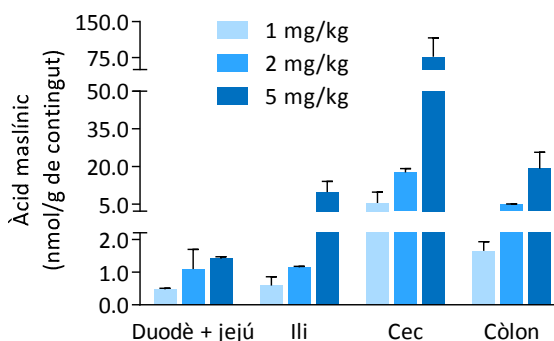
**Figura 4.16.** Selectivitat del mètode analític per a l'àcid maslínic (A) i per al patró intern (àcid betulínic) (B). Els cromatogrames de color fosc corresponen a una mostra de contingut intestinal blanc, mentre que els de color clar pertanyen a una mostra de la mateixa matriu a la qual s'ha afegit àcid maslínic i patró intern, ambdós a una concentració de 5 µM.

El temps de retenció dels anàlits ha estat de 10,9 min i 15,0 min, respectivament. L'anàlisi del contingut intestinal blanc ha evidenciat que ambdós compostos elueixen en una regió lliure d'interferències procedents de la matriu, és a dir, que no hi ha compostos endògens amb  $m/z$  idèntiques a les dels anàlits i que elueixin als mateixos temps de retenció. Per tant, el mètode analític desenvolupat és selectiu tant per a l'àcid maslínic com per a l'àcid betulínic.

#### 4.4. DETERMINACIÓ DE L'ÀCID MASLÍNIC I ELS SEUS METABÒLITS EN EL CONTINGUT INTESTINAL I EN EL PLASMA DESPRÉS DE L'ADMINISTRACIÓ ORAL DEL TRITERPÈ A RATES

##### 4.4.1. Quantificació de l'àcid maslínic en el contingut de duodè i jejú, ili, cec i còlon per HPLC-MS

Mitjançant el mètode analític desenvolupat l'àcid maslínic s'ha determinat en el contingut dels diferents segments intestinals (duodè i jejú, ili, cec i còlon) després de l'administració del triterpè per via oral a rates durant dos dies consecutius a dosis d'1, 2 o 5 mg/kg (Figura 4.17). En tots els segments la concentració d'àcid maslínic en el contingut ha incrementat d'acord amb la dosi administrada. Per altra banda, a totes les dosis s'ha observat la mateixa distribució del compost al llarg dels diferents segments intestinals, de manera que la major concentració d'àcid maslínic s'ha trobat en el contingut del cec, amb valors de  $5,5 \pm 4,3$  nmol/g,  $17,6 \pm 1,5$  nmol/g i  $76,7 \pm 39,4$  nmol/g a les respectives dosis, seguit del còlon, en el qual el triterpè s'ha trobat en un rang d'entre 1,5 i 20 nmol/g. Per altra banda, la concentració d'àcid maslínic en ambdós segments d'intestí prim (duodè i jejú, ili) ha estat d'aproximadament 0,5 nmol/g després de l'administració de la dosi menor (1 mg/kg) i al voltant d'1,1 nmol/g per a la dosi de 2 mg/kg. A la dosi més elevada (5 mg/kg), el triterpè s'ha trobat a una concentració d' $1,4 \pm 0,1$  nmol/g en el contingut del primer segment intestinal i de  $9,8 \pm 4,3$  nmol/g en el jejú.



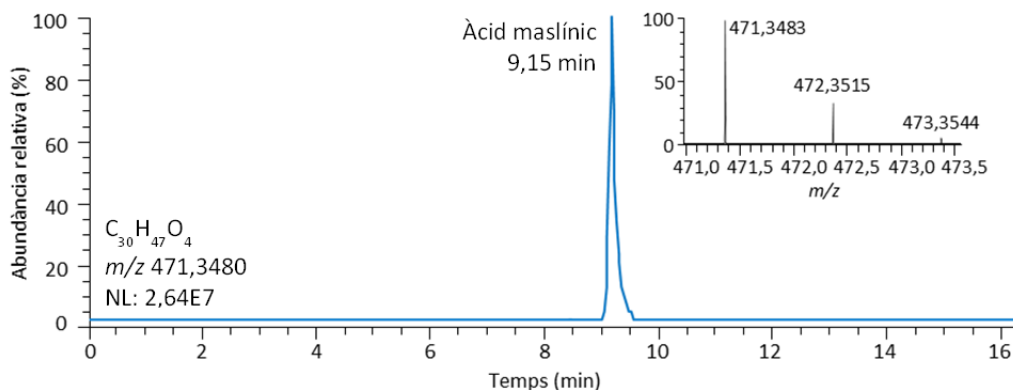
**Figura 4.17.** Concentració d'àcid maslínic en el contingut dels diferents segments intestinals després de l'administració oral a rates durant dos dies consecutius. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 2/\text{dosi}$ .

##### 4.4.2. Identificació dels metabòlits de l'àcid maslínic en el contingut dels diferents segments intestinals per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS

Per a la identificació dels metabòlits de l'àcid maslínic en el contingut dels diferents segments intestinals s'han emprat mostres obtingudes de les rates que han rebut àcid maslínic a la dosi



major (5 mg/kg), que han estat analitzades per HPLC-ACPI-LTQ-Orbitrap-MS. Abans, però, la injecció d'un patró ha permès establir el temps de retenció de l'anàlit (9,15 min) i determinar-ne la massa exacta ( $m/z$  de 471,3477, corresponent a la forma desprotonada) amb un error de 0,79 mDa. En l'espectre de masses del triterpè s'ha observat la molècula sense fragmentar (Figura 4.18). Per a cada metabòlit s'ha comprovat que en contingut blanc de tots els segments intestinals, procedent de rates que no han rebut àcid maslínic, no hi hagi pics als temps de retenció corresponents.



**Figura 4.18.** Cromatograma corresponent a l' $m/z$  de l'àcid maslínic (471,3) obtingut per HPLC-ACPI-LTQ-Orbitrap-MS representatiu del contingut de diferents segments intestinals de rates a les quals s'ha administrat el triterpè a una dosi de 5 mg/kg per via oral durant 2 dies consecutius. L'insert mostra la distribució isotòpica del compost.

La cerca de derivats de l'àcid maslínic s'ha fet en cromatogrames adquirits en mode *full scan* i considerant un ampli ventall de possibles biotransformacions, tant de fase I com de fase II. La presència de molècules amb masses similars no ha interferit en la identificació dels metabòlits, ja que l'elevada resolució de l'analitzador ha permès extreure cromatogrames individuals en un interval estret d' $m/z$  ( $\pm 5$  mDa) (Jirásko *et al.*, 2010).

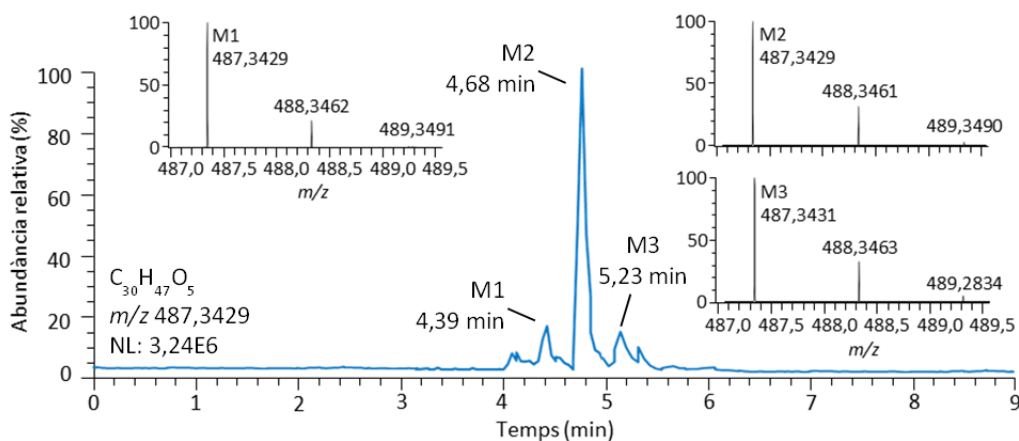
Els compostos que s'han identificat com a metabòlits de l'àcid maslínic han presentat uns canvis de massa de  $-2$ ,  $+14$ ,  $+16$ ,  $+30$  i  $+32$  Da, tots ells corresponents a derivats de fase I. Tot i que també s'ha tingut en compte la possible formació de derivats de fase II, no se n'han detectat. Les fórmules moleculars s'han obtingut per mitjà del programa Formula Predictor. Per a la correcta identificació dels metabòlits s'ha establert que la diferència entre la massa teòrica i la massa mesurada sigui inferior a 5 mDa i que en els corresponents espectres s'observi la distribució isotòpica esperada per a cada  $m/z$ .

La nomenclatura que identifica cadascun dels metabòlits s'ha establert en paral·lel amb la dels derivats trobats en contingut de còlon després de l'administració oral d'àcid maslínic (10 mg/kg) durant 49 dies (apartat 4.6.6.1). Així, en els resultats que es mostren a continuació s'observarà que en alguns casos els noms no són correlatius, donat que alguns dels metabòlits que s'exposaran posteriorment no s'han trobat en aquest estudi.

### a) M1 – M3 ( $m/z$ 487,3)

En els cromatogrames de mostres de contingut de còlon i ili corresponents a l' $m/z$  de 487,3 s'han identificat tres derivats amb uns temps de retenció de 4,39 min, 4,68 min i 5,23 min (Figura 4.19), tots ells anteriors al de l'àcid maslínic.

Els dos primers metabòlits s'han trobat també en el contingut del cec. La fórmula molecular predita per a aquests compostos,  $C_{30}H_{47}O_5$ , i l'increment de massa respecte la de l'àcid maslínic (15,9949 Da) suggereixen la incorporació d'un grup hidroxil. En els espectres de cada derivat la distribució isotòpica ha presentat un perfil similar a l'esperat. La diferència entre les masses observades i teòriques ha estat de 0,41 mDa, 0,16 mDa i 1,30 mDa per als derivats M1, M2 i M3, respectivament.

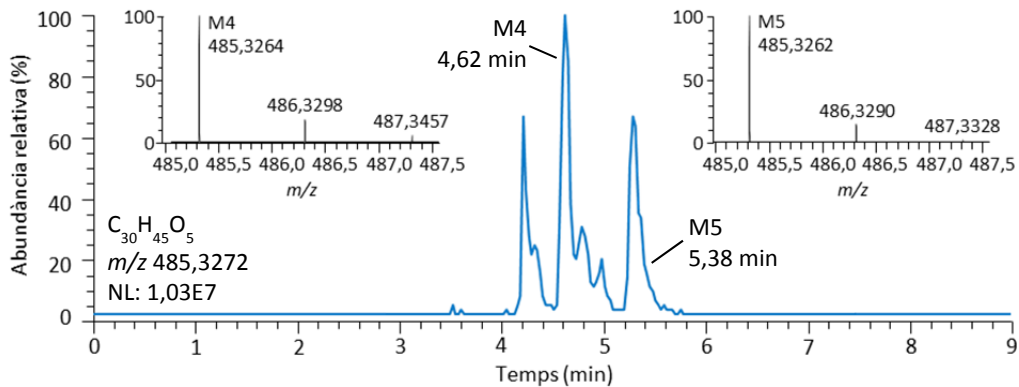


**Figura 4.19.** Cromatograma corresponent a l' $m/z$  de 487,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS representatiu del contingut de diferents segments intestinals de rates a les quals s'ha administrat el triterpè a una dosi de 5 mg/kg per via oral durant 2 dies consecutius. Els inserts mostren la distribució isotòpica de cada derivat.

### b) M4 – M5 ( $m/z$ 485,3)

En el contingut del cec i del còlon s'han identificat dos derivats amb una  $m/z$  de 485,3 i uns temps de retenció de 4,62 min i 5,38 min (Figura 4.20). El segon compost també s'ha trobat en el contingut de l'ili.

Donat l'increment de massa (13,9792 Da) i la fórmula molecular predita ( $C_{30}H_{45}O_5$ ), aquests metabòlits es poden atribuir a la incorporació d'un grup hidroxil i una deshidrogenació en la molècula de l'àcid maslínic. Els errors en la mesura de les masses han estat de 0,37 mDa i 0,58 mDa, respectivament, i els espectres corresponents han mostrat una distribució isotòpica correcta.

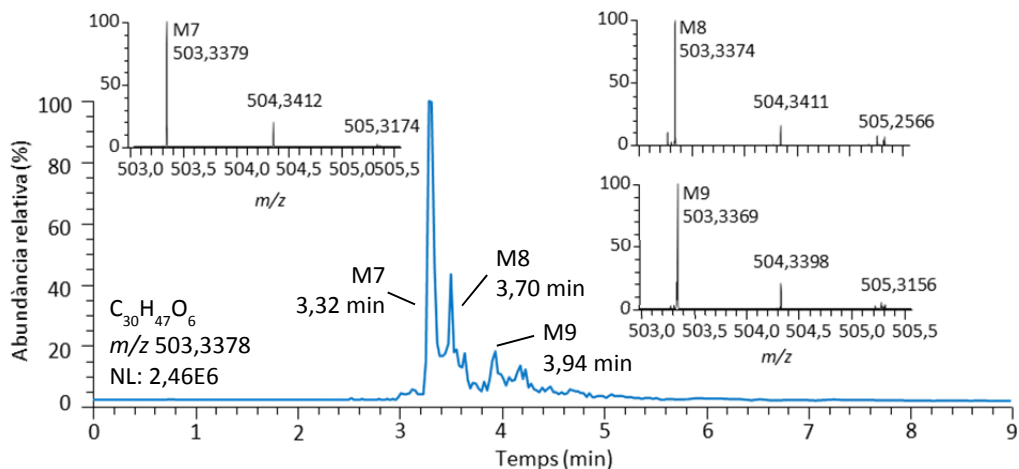


**Figura 4.20.** Cromatograma corresponent a l' $m/z$  de 485,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS representatiu del contingut de diferents segments intestinals de rates a les quals s'ha administrat el triterpè a una dosi de 5 mg/kg per via oral durant 2 dies consecutius. Els inserts mostren la distribució isotòpica de cada derivat.

### c) M7 – M9 ( $m/z$ 503,3)

En les mostres de cec i còlon també s'han identificat tres metabòlits de l'àcid maslínic amb una  $m/z$  de 503,3 i uns temps de retenció de 3,32 min, 3,70 min i 3,94 min (Figura 4.21). A més, el primer s'ha trobat també en el contingut de l'ili.

La fórmula molecular predita d'aquests compostos ( $C_{30}H_{47}O_6$ ) i l'increment de massa respecte la molècula original (31,9898 Da) indiquen que els derivats es poden haver format per la incorporació de dos grups hidroxil. Les diferències entre les masses mesurades i teòriques dels tres derivats s'han trobat entre  $-1,17$  mDa i  $0,15$  mDa. En l'espectre de cadascun d'ells s'ha observat una distribució isotòpica similar a l'esperada.

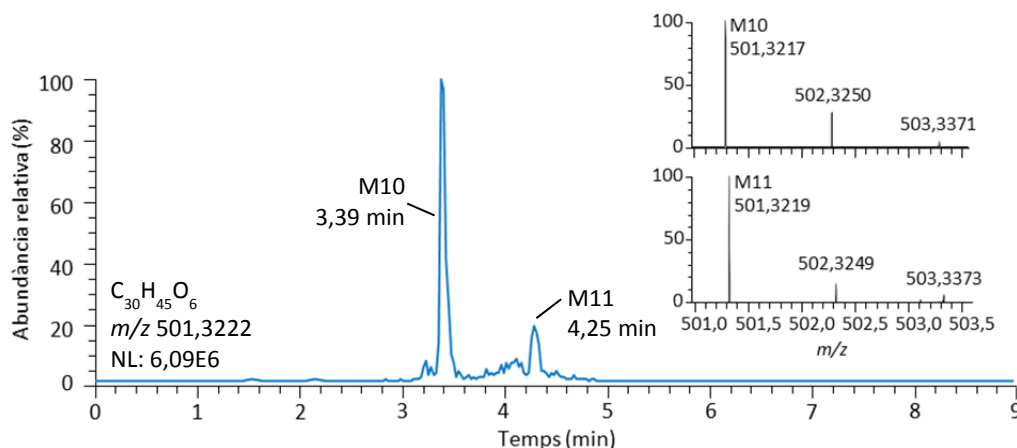


**Figura 4.21.** Cromatograma corresponent a l' $m/z$  de 503,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS representatiu del contingut de diferents segments intestinals de rates a les quals s'ha administrat el triterpè a una dosi de 5 mg/kg per via oral durant 2 dies consecutius. Els inserts mostren la distribució isotòpica de cada derivat.

#### d) M10 – M11 ( $m/z$ 501,3)

En els cromatogrames corresponents a l' $m/z$  de 501,3 de contingut de cec i de còlon s'han trobat dos derivats amb uns temps de retenció de 3,39 min i 4,25 min (Figura 4.22). El primer compost també s'ha trobat en el contingut de l'ili.

La fórmula molecular predita ha estat  $C_{30}H_{45}O_6$  i la massa ha incrementat en 29,9442 Da respecte la del compost original, per la qual cosa aquesta biotransformació es pot atribuir a dues hidroxilacions i una deshidrogenació de la molècula de l'àcid maslínic. L'error de les masses mesurades ha estat en tots els casos inferior a 0,5 mDa. Els espectres corresponents han mostrat distribucions isotòpiques pràcticament idèntiques a les esperades.

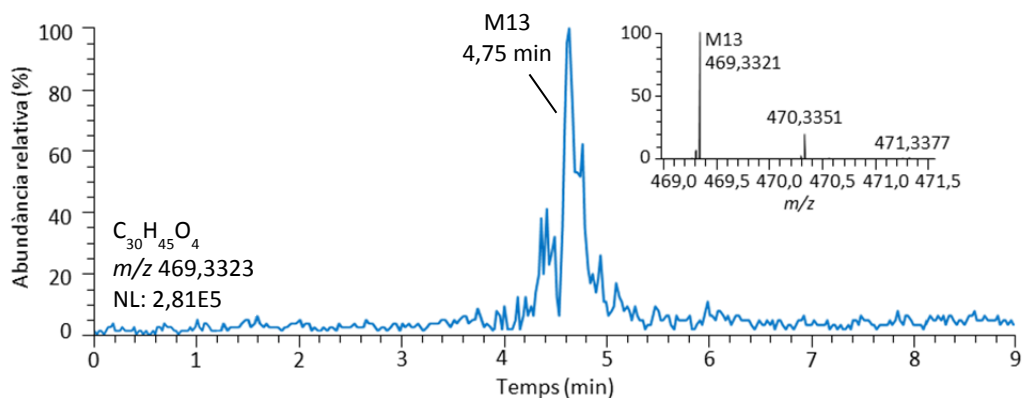


**Figura 4.22.** Cromatograma corresponent a l' $m/z$  de 501,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS representatiu del contingut de diferents segments intestinals de rates a les quals s'ha administrat el triterpè a una dosi de 5 mg/kg per via oral durant 2 dies consecutius. Els inserts mostren la distribució isotòpica de cada derivat.

#### e) M13 ( $m/z$ 501,3)

Finalment, i tan sols en el contingut del còlon, s'ha identificat un derivat de l'àcid maslínic amb una  $m/z$  de 469,3 i un temps de retenció de 4,75 min (Figura 4.23).

Aquest compost s'ha atribuït a una deshidrogenació de la molècula original, donada la seva fórmula molecular ( $C_{30}H_{45}O_4$ ) i el canvi de massa (-2,0157 Da). L'error en la identificació d'aquest metabòlit ha estat de -0,20 mDa i en el corresponent espectre s'ha observat la distribució isotòpica esperada.



**Figura 4.23.** Cromatograma corresponent a l' $m/z$  de 469,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS representatiu del contingut de diferents segments intestinals de rates a les quals s'ha administrat el triterpè a una dosi de 5 mg/kg per via oral durant 2 dies consecutius. Els inserts mostren la distribució isotòpica de cada derivat.

A la Taula 4.10 es resumeixen tots els metabòlits de l'àcid maslínic identificats en els diferents segments intestinals.

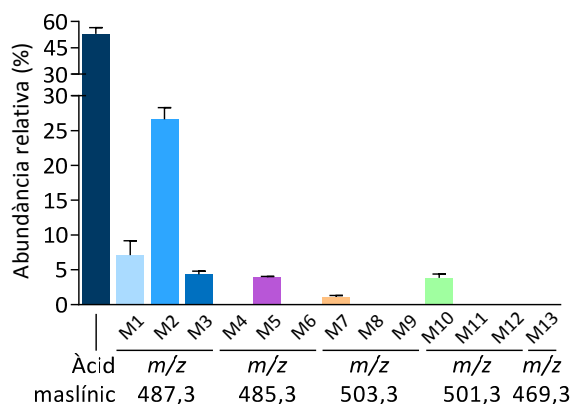
**Taula 4.10.** Metabòlits de l'àcid maslínic identificats mitjançant HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS en el contingut de diferents segments intestinals de rata després de l'administració oral del triterpè durant dos dies consecutius a una dosi de 5 mg/kg.

	Temps de retenció (min)	Massa mesurada ( $m/z$ )	Error		Duodè i jejú	Localització		
			mDa	ppm		Ili	Cec	Còlon
<b>Àcid maslínic (<math>C_{30}H_{48}O_4</math>, 487,3429)</b>								
Àcid maslínic	9,15	471,3477	0,79	-0,70	+	+	+	+
<b>Metabòlits monohidroxilats (<math>C_{30}H_{48}O_5</math>, 487,3429)</b>								
<b>M1</b>	4,39	487,3425	0,41	-1,03	-	+	+	+
<b>M2</b>	4,68	487,3423	0,16	-1,34	-	+	+	+
<b>M3</b>	5,23	487,3425	1,30	-0,63	-	+	-	+
<b>Metabòlits monohidroxilats i deshidrogenats (<math>C_{30}H_{46}O_5</math>, 485,3272)</b>								
<b>M4</b>	4,62	485,3269	0,37	-0,70	-	-	+	+
<b>M5</b>	5,38	485,3269	0,58	-0,65	-	+	+	+
<b>Metabòlits dihidroxilats (<math>C_{30}H_{48}O_6</math>, 503,3378)</b>								
<b>M7</b>	3,32	503,3375	0,15	-0,42	-	+	+	+
<b>M8</b>	3,70	503,3367	-0,38	-1,75	-	-	+	+
<b>M9</b>	3,94	503,3369	-1,17	-1,03	-	-	+	+
<b>Metabòlits dihidroxilats i deshidrogenats (<math>C_{30}H_{46}O_6</math>, 501,3222)</b>								
<b>M10</b>	3,39	501,3216	0,32	-1,12	-	+	+	+
<b>M11</b>	4,25	501,3215	-0,33	-1,30	-	-	+	+
<b>Metabòlit deshidrogenat (<math>C_{30}H_{46}O_4</math>, 469,3323)</b>								
<b>M13</b>	4,75	469,3316	-0,20	-1,50	-	-	-	+

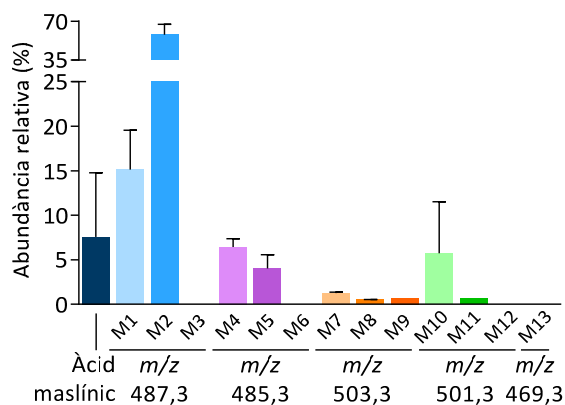
L'abundància relativa dels metabòlits identificats s'ha determinat en cadascun dels segments intestinals, a fi d'observar si hi ha un predomini de l'àcid maslínic intacte o, al contrari, preval l'aparició d'un o diversos derivats. En el primer segment, que comprèn el duodè i el jejú, només s'ha trobat àcid maslínic. En el contingut de l'ili el triterpè ha representat al voltant d'un 50% del total de compostos i el metabòlit majoritari ha estat l'M2 (26,6  $\pm$  1,7%) (Figura 4.24). Els altres derivats monohidroxilats (M1 i M3) han representat aproximadament un 7% i un 4%, respectivament, seguits de l'M5 (4%) i de l'M10 (4%).

En el contingut del cec, en canvi, l'àcid maslínic tan sols ha representat un 7,6  $\pm$  5,1%, mentre que el metabòlit monohidroxilat M2 ha estat el majoritari (57,8  $\pm$  6,5%), seguit de l'M1 (15%) (Figura 4.25). Els derivats monohidroxilats i deshidrogenats M4 i M5 han representat en conjunt un 10%, aproximadament, i el derivat dihidroxilat i deshidrogenat M10 s'ha trobat en un 5,7  $\pm$  4,1%. L'abundància relativa de la resta de metabòlits presents en el contingut del cec (M7, M8, M9 i M11) ha estat inferior a l'1,5% en tots els casos.

Finalment, en el contingut del còlon el derivat M2 ha estat de nou el que s'ha trobat en la major proporció (41,6  $\pm$  6,6%) i la de l'M1 tampoc no s'ha modificat pràcticament (12%) respecte la trobada en el contingut del cec. Pel que fa l'àcid maslínic, en aquest segment ha representat gairebé un 15% (Figura 4.26). L'abundància relativa de la resta de metabòlits s'ha trobat per sota del 7,5%, entre els quals destaquen els monohidroxilats i deshidrogenats (M3, M4 i M5, amb abundàncies relatives del 2%, el 5% i el 4%, respectivament) i l'M10, amb una proporció

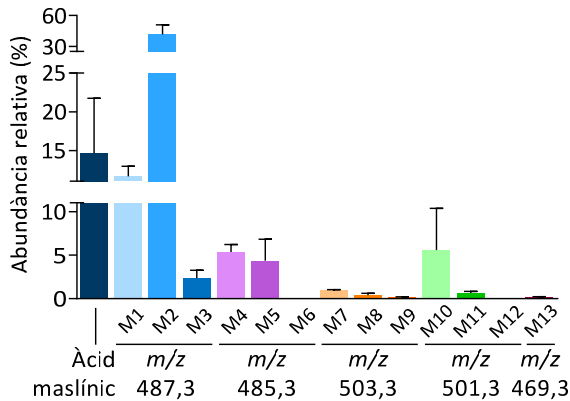


**Figura 4.24.** Abundància relativa de l'àcid maslínic i els diferents metabòlits identificats en el contingut de l'ili de rates que han rebut àcid maslínic a una dosi de 5 mg/kg durant 2 dies consecutius. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard; n = 2/metabòlit.



**Figura 4.25.** Abundància relativa de l'àcid maslínic i els metabòlits identificats en el contingut del cec de rates que han rebut àcid maslínic (5 mg/kg) durant 2 dies consecutius. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard; n = 2/metabòlit.

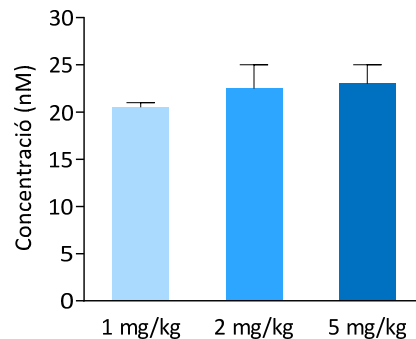
d'aproximadament el 5%. El percentatge de la resta de metabòlits (M7, M8, M9, M11 i M13) ha estat inferior a l'1% per a cadascun d'ells.



**Figura 4.26.** Abundància relativa de l'àcid maslínic i els metabòlits identificats en el contingut del còlon de rates que han rebut àcid maslínic (5 mg/kg) durant 2 dies consecutius. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard; n = 2/metabòlit.

#### 4.4.3. Determinació de l'àcid maslínic en el plasma

El plasma obtingut de les rates que han rebut àcid maslínic durant dos dies consecutius s'ha analitzat per HPLC-MS a fi de determinar-hi la concentració del triterpè (Figura 4.27). Per a les dosis d'1, 2 i 5 mg/kg la concentració d'àcid maslínic ha estat de  $20,5 \pm 0,5$  nM,  $22,5 \pm 2,5$  nM i  $23,0 \pm 2,0$  nM, respectivament. La manca de correlació entre les dosis administrades i les concentracions plasmàtiques es deu al fet que es tracta de valors molt baixos, que reflecteixen el romanent d'àcid maslínic en aquesta matriu al cap de 24 h de la darrera administració.



**Figura 4.27.** Concentracions d'àcid maslínic en plasma després de l'administració del triterpè per via oral a rates durant dos dies consecutius. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard; n = 2/grup.

## 4.5. ESTUDI DE L'ABSORCIÓ INTESTINAL DE L'ÀCID MASLÍNIC

### 4.5.1. Tècnica *ex vivo* dels sacs evertits

#### 4.5.1.1. Optimització de la solubilització de l'àcid maslínic en el medi d'incubació

La incorporació de l'àcid maslínic al medi d'incubació s'ha fet inicialment a partir d'una solució estoc del triterpè de concentració 10 mM en DMSO, dissolvent en el qual se solubilitza fàcilment. Tenint en compte que la concentració de l'àcid maslínic en el medi d'incubació ha de ser de 100  $\mu$ M, el percentatge de DMSO en aquest medi seria de l'1%. Però immediatament després de l'addició d'una alíquota de la solució estoc el medi ha esdevingut tèrbol, indicatiu de la insolubilització d'algun dels seus components. La quantificació de l'àcid maslínic per HPLC-MS

ha resultat en una concentració d'aproximadament 11  $\mu\text{M}$ , indicatiu que s'han produït pèrdues del triterpè al voltant d'un 90%.

Per aquest motiu, la solució estoc del triterpè s'ha preparat a la mateixa concentració (10 mM) però emprant com a solvent (2-hidroxipropil)- $\beta$ -ciclodextrina (HPBCD) al 40% i carboximetilcel·lulosa sòdica (CMC) al 0,5%. Així, el percentatge d'aquests excipients en els medis d'incubació ha estat del 0,38% per a la HPBCD i del 0,005% per la CMC.

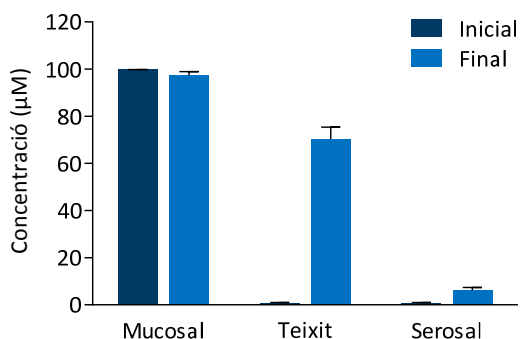
#### 4.5.1.2. Estudi de l'estabilitat de l'àcid maslínic en el medi d'incubació

L'estabilitat de l'àcid maslínic en el medi d'incubació s'ha avaluat mantenint aquest medi a 37°C durant 35 min, que és la durada del període d'incubació. La posterior anàlisi per HPLC-MS ha proporcionat una concentració del triterpè de  $100,1 \pm 7,5 \mu\text{M}$ , fet que evidencia que la temperatura i l'oxigenació, així com també la presència de les sals que componen el medi, no afecten negativament l'àcid maslínic en solució.

#### 4.5.1.3. Pas de l'àcid maslínic a través de la paret intestinal

##### a) Medi mucosal amb àcid maslínic (100 $\mu\text{M}$ ) i medi serosal sense àcid maslínic

En primer lloc s'ha estudiat el pas de l'àcid maslínic a través de la paret intestinal en presència d'un gradient de concentració (Figura 4.28). Els sacs evertits s'han incubat en un medi mucosal que conté el triterpè a una concentració de 100  $\mu\text{M}$  i un medi serosal sense el compost. Al final dels 35 min d'incubació la concentració mitjana que s'ha assolit en el medi serosal ha estat de  $6,15 \pm 1,18 \mu\text{M}$ , mentre que en el medi mucosal pràcticament no s'ha modificat ( $97,4 \pm 1,5 \mu\text{M}$ ). La concentració final del triterpè en el teixit ha estat de  $70,4 \pm 5,0 \mu\text{M}$ .



**Figura 4.28.** Concentracions inicial i final d'àcid maslínic en els medis mucosal i serosal i en el teixit de sacs evertits incubats en medi mucosal amb àcid maslínic a 100  $\mu\text{M}$  i medi serosal a 0  $\mu\text{M}$ . Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard; n = 10.

*Transport net de l'àcid maslínic.* El transport net és indicatiu de la quantitat d'àcid maslínic que travessa la paret intestinal des del costat mucosal al serosal. En aquesta condició experimental ha tingut un valor de  $1,9 \pm 0,6 \text{ nmols}/100 \text{ mg pes humit}$ , fet que corrobora que existeix un pas d'àcid maslínic a través del teixit però que té lloc de forma molt lenta.

*Recuperació de l'àcid maslínic.* Per altra banda, considerant els volums inicial i final dels medis mucosal i serosal, així com també del volum d'aigua contingut en el teixit, s'ha calculat la quantitat d'àcid maslínic en aquestes matrius abans i després de la incubació (Taula 4.11).



Aquests resultats reflecteixen els anteriors de concentració, en tant que la quantitat de triterpè en el medi mucosal es manté pràcticament constant entre l'inici i el final del període d'incubació, mentre que apareix al cap dels 35 min tant en el medi serosal ( $4,65 \pm 1,18$  nmol) com en el teixit ( $17,8 \pm 1,6$  nmol).

**Taula 4.11.** Quantitats inicial i final d'àcid maslínic en el medi mucosal i serosal i en el teixit de sacs evertits incubats en un medi mucosal amb àcid maslínic a  $100 \mu\text{M}$  i un medi serosal sense àcid maslínic. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 8$ .

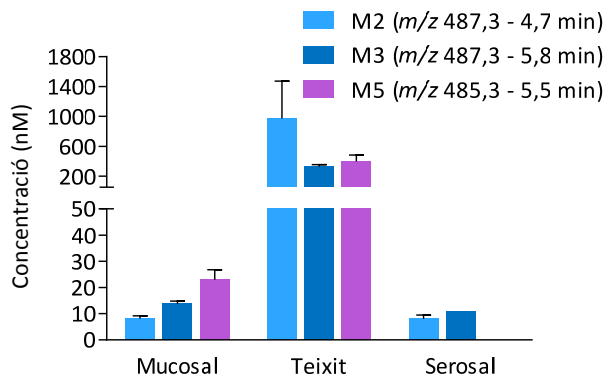
	Quantitat inicial (nmol)	Quantitat final (nmol)	Recuperació (%)
Mucosal	$2005,4 \pm 11,7$	$1951,0 \pm 34,7$	
Serosal	$0,0 \pm 0,0$	$4,65 \pm 1,18$	
Teixit	$0,0 \pm 0,0$	$17,8 \pm 1,6$	
<b>Total</b>	<b><math>2005,4 \pm 11,7</math></b>	<b><math>1973,2 \pm 34,0</math></b>	<b><math>98,4 \pm 1,3\%</math></b>

A partir d'aquestes dades es pot calcular la recuperació del compost, tot comparant la quantitat total d'àcid maslínic present abans i després de la incubació. En aquestes condicions experimentals la recuperació de l'àcid maslínic ha estat d'un 98,4%.

*Determinació dels metabòlits de l'àcid maslínic.* En les mostres dels medis mucosal i serosal, així com també en els teixits, s'han detectat i quantificat tres metabòlits de l'àcid maslínic (Figura 4.29), que coincideixen amb els prèviament identificats en mostres de contingut intestinal de rates que havien rebut el triterpè per via oral (Taula 4.10).

La major concentració d'aquests metabòlits s'ha trobat en el teixit, on ha estat d'entre 300 i 400 nM per als derivats M3 i M5 i d'aproximadament 970 nM per a

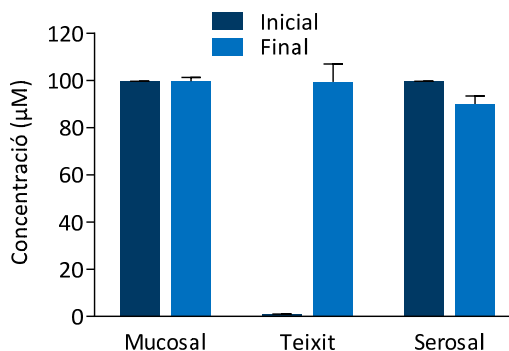
l'M2. En les solucions d'incubació, en canvi, les concentracions han estat inferiors als 50 nM per a tots els compostos. Aquestes observacions indiquen que els derivats es formen a nivell de la paret intestinal, on majoritàriament queden acumulats, enfront de l'escassa excreció ja sigui de retorn cap al costat mucosal o bé cap al costat serosal.



**Figura 4.29.** Concentracions dels metabòlits que han aparegut en els medis mucosal i serosal, així com també en el teixit, després de la incubació dels sacs en medi mucosal amb àcid maslínic a  $100 \mu\text{M}$  i medi serosal a  $0 \mu\text{M}$ . Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 2-4$ .

### b) Medi mucosal i medi serosal amb àcid maslínic (100 $\mu\text{M}$ )

En segon lloc, a fi d'estudiar si hi ha algun mecanisme de transport actiu implicat en el pas del triterpè a través de la paret intestinal, s'han incubat sacs evertits en medis mucosal i serosal que contenen, ambdós, àcid maslínic a la mateixa concentració (100  $\mu\text{M}$ ). A l'acabar el període d'incubació la concentració no ha incrementat en el medi serosal (90,1  $\pm$  3,4  $\mu\text{M}$ ) i en el medi mucosal s'ha mantingut pràcticament invariable, amb un valor de 99,7  $\pm$  1,6  $\mu\text{M}$  (Figura 4.30). El fet que no s'observi una major concentració de l'àcid maslínic en el costat serosal és indicativa que no hi ha mecanismes de transport actiu implicats en el seu pas a través de la paret intestinal.



**Figura 4.30.** Concentracions inicial i final d'àcid maslínic en el medi mucosal i serosal, així com també en el teixit, de sacs evertits incubats en medis mucosal i serosal que contenen, ambdós, àcid maslínic a 100  $\mu\text{M}$ . Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard; n = 10.

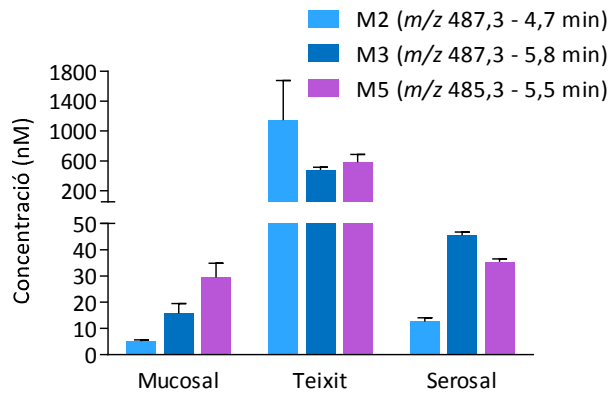
*Transport net de l'àcid maslínic.* El transport net és indicatiu de la quantitat d'àcid maslínic que travessa la paret intestinal des del costat mucosal al serosal. En aquesta condició experimental ha tingut un valor de 1,9  $\pm$  0,6 nmols/100 mg pes humit, fet que corrobora que existeix un pas d'àcid maslínic a través del teixit però que té lloc de forma molt lenta.

*Recuperació de l'àcid maslínic.* De nou, s'ha calculat la quantitat d'àcid maslínic en ambdós medis, mucosal i serosal, així com també en el teixit, abans i després del període d'incubació. Si bé la quantitat de triterpè gairebé no ha canviat en el medi mucosal, a l'interior del sac ha disminuït en aproximadament 50 nmol alhora que han aparegut 70,9  $\pm$  7,7 nmol en el teixit (Taula 4.12).

**Taula 4.12.** Quantitats inicial i final d'àcid maslínic en el medi mucosal i serosal, així com també en el teixit, de sacs evertits incubats en medis mucosal i serosal que contenen, ambdós, àcid maslínic a 100  $\mu\text{M}$ . Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard; n = 8.

	Quantitat inicial (nmol)	Quantitat final (nmol)	Recuperació (%)
Mucosal	2034,3 $\pm$ 11,4	2000,7 $\pm$ 37,8	
Serosal	83,9 $\pm$ 4,8	29,3 $\pm$ 2,9	
Teixit	0,0 $\pm$ 0,0	70,9 $\pm$ 7,7	
<b>Total</b>	<b>2118,2 <math>\pm</math> 14,4</b>	<b>2100,8 <math>\pm</math> 35,0</b>	<b>99,2 <math>\pm</math> 1,8%</b>

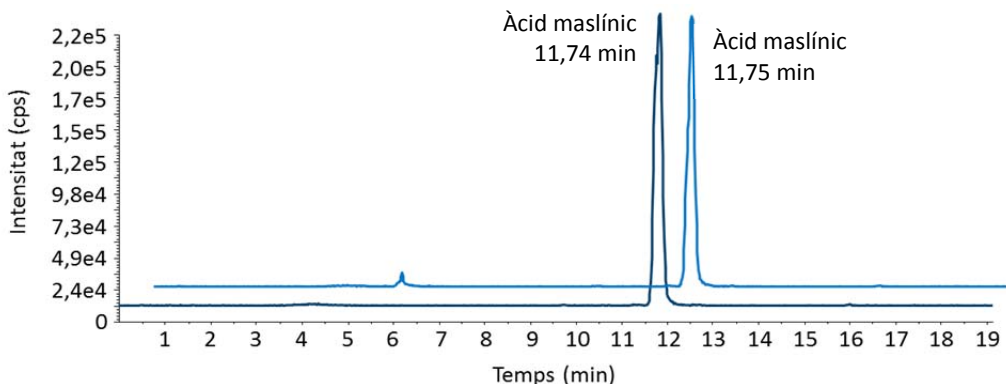
*Determinació dels metabòlits de l'àcid maslínic.* Pel que fa als metabòlits de l'àcid maslínic, s'han trobat els mateixos que en la condició anterior i amb un perfil de concentracions semblant en el medi mucosal i en el teixit (Figura 4.31). En el medi serosal la presència de l'àcid maslínic des de l'inici de la incubació (100  $\mu\text{M}$ ) ha resultat en una major concentració dels derivats M2 i M3, si bé en ambdós ha estat inferior a 50 nM, així com també en l'aparició del derivat M5, absent a la condició anterior, a una concentració d'aproximadament 35 nM.



**Figura 4.31.** Concentracions dels metabòlits que han aparegut en els medis mucosal i serosal, així com també en el teixit, després de la incubació dels sacs en medis mucosal i serosal que contenen, ambdós, àcid maslínic a 100  $\mu\text{M}$ . Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 2-4$ .

#### 4.5.2. Tècnica *in situ* de la perfusió intestinal

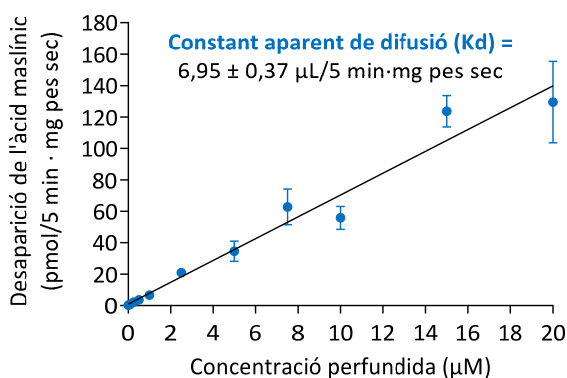
L'absorció intestinal de l'àcid maslínic també s'ha abordat mitjançant la perfusió intestinal en rata. Mentre que amb la tècnica dels sacs evertits s'han determinat els canvis de concentració de l'àcid maslínic en els medis d'incubació que es troben en ambdós costats de la paret intestinal, mucosal i serosal, en la perfusió s'ha mesurat la desaparició del compost de les solucions que s'han perfundit a través d'un segment de jejú. Aquesta desaparició s'atribueix a la quantitat d'àcid maslínic que ha entrat als enteròcits i és, per tant, representativa de la seva absorció. En la Figura 4.32 es mostren cromatogrames representatius d'una solució amb àcid maslínic a una concentració de 5  $\mu\text{M}$  abans i després de la perfusió d'un segment de jejú de rata durant 5 min a un flux de 3,6 mL/min i amb recirculació.



**Figura 4.32.** Cromatogrames representatius de medi de perfusió amb àcid maslínic 5  $\mu\text{M}$  abans (blau fosc) i després (blau clar) de la perfusió d'un segment de jejú de rata.

#### 4.5.2.1. Cinètica d'absorció intestinal de l'àcid maslínic

La perfusió de solucions amb àcid maslínic a diferents concentracions, en el rang de 0,01 a 20  $\mu\text{M}$ , ha permès obtenir una aproximació a la cinètica d'absorció intestinal del triterpè (Figura 4.33). En primer lloc, a partir de la concentració ( $\mu\text{M}$ ) d'àcid maslínic determinada en les solucions perfundides, i tenint en compte els volums de les solucions abans i després de la perfusió, s'ha calculat la quantitat de triterpè ( $\text{pmol}/5 \text{ min}$ ) que ha desaparegut durant el temps que dura

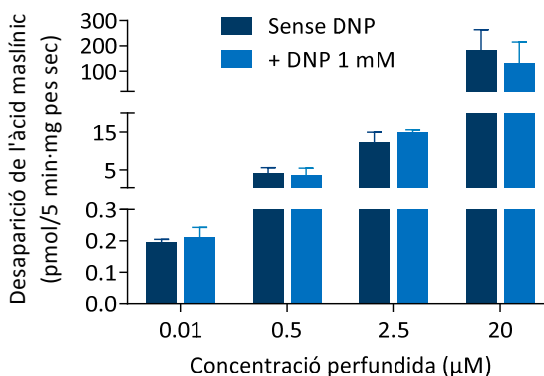


**Figura 4.33.** Cinètica de desaparició de l'àcid maslínic del medi de perfusió. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 3-6$ .

la perfusió. A fi de poder comparar els resultats obtinguts en diferents experiments tots els valors s'han normalitzat pel pes sec del segment intestinal. El millor ajust de les dades s'ha obtingut per regressió lineal, indicatiu que l'àcid maslínic entra als enteròcits per mitjà de difusió simple (Figura 4.33). El pendent de la recta es correspon amb la constant aparent de difusió ( $K_d$ ) i ha estat de  $6,95 \pm 0,37 \mu\text{L}/5 \text{ min} \cdot \text{mg pes sec}$ .

#### 4.5.2.2. Estudi del mecanisme d'absorció de l'àcid maslínic

La implicació de mecanismes de transport actiu en l'entrada de l'àcid maslínic als enteròcits s'ha estudiat emprant 2,4-dinitrofenol (DNP), un agent desacoblant de la fosforilació oxidativa. S'ha observat que la desaparició del triterpè del medi de perfusió no resulta afectada per la presència d'aquest inhibidor en el medi de perfusió (Figura 4.34), indicatiu de l'absència de transportadors dependents d'ATP que participin en l'entrada de l'àcid maslínic als



**Figura 4.34.** Desaparició de l'àcid maslínic del medi de perfusió, amb i sense DNP (1 mM). Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 3-6$ .

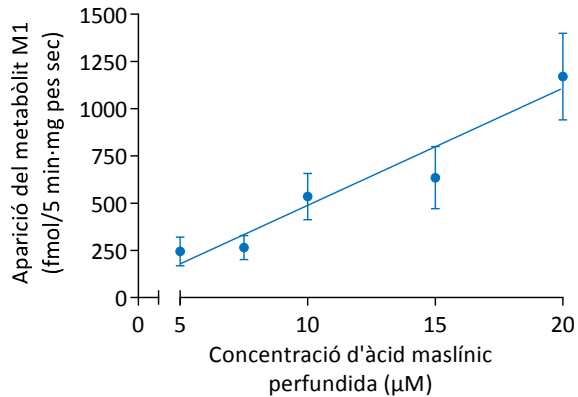
enteròcits. Aquests resultats corroboren els obtinguts anteriorment mitjançant els sacs evertits, en els quals no s'ha observat l'acumulació del triterpè en el costat serosal després de la incubació amb àcid maslínic 100  $\mu\text{M}$  en ambdós costats de la paret intestinal (mucosal i serosal).

#### 4.5.2.3. Determinació dels metabòlits de l'àcid maslínic

A més, en les solucions perfundides s'han trobat alguns dels metabòlits de l'àcid maslínic prèviament identificats en el contingut intestinal. Aquests derivats s'han quantificat en paral·lel amb l'àcid maslínic.

##### a) M5 (*m/z* 485,3)

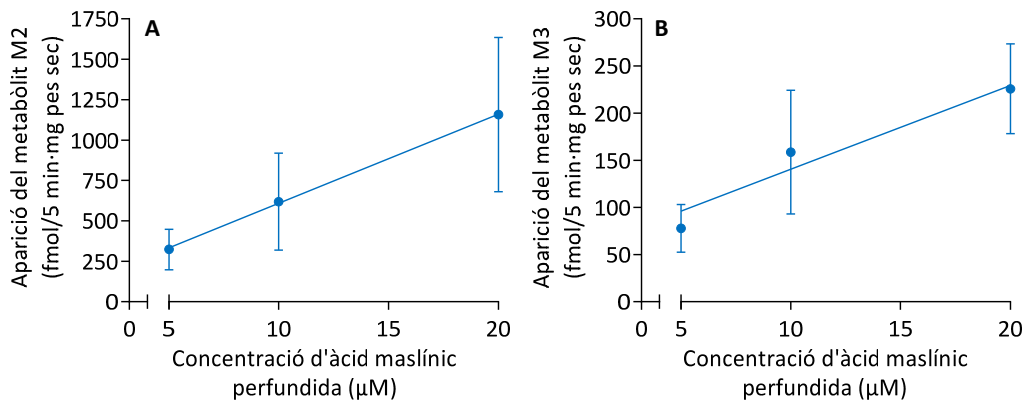
El derivat M5, amb una *m/z* de 485,3272 i un temps de retenció de 5,54 min, s'ha trobat després de la perfusió del jejú de rata amb àcid maslínic a concentracions de 5; 7,5; 10; 15 i 20  $\mu\text{M}$  (Figura 4.35). L'aparició d'aquest metabòlit hidroxilat i deshidrogenat ha incrementat d'acord amb la concentració del triterpè perfundida, des de  $244,0 \pm 75,7$  fmol/5 min·mg pes sec fins a  $1170,2 \pm 229,4$  fmol/5 min·mg pes sec.



**Figura 4.35.** Aparició del derivat M5 de l'àcid maslínic en les solucions perfundides. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 3-5$ .

##### b) M2 i M3 (*m/z* 487,3)

Els metabòlits M2 i M3, resultants de la incorporació d'un grup hidroxil a la molècula de l'àcid maslínic, han presentat una *m/z* de 487,3428 i uns temps de retenció de 4,65 i 5,80 min, respectivament.



**Figura 4.36.** Aparició dels derivats M2 (A) i M3 (B) de l'àcid maslínic en les solucions perfundides. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 2-5$ .

Ambdós derivats s'han trobat en les solucions perfundides que contenien inicialment àcid maslínic a 5, 10 i 20  $\mu\text{M}$ . El derivat M2 ha aparegut a unes concentracions similars a les de l'M1, concretament entre  $323,1 \pm 125,6$  fmol/5 min·mg pes sec i  $1158,0 \pm 477,2$  fmol/5 min·mg pes

sec; d'altra banda, les concentracions del derivat M3 han estat notablement més baixes, amb valors d'entre  $77,8 \pm 25,4$  fmol/5 min-mg pes sec i  $225,8 \pm 47,6$  fmol/5 min-mg pes sec.

#### 4.6. ESTUDI DE L'EFECTE DE L'ÀCID MASLÍNIC SOBRE LESIONS PRENEOPLÀSIQUES INDUÏDES EN CÒLON DE RATA

##### 4.6.1. Pes corporal

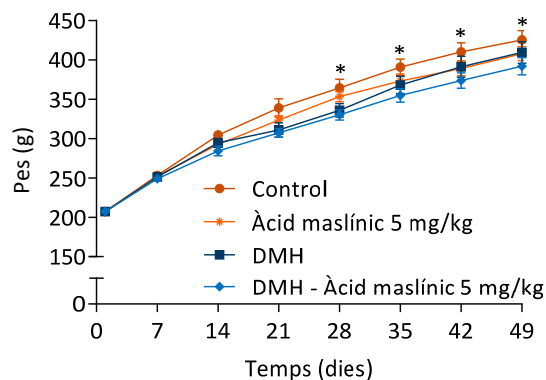
En el decurs de tots els períodes experimentals s'ha registrat diàriament el pes corporal dels animals inclosos en els diferents grups.

##### a) Estudis en rates mascles

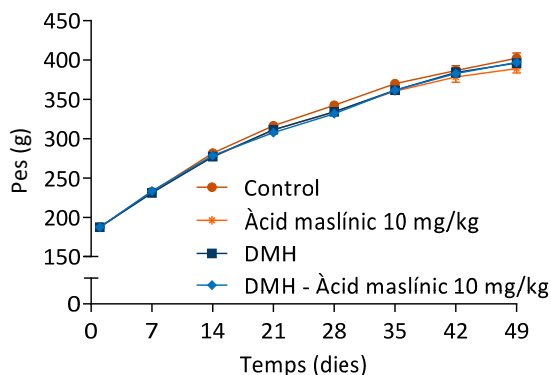
Pel que fa a les rates mascles, s'ha observat que en general el pes corporal ha incrementat en aproximadament 200 g entre l'inici i el final dels diferents tractaments. En l'experiment amb àcid maslínic a la dosi menor (5 mg/kg), el pes corporal mitjà del grup control ha passat de  $203 \pm 10$  g fins a  $422 \pm 20$  g; el pes del grup àcid maslínic 5 mg/kg ha incrementat en 201 g de mitjana; el pes del grup DMH ha augmentat en 202 g de mitjana i el pes del grup DMH-àcid maslínic 5 mg/kg ha incrementat des de  $207 \pm 2$  g fins a  $392 \pm 11$  g (Figura 4.37).

S'han observat diferències a partir del dia 28 entre els grups control i DMH-àcid maslínic 5 mg/kg ( $P < 0,05$ ).

En l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 10 mg/kg el pes corporal mitjà del grup control ha estat de  $182 \pm 11$  g a l'inici i de  $397 \pm 13$  g al final del període; el pes del grup àcid maslínic 10 mg/kg ha incrementat des de  $183 \pm 5$  g fins a  $385 \pm 8$  g; i el pes dels grups DMH i DMH-àcid maslínic 10 mg/kg ha augmentat en 209 g i 210 g de mitjana, respectivament (Figura 4.38). L'anàlisi estadística d'aquestes



**Figura 4.37.** Evolució setmanal del pes corporal de les rates mascles incloses en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 5 mg/kg. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 3-7$ /grup. \* Control vs DMH-àcid maslínic 5 mg/kg ( $P < 0,05$ ). DMH: 1,2-dimetilhidrazina.



**Figura 4.38.** Evolució setmanal del pes corporal de les rates mascles incloses en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 10 mg/kg. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 4-6$ /grup. No hi ha diferències. DMH: 1,2-dimetilhidrazina.

dades no ha mostrat diferències entre els grups.

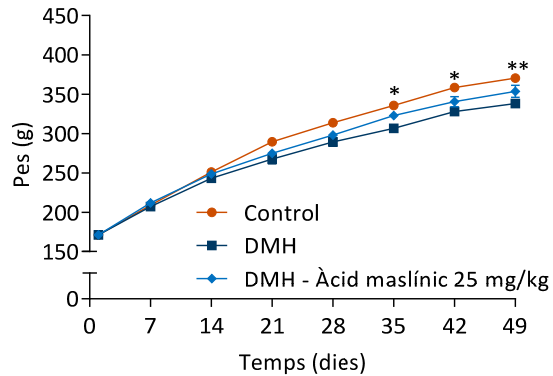
Finalment, en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 25 mg/kg el pes corporal dels animals del grup control ha incrementat en 200 g de mitjana; el pes del grup en el qual s'han induït lesions preneoplàsiques (DMH) ha passat de  $172 \pm 15$  g a  $339 \pm 17$  g, i el pes del grup DMH-àcid maslínic 25 mg/kg ha augmentat en 183 g de mitjana (Figura 4.39). S'han observat diferències entre els grups control i DMH al final de les setmanes cinquena i sisena ( $P < 0,05$ ) i també al final de la darrera setmana ( $P < 0,01$ ).

#### b) Estudi en rates femelles

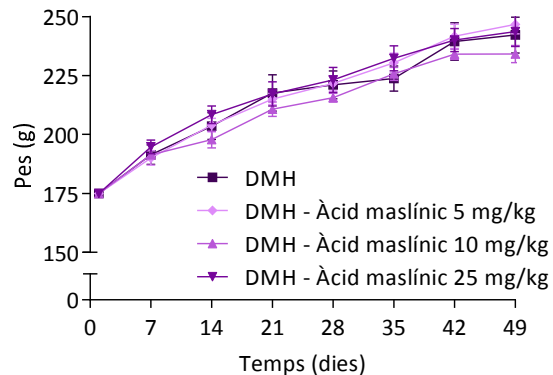
Quant a les rates femelles, l'increment mitjà del pes corporal entre l'inici i el final del període experimental ha estat d'aproximadament 70 g (Figura 4.40). En el grup DMH el pes ha incrementat en 67 g de mitjana; en el grup DMH-àcid maslínic 5 mg/kg el pes ha passat de  $173 \pm 6$  g a  $245 \pm 9$  g; en el grup DMH-àcid maslínic 10 mg/kg el pes ha estat de  $186 \pm 7$  g a l'inici del tractament i de  $246 \pm 11$  g al final; i en el grup DMH-àcid maslínic 25 mg/kg el pes ha incrementat en 69 g de mitjana. No s'han observat diferències entre els grups experimentals.

#### 4.6.2. Consum de pinso i aigua

El consum de pinso i aigua dels animals també s'ha registrat a fi de determinar si el tractament amb àcid maslínic i/o la inducció de lesions preneoplàsiques amb DMH exerceixen cap efecte sobre aquestes variables.



**Figura 4.39.** Evolució setmanal del pes corporal de les rates mascles incloses en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 25 mg/kg. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 2-7/\text{grup}$ . \* Control vs DMH ( $P < 0,05$ ); \*\* control vs DMH ( $P < 0,01$ ). DMH: 1,2-dimetilhidrazina.



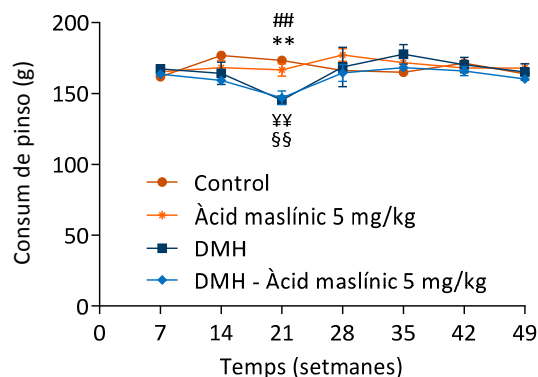
**Figura 4.40.** Evolució setmanal del pes corporal de les rates femelles incloses en l'estudi de l'activitat quimiopreventiva de l'àcid maslínic a dosis de 5, 10 i 25 mg/kg. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 5/\text{grup}$ . No hi ha diferències. DMH: 1,2-dimetilhidrazina.

### a) Estudis en rates mascles

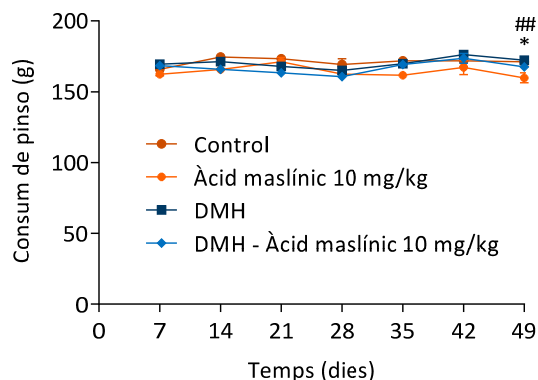
En general, en rates mascles el consum de pinso s'ha mantingut constant al llarg dels períodes de tractament. Els animals inclosos en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 5 mg/kg han presentat un consum inicial i final molt similars ( $165 \pm 1$  g i  $164 \pm 2$  g, respectivament), tot i que puntualment s'han observat diferències (Figura 4.41). En concret, la tercera setmana entre els grups control ( $173 \pm 0$  g) i DMH ( $145 \pm 1$  g), també entre els grups control i DMH-àcid maslínic 5 mg/kg ( $147 \pm 5$  g), entre els grups àcid maslínic 5 mg/kg ( $167 \pm 4$  g) i DMH, i entre els grups àcid maslínic 5 mg/kg i DMH-àcid maslínic 5 mg/kg ( $P < 0,01$  en tots els casos).

El consum de pinso dels animals inclosos en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 10 mg/kg ha estat molt similar als anteriors en la primera setmana ( $167 \pm 2$  g) (Figura 4.42). Al final del tractament s'han observat diferències entre els grups control ( $171 \pm 3$  g) i àcid maslínic 10 mg/kg ( $160 \pm 3$  g) ( $P < 0,05$ ) i entre els grups àcid maslínic 10 mg/kg i DMH ( $172 \pm 1$  g) ( $P < 0,01$ ).

En els animals de l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 25 mg/kg el consum de pinso també s'ha mantingut pràcticament invariable en el decurs del tractament, sense diferències entre els grups (Figura 4.43). A l'inici del període experimental les rates control, DMH i DMH-àcid maslínic 25 mg/kg han ingerit una mitjana de  $141 \pm 0$  g,  $135 \pm 12$  g i  $141 \pm 11$  g, respectivament, mentre que al final del tractament el consum ha estat de  $141 \pm 0$  g,  $137 \pm 4$  g i  $148 \pm 3$  g.



**Figura 4.41.** Consum de pinso setmanal de les rates mascles inclosos en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 5 mg/kg. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 3-7$ /grup. \*\* Control vs DMH; ## control vs DMH-àcid maslínic 5 mg/kg; §§ àcid maslínic 5 mg/kg vs DMH; ¥¥ àcid maslínic 5 mg/kg vs DMH-àcid maslínic 5 mg/kg. DMH: 1,2-dimetilhidrazina.



**Figura 4.42.** Consum de pinso setmanal de les rates mascles inclosos en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 10 mg/kg. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 4-6$ /grup. \* Àcid maslínic 10 mg/kg vs control ( $P < 0,05$ ). ## DMH vs àcid maslínic 10 mg/kg ( $P < 0,01$ ). DMH: 1,2-dimetilhidrazina.



Pel que fa el consum d'aigua, en les rates mascles el consum mitjà durant la primera setmana ha estat de  $309 \pm 7$  mL per als animals inclosos en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi menor (5 mg/kg), de  $227 \pm 2$  mL per als animals de l'experiment amb àcid maslínic a 10 mg/kg, i de  $271 \pm 14$  mL per als animals de l'experiment amb àcid maslínic a la dosi major (25 mg/kg). Al final dels tractaments s'ha observat un lleuger descens del consum d'aigua en el primer i segon experiments ( $275 \pm 13$  mL i  $213 \pm 6$  mL, respectivament) i una reducció més marcada en el darrer experiment ( $195 \pm 21$  mL). En cap cas, però, no s'han observat diferències.

#### b) Estudis en rates femelles

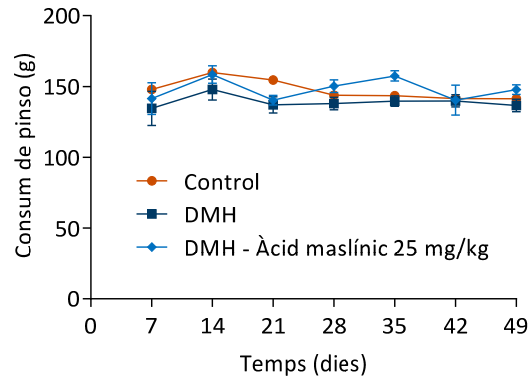
D'altra banda, el consum setmanal de pinso observat en les rates femelles ha estat, en general, menor al dels mascles però també s'ha mantingut constant i sense diferències entre els grups experimentals en el decurs del tractament, amb valors mitjans de  $102 \pm 2$  g i  $102 \pm 1$  g a l'inici i al final del període, respectivament (Figura 4.44).

Tampoc no hi ha hagut diferències quant al consum setmanal d'aigua, encara que s'ha produït un lleuger i progressiu increment en al llarg del període experimental, des de  $156 \pm 7$  mL a l'inici fins a  $173 \pm 10$  mL la darrera setmana.

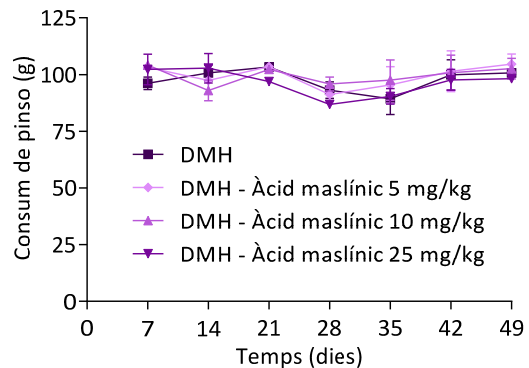
### 4.6.3. Eficiència de la conversió de l'aliment

#### a) Estudis en rates mascles

En les rates mascles l'eficiència de la conversió de l'aliment a l'inici del tractament ha estat del  $27,1 \pm 0,1\%$  de mitjana i en tots els grups ha anat disminuint progressivament fins al final del període experimental (Figures 4.35.A i 4.35.B).

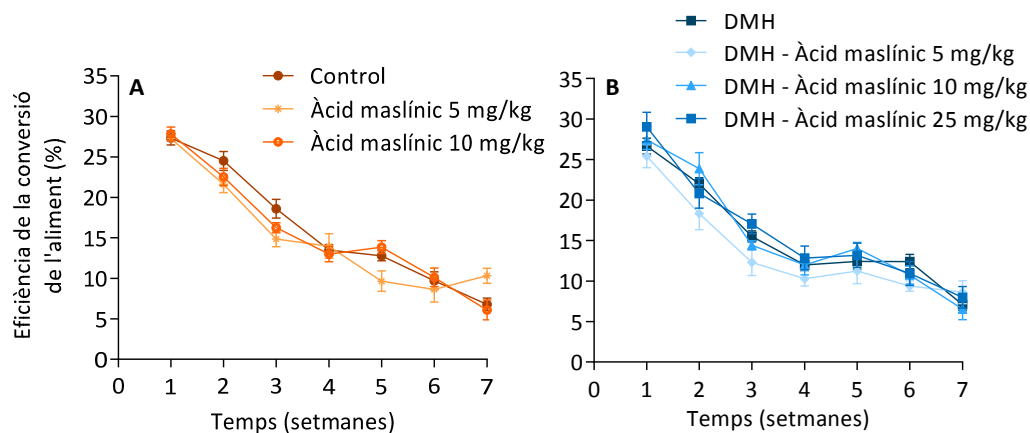


**Figura 4.43.** Consum de pinso setmanal de les rates mascles incloses en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 25 mg/kg. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 2-7$ /grup. No hi ha diferències. DMH: 1,2-dimetilhidrazina.



**Figura 4.44.** Evolució setmanal del consum de pinso de les rates femelles incloses en l'estudi de l'activitat quimiopreventiva de l'àcid maslínic a dosis de 5, 10 i 25 mg/kg. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 5$ /grup. No hi ha diferències. DMH: 1,2-dimetilhidrazina.

En aquest moment l'eficiència ha estat del  $8,7 \pm 0,7\%$  per als animals de l'experiment amb àcid maslínic a la dosi menor (5 mg/kg); del  $6,5 \pm 0,1\%$  per a les rates de l'experiment amb àcid maslínic a 10 mg/kg; i del  $7,0 \pm 0,5\%$  per als animals de l'experiment amb àcid maslínic a la dosi major (25 mg/kg). No s'han observat diferències entre cap dels grups.

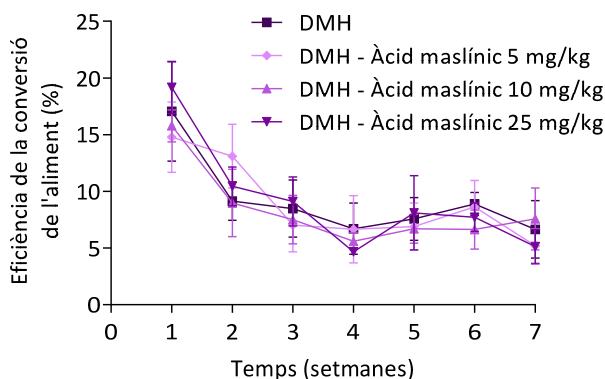


**Figura 4.45.** Eficiència de la conversió de l'aliment de les rates mascles incloses en l'estudi de l'activitat quimiopreventiva de l'àcid maslínic. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 2-7$ /grup. No hi ha diferències. DMH: 1,2-dimetilhidrazina.

#### b) Estudi en rates femelles

Quant a les rates femelles, l'eficiència de la conversió de l'aliment a l'inici del període experimental ha estat del  $17,0 \pm 4,4\%$ ; del  $14,8 \pm 3,1\%$ ; del  $15,8 \pm 1,4\%$  i del  $19,2 \pm 2,3\%$  per als grups DMH i DMH-àcid maslínic 5, 10 i 25 mg/kg, respectivament (Figura 4.46).

Aquests valors han anat decreixent fins a la setmana 4 de tractament, a partir de la qual se n'ha observat l'estabilització. La setena setmana l'eficiència mitjana de tots els grups experimentals ha estat d'aproximadament el 6%.



**Figura 4.46.** Eficiència de la conversió de l'aliment en les rates femelles. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 5$ /grup. No hi ha diferències. DMH: 1,2-dimetilhidrazina.

#### 4.6.4. Dades morfomètriques del còlon

S'han mesurat el pes humit, la longitud i l'amplada dels segments proximal, medial i distal del còlon obtingut de cada animal. A partir de la longitud i l'amplada se n'ha calculat l'àrea, que a més s'ha normalitzat pel pes del segment corresponent.

### a) Estudis en rates mascles

En l'experiment amb àcid maslínic a la dosi menor (5 mg/kg) el pes humit s'ha trobat significativament incrementat en els grups DMH i DMH-àcid maslínic 5 mg/kg (Taula 4.13), fet es pot atribuir a l'aparició d'edema lligat a un procés inflamatori causat per l'agent carcinogen. Mentre que en els grups control i àcid maslínic 5 mg/kg els valors han estat d'aproximadament 1,5 g, en el grup DMH el pes humit ha estat d'1,90 ± 0,12 g i en el grup DMH-àcid maslínic 5 mg/kg ha estat d'1,70 ± 0,06 g.

De manera similar, en aquests grups l'àrea total del còlon també ha estat major (al voltant de 19,3 cm<sup>2</sup>), tot i que només el darrer ha presentat diferències respecte el control, en el qual l'àrea calculada ha estat de 15,8 cm<sup>2</sup> ( $P < 0,05$ ). Quan l'àrea s'ha normalitzat pel pes els valors resultants han estat més homogenis, concretament entre 10,4 ± 0,48 cm<sup>2</sup>/g i 11,5 ± 0,49 cm<sup>2</sup>/g, sense diferències (Taula 4.13).

Finalment, la longitud total del còlon ha estat molt similar entre els grups experimentals, amb valors que s'han trobat entre 14,5 ± 0,38 cm i 16,0 ± 0,85 cm (Taula 4.13), de nou sense diferències (Taula 4.13).

**Taula 4.13.** Dades morfològiques dels segments de còlon de les rates mascles incloses en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 5 mg/kg. Els resultats s'expressen en forma de mitjana ± error estàndard; n = 3-7/grup. \* vs control ( $P < 0,05$ ); # vs control ( $P < 0,001$ ); <sup>c</sup> vs àcid maslínic 5 mg/kg ( $P < 0,05$ ); <sup>s</sup> vs àcid maslínic 5 mg/kg ( $P < 0,01$ ); <sup>¥</sup> vs àcid maslínic 5 mg/kg ( $P < 0,001$ ); <sup>¤</sup> vs DMH ( $P < 0,01$ ).

Grup	Segment	Pes humit (g)	Longitud (cm)	Àrea (cm <sup>2</sup> )	Àrea/pes segment (cm <sup>2</sup> /g)
Control	Proximal	0,58 ± 0,03	5,07 ± 0,18	5,80 ± 0,44	10,0 ± 0,43
	Medial	0,53 ± 0,02	4,93 ± 0,15	5,47 ± 0,26	10,4 ± 0,27
	Distal	0,42 ± 0,03	4,53 ± 0,09	4,57 ± 0,18	10,9 ± 0,97
	<b>Total</b>	<b>1,53 ± 0,05</b>	<b>14,5 ± 0,38</b>	<b>15,8 ± 0,68</b>	<b>10,4 ± 0,48</b>
Àcid maslínic 5 mg/kg	Proximal	0,57 ± 0,02	4,98 ± 0,22	5,47 ± 0,28	9,59 ± 0,32
	Medial	0,52 ± 0,02	4,95 ± 0,17	6,02 ± 0,47	11,6 ± 0,57
	Distal	0,44 ± 0,01	4,97 ± 0,27	6,10 ± 0,50	13,7 ± 0,90
	<b>Total</b>	<b>1,52 ± 0,04</b>	<b>14,9 ± 0,47</b>	<b>17,5 ± 1,11</b>	<b>11,5 ± 0,49</b>
DMH	Proximal	0,80 ± 0,08 <sup>s</sup>	5,23 ± 0,36	7,20 ± 0,55	9,17 ± 0,64
	Medial	0,55 ± 0,03	4,93 ± 0,28	6,15 ± 0,40	11,1 ± 0,39
	Distal	0,55 ± 0,03	4,98 ± 0,25	5,90 ± 0,41	10,7 ± 0,75 <sup>c</sup>
	<b>Total</b>	<b>1,90 ± 0,12<sup>#¥</sup></b>	<b>15,1 ± 0,71</b>	<b>19,2 ± 1,31</b>	<b>10,2 ± 0,51</b>
DMH-Àcid maslínic 5 mg/kg	Proximal	0,69 ± 0,03	5,29 ± 0,34	6,39 ± 0,47	9,19 ± 0,41
	Medial	0,56 ± 0,02	5,56 ± 0,35	6,79 ± 0,58	12,0 ± 0,62
	Distal	0,45 ± 0,01	5,16 ± 0,25	6,27 ± 0,50	14,1 ± 1,17 <sup>¤</sup>
	<b>Total</b>	<b>1,70 ± 0,06<sup>s</sup></b>	<b>16,0 ± 0,85</b>	<b>19,4 ± 1,45*</b>	<b>11,4 ± 0,63</b>

En l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 10 mg/kg el pes humit també ha estat significativament major en els grups d'animals als quals s'han induït lesions preneoplàsiques, concretament d' $1,76 \pm 0,08$  g i d' $1,80 \pm 0,09$  g per als grups DMH i DMH-àcid maslínic 10 mg/kg, respectivament, enfront d'aproximadament 1,50 g en els grups control i àcid maslínic 10 mg/kg.

La longitud total del còlon, en canvi, no s'ha modificat com a conseqüència dels diferents tractaments, amb valors de  $13,2 \pm 0,70$  cm per al grup control, de  $14,5 \pm 0,81$  cm per al grup àcid maslínic 10 mg/kg, de  $13,7 \pm 0,67$  cm per al grup DMH i de  $13,8 \pm 0,33$  cm per al grup amb lesions i tractat amb el triterpè.

Pel que fa l'àrea total del còlon tampoc no s'han observat diferències entre els grups experimentals i els valors s'han trobat entre  $15,0 \pm 1,55$  cm<sup>2</sup> i  $16,6 \pm 1,33$  cm<sup>2</sup>. Al normalitzar-la pel pes del còlon els resultats han estat igualment similars entre tots els animals, si bé en els grups DMH i DMH-àcid maslínic 10 mg/kg han estat lleugerament inferiors, concretament de  $8,85 \pm 0,51$  g/cm<sup>2</sup> i  $9,14 \pm 0,38$  g/cm<sup>2</sup>, respectivament.

**Taula 4.14.** Dades morfomètriques dels segments de còlon de les rates mascles incloses en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 10 mg/kg. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard; n = 3–6/grup. \* vs control ( $P < 0,05$ ); # vs control ( $P < 0,01$ ); § vs control ( $P < 0,001$ ); † vs àcid maslínic 10 mg/kg ( $P < 0,05$ ); ‡ vs àcid maslínic 10 mg/kg ( $P < 0,01$ ); <sup>c</sup> vs àcid maslínic 10 mg/kg ( $P < 0,001$ ).

Grup	Segment	Pes humit (g)	Longitud (cm)	Àrea (cm <sup>2</sup> )	Àrea/pes segment (cm <sup>2</sup> /g)
Control	Proximal	0,55 $\pm$ 0,04	4,63 $\pm$ 0,33	4,83 $\pm$ 0,34	8,91 $\pm$ 0,06
	Medial	0,49 $\pm$ 0,01	4,33 $\pm$ 0,26	5,80 $\pm$ 0,99	11,96 $\pm$ 1,99
	Distal	0,44 $\pm$ 0,02	4,25 $\pm$ 0,29	4,35 $\pm$ 0,33	9,53 $\pm$ 1,26
	<b>Total</b>	<b>1,49 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>13,2 <math>\pm</math> 0,70</b>	<b>15,0 <math>\pm</math> 1,55</b>	<b>10,1 <math>\pm</math> 1,19</b>
Àcid maslínic 10 mg/kg	Proximal	0,56 $\pm$ 0,03	5,20 $\pm$ 0,24	5,53 $\pm$ 0,43	9,78 $\pm$ 0,38
	Medial	0,52 $\pm$ 0,05	4,68 $\pm$ 0,34	5,68 $\pm$ 0,52	10,86 $\pm$ 0,93
	Distal	0,44 $\pm$ 0,02	4,62 $\pm$ 0,32	5,37 $\pm$ 0,50	12,14 $\pm$ 0,91
	<b>Total</b>	<b>1,53 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>14,5 <math>\pm</math> 0,81</b>	<b>16,6 <math>\pm</math> 1,33</b>	<b>10,7 <math>\pm</math> 0,69</b>
DMH	Proximal	0,79 $\pm$ 0,04 <sup>*‡</sup>	5,20 $\pm$ 0,58	6,35 $\pm$ 0,63	8,03 $\pm$ 0,43
	Medial	0,51 $\pm$ 0,02	4,03 $\pm$ 0,13	4,90 $\pm$ 0,43	9,55 $\pm$ 0,59
	Distal	0,46 $\pm$ 0,03	3,93 $\pm$ 0,13	4,37 $\pm$ 0,47	9,43 $\pm$ 0,11
	<b>Total</b>	<b>1,76 <math>\pm</math> 0,08<sup>#†</sup></b>	<b>13,7 <math>\pm</math> 0,67</b>	<b>15,9 <math>\pm</math> 1,76</b>	<b>8,85 <math>\pm</math> 0,51</b>
DMH-Àcid maslínic 10 mg/kg	Proximal	0,72 $\pm$ 0,06	5,07 $\pm$ 0,26	5,93 $\pm$ 0,51	8,24 $\pm$ 0,34
	Medial	0,54 $\pm$ 0,02	4,37 $\pm$ 0,05	5,17 $\pm$ 0,22	9,50 $\pm$ 0,22
	Distal	0,53 $\pm$ 0,03	4,33 $\pm$ 0,14	5,33 $\pm$ 0,32	10,1 $\pm$ 0,69
	<b>Total</b>	<b>1,80 <math>\pm</math> 0,09<sup>§c</sup></b>	<b>13,8 <math>\pm</math> 0,33</b>	<b>16,4 <math>\pm</math> 0,95</b>	<b>9,14 <math>\pm</math> 0,38</b>

Finalment, en el darrer experiment (àcid maslínic a una dosi de 25 mg/kg) el pes humit del còlon ha estat notablement major en el grup DMH-àcid maslínic 25 mg/kg, amb un valor de  $2,01 \pm$

0,14 g, enfront d'1,67 ± 0,16 g en el grup control i d'1,76 ± 0,08 g en el grup DMH, si bé l'anàlisi estadística no ha mostrat diferències.

De manera similar, la longitud total del còlon també ha estat més elevada en el grup al qual s'han induït lesions i que ha rebut el tractament amb el triterpè, i en aquest cas la diferència ha estat significativa. La longitud del teixit en aquests animals ha estat de 16,0 ± 0,48 cm, mentre que en el grup control i en el grup DMH ha estat de 13,0 ± 0,60 cm ( $P < 0,001$ ) i 14,0 ± 0,59 cm ( $P < 0,001$ ), respectivament.

Al calcular l'àrea total del còlon a partir de la longitud i l'amplada mitjana la tendència s'ha mantingut respecte l'observada en la longitud, també amb diferències entre el grup DMH-àcid maslínic 25 mg/kg (17,4 ± 0,62 cm<sup>2</sup>) i els grups control (12,6 ± 1,40 cm<sup>2</sup>) ( $P < 0,001$ ) i DMH (15,0 ± 0,75 cm<sup>2</sup>) ( $P < 0,01$ ).

La normalització de l'àrea pel pes del còlon ha resultat en valors de 7,56 ± 0,13 cm<sup>2</sup>/g, 8,54 ± 0,39 cm<sup>2</sup>/g i 8,83 ± 0,51 cm<sup>2</sup>/g per als grups control, DMH i DMH-àcid maslínic 25 mg/kg, sense diferències.

**Taula 4.15.** Dades morfomètriques dels segments de còlon de les rates mascles incloses en l'experiment amb àcid maslínic a la dosi de 25 mg/kg. Els resultats s'expressen en forma de mitjana ± error estàndard; n = 2–7/grup. \* vs control ( $P < 0,001$ ); <sup>§</sup> vs DMH ( $P < 0,01$ ); <sup>#</sup> vs DMH ( $P < 0,001$ ).

Grup	Segment	Pes humit (g)	Longitud (cm)	Àrea (cm <sup>2</sup> )	Àrea/pes segment (cm <sup>2</sup> /g)
Control	Proximal	0,51 ± 0,08	3,90 ± 0,60	3,55 ± 0,95	6,85 ± 0,73
	Medial	0,57 ± 0,00	4,05 ± 0,05	4,25 ± 0,15	7,48 ± 0,28
	Distal	0,59 ± 0,07	5,05 ± 0,05	4,80 ± 0,30	8,27 ± 0,53
	<b>Total</b>	<b>1,67 ± 0,16</b>	<b>13,0 ± 0,60</b>	<b>12,6 ± 1,40</b>	<b>7,56 ± 0,13</b>
DMH	Proximal	0,66 ± 0,07	4,63 ± 0,22	4,90 ± 0,30	7,57 ± 0,50
	Medial	0,56 ± 0,02	4,40 ± 0,19	5,02 ± 0,30	8,93 ± 0,53
	Distal	0,54 ± 0,02	4,98 ± 0,46	5,10 ± 0,43	9,55 ± 0,85
	<b>Total</b>	<b>1,76 ± 0,08</b>	<b>14,0 ± 0,59</b>	<b>15,0 ± 0,75</b>	<b>8,54 ± 0,39</b>
DMH- Àcid maslínic 25 mg/kg	Proximal	0,69 ± 0,07	5,07 ± 0,26	5,56 ± 0,32	8,26 ± 0,47
	Medial	0,69 ± 0,04	5,33 ± 0,17	5,81 ± 0,34	8,47 ± 0,57
	Distal	0,62 ± 0,06	5,61 ± 0,26	5,99 ± 0,26	9,99 ± 0,91
	<b>Total</b>	<b>2,01 ± 0,14</b>	<b>16,0 ± 0,48*<sup>#</sup></b>	<b>17,4 ± 0,62*<sup>§</sup></b>	<b>8,83 ± 0,51</b>

## b) Estudi en rates femelles

En les rates femelles el pes humit del còlon ha estat força homogeni entre els diferents grups, la qual cosa es pot atribuir al fet que tots els animals han rebut les injeccions de DMH. Així, els valors d'aquesta variable s'han trobat entre 1,21 ± 0,05 g i 1,24 ± 0,07 g.

En canvi, s'ha observat la longitud total del còlon lleugerament incrementada en els animals als quals s'ha administrat l'àcid maslínic a les dosis menors (5 i 10 mg/kg), concretament amb valors de  $14,0 \pm 0,10$  cm i de  $14,5 \pm 0,60$  cm, enfront de  $13,2 \pm 0,51$  cm en el grup DMH i de  $13,6 \pm 0,43$  cm en el grup que ha rebut la dosi major. L'anàlisi estadística ha mostrat diferències entre els grups DMH i DMH-àcid maslínic 10 mg/kg ( $P < 0,05$ ).

La mateixa tendència s'ha observat per a l'àrea total del còlon, que ha estat de  $14,7 \pm 0,65$  cm<sup>2</sup> en el grup DMH, de  $15,0 \pm 0,37$  cm<sup>2</sup> en el grup que ha rebut l'àcid maslínic a la dosi menor, de  $16,4 \pm 0,96$  cm<sup>2</sup> en el grup al qual s'ha administrat el triterpè a 10 mg/kg i de  $14,9 \pm 0,52$  cm<sup>2</sup> en grup DMH-àcid maslínic 25 mg/kg. També s'han observat diferències entre el primer i el tercer grup ( $P < 0,05$ ). Quan l'àrea s'ha normalitzat pel pes del còlon els resultats han esdevingut més homogenis i s'han trobat entre  $11,8 \pm 0,22$  cm<sup>2</sup>/g i  $13,3 \pm 0,14$  cm<sup>2</sup>/g.

**Taula 4.16.** Dades morfològiques dels segments de còlon de les rates femelles incloses en l'estudi de l'activitat quimiopreventiva de l'àcid maslínic. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard; n = 5–9/grup. \* vs DMH ( $P < 0,05$ ); # vs DMH ( $P < 0,001$ ).

Grup	Segment	Pes humit (g)	Longitud (cm)	Àrea (cm <sup>2</sup> )	Àrea/pes segment (cm <sup>2</sup> /g)
DMH	Proximal	0,46 $\pm$ 0,02	4,23 $\pm$ 0,19	4,76 $\pm$ 0,26	10,4 $\pm$ 0,51
	Medial	0,40 $\pm$ 0,01	4,50 $\pm$ 0,21	4,89 $\pm$ 0,23	12,3 $\pm$ 0,32
	Distal	0,39 $\pm$ 0,02	4,51 $\pm$ 0,16	5,07 $\pm$ 0,30	13,1 $\pm$ 0,44
	<b>Total</b>	<b>1,24 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>13,2 <math>\pm</math> 0,51</b>	<b>14,7 <math>\pm</math> 0,65</b>	<b>11,8 <math>\pm</math> 0,22</b>
DMH-Àcid maslínic 5 mg/kg	Proximal	0,43 $\pm$ 0,04	4,28 $\pm$ 0,18	4,69 $\pm$ 0,37	10,9 $\pm$ 0,39
	Medial	0,42 $\pm$ 0,01	4,80 $\pm$ 0,08	5,12 $\pm$ 0,18	12,1 $\pm$ 0,35
	Distal	0,36 $\pm$ 0,02	4,90 $\pm$ 0,16	5,22 $\pm$ 0,25	14,3 $\pm$ 0,54
	<b>Total</b>	<b>1,22 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>14,0 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>15,0 <math>\pm</math> 0,37</b>	<b>12,3 <math>\pm</math> 0,14</b>
DMH-Àcid maslínic 10 mg/kg	Proximal	0,44 $\pm$ 0,03	4,36 $\pm$ 0,09	4,84 $\pm$ 0,30	11,2 $\pm$ 0,30
	Medial	0,44 $\pm$ 0,02	5,12 $\pm$ 0,22	5,82 $\pm$ 0,31	13,1 $\pm$ 0,31
	Distal	0,36 $\pm$ 0,02	5,00 $\pm$ 0,31	5,78 $\pm$ 0,39	16,1 $\pm$ 0,25 <sup>#</sup>
	<b>Total</b>	<b>1,24 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>14,5 <math>\pm</math> 0,60*</b>	<b>16,4 <math>\pm</math> 0,96*</b>	<b>13,3 <math>\pm</math> 0,14</b>
DMH-Àcid maslínic 25 mg/kg	Proximal	0,42 $\pm$ 0,02	4,06 $\pm$ 0,11	4,23 $\pm$ 0,13	10,0 $\pm$ 0,47
	Medial	0,42 $\pm$ 0,02	4,78 $\pm$ 0,11	5,35 $\pm$ 0,24	12,8 $\pm$ 0,69
	Distal	0,36 $\pm$ 0,02	4,74 $\pm$ 0,26	5,29 $\pm$ 0,28	14,8 $\pm$ 0,89*
	<b>Total</b>	<b>1,21 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>13,6 <math>\pm</math> 0,43</b>	<b>14,9 <math>\pm</math> 0,52</b>	<b>12,4 <math>\pm</math> 0,63</b>

#### 4.6.5. Recompte de lesions preneoplàsiques

En els resultats que es presenten a continuació s'ometen els grups control dels diferents experiments en mascles, així com també els grups àcid maslínic 5 i 10 mg/kg, ja que no s'han trobat lesions preneoplàsiques en el còlon de cap d'ells. D'altra banda, donat que els grups DMH dels diferents experiments realitzats en mascles han estat sotmesos a les mateixes

condicions, pel que fa la dosi i la pauta d'administració de l'agent carcinogen, s'ha cregut convenient presentar-los com a un únic grup, a fi de facilitar la visualització de l'efecte de les diferents dosis d'àcid maslínic en els grups tractats.

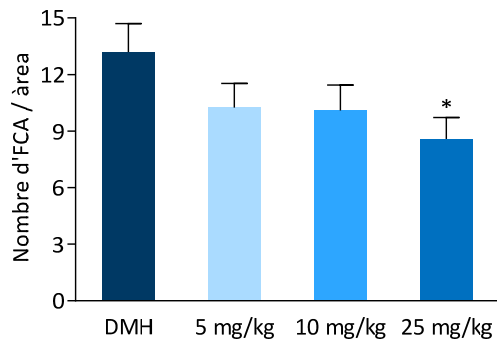
#### 4.6.5.1. Focus de criptes aberrants

Els segments de còlon (proximal, medial i distal) fixats en formalina s'han tenyit amb blau de metilè per procedir a la observació al microscopi i al recompte de focus de criptes aberrants (FCA). El nombre de lesions s'ha normalitzat per àrea de còlon, ja sigui total o per segments.

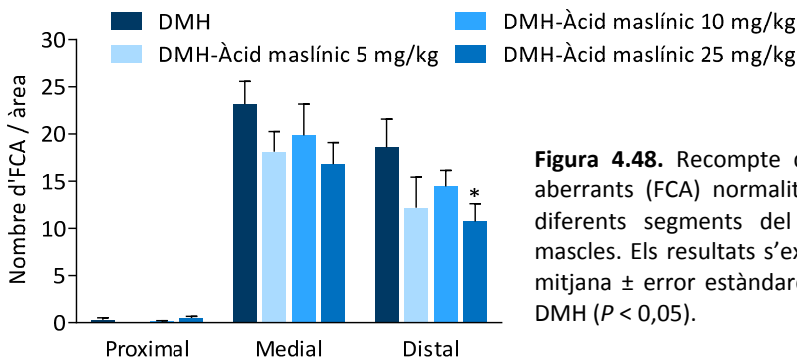
##### a) Estudis en rates mascles

*Focus de criptes aberrants en còlon total.* El tractament amb àcid maslínic a les dosis de 5 i 10 mg/kg ha disminuït l'aparició d'aquestes lesions preneoplàsiques en còlon total en un 22% i un 24%, respectivament, tot i que sense arribar a ser estadísticament significatiu. En canvi, a la dosi més elevada (25 mg/kg) la reducció ha estat del 35% ( $P < 0,05$ ) (Figura 4.47).

*Focus de criptes aberrants per segments.* Si els resultats es representen en funció del segment de còlon s'observa que en general, per a tots els grups experimentals, el nombre d'FCA/àrea és major en el segment medial que en el distal i que en el proximal pràcticament no es troben lesions (Figura 4.48). En ambdós segments, medial i distal, s'observa una tendència decreixent en el nombre d'FCA/àrea en resposta al tractament amb àcid maslínic. En el segment distal, en el qual els recomptes han estat de  $18,6 \pm 3,0$ ;  $12,2 \pm 3,2$ ;  $14,4 \pm 1,7$  i  $10,7 \pm 1,9$  FCA/àrea per als grups DMH, DMH-àcid maslínic 5 mg/kg, DMH-àcid maslínic 10 mg/kg i DMH-àcid maslínic 25 mg/kg, respectivament, l'efecte del triterpè és estadísticament significatiu a la dosi major ( $P < 0,05$ ).

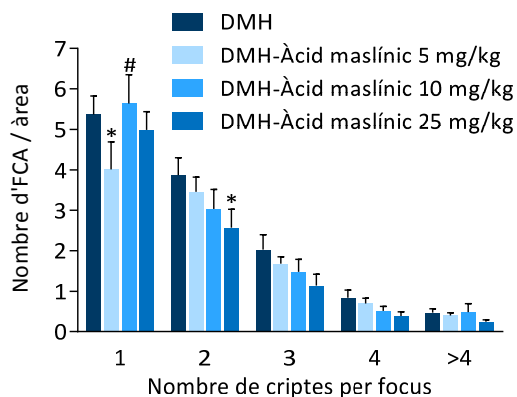


**Figura 4.47.** Recompte dels focus de criptes aberrants (FCA) normalitzats per àrea en el còlon total de les rates mascles. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 4-7$ /grup. \* vs DMH ( $P < 0,05$ ).



**Figura 4.48.** Recompte dels focus de criptes aberrants (FCA) normalitzats per àrea en els diferents segments del còlon de les rates mascles. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 5-8$ /grup. \* vs DMH ( $P < 0,05$ ).

**Multiplicitat.** Simultàniament al recompte d'FCA, les lesions s'han anat classificant segons el nombre de criptes pel qual estan formades. Els resultats han mostrat que la major part d'FCA estan constituïts per una sola cripta, amb recomptes de  $5,4 \pm 0,5$ ;  $4,0 \pm 0,7$ ;  $5,6 \pm 0,7$  i  $5,0 \pm 0,5$  FCA/àrea per al grup DMH i per als grups tractats amb dosis creixents d'àcid maslínic, respectivament. A mesura que es consideren focus amb un major nombre de criptes, els recomptes disminueixen en tots els grups experimentals (Figura 4.38).

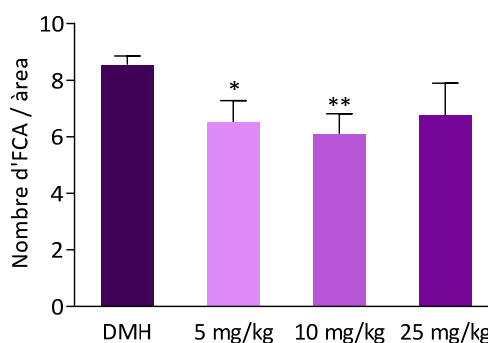


**Figura 4.49.** Recompte dels focus de criptes aberrants (FCA) normalitzats per àrea en el còlon de les rates mascles, representat en funció del nombre de criptes presents en cada lesió. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 5-7/\text{grup}$ . \* vs DMH ( $P < 0,05$ ); # vs DMH-àcid maslínic 5 mg/kg ( $P < 0,05$ ).

Així, el nombre d'FCA/àrea de dos, tres, quatre i més de quatre criptes són, en el grup DMH i respectivament, un 28%, 62%, 84% i 91% menors que el nombre d'FCA/àrea formats per una sola cripta. D'altra banda, en general en tots els grups tractats amb àcid maslínic s'observa una tendència a la reducció del nombre d'FCA/àrea respecte el grup DMH, que a més ha estat estadísticament significativa entre els grups DMH i DMH-àcid maslínic 5 mg/kg a nivell de focus formats per una sola cripta ( $P < 0,05$ ) i entre els grups DMH i DMH-àcid maslínic 25 mg/kg en els focus formats per dues criptes ( $P < 0,05$ ).

## b) Estudi en rates femelles

**Focus de criptes aberrants en còlon total.** Pel que fa el recompte d'FCA en els segments de còlon de les rates femelles s'ha observat una tendència similar a la dels mascles. En còlon total el nombre de lesions ha disminuït des de  $8,5 \pm 0,3$  FCA/àrea en el grup DMH fins a  $6,5 \pm 0,8$  FCA/àrea en el grup DMH-àcid maslínic 5 mg/kg, fet que representa una reducció del 24%, fins a  $6,1 \pm 0,7$  FCA/àrea (29%) en el grup tractat amb el triterpè a una dosi de 10 mg/kg i fins a  $6,8 \pm 1,1$  FCA/àrea (21%) en el grup que ha rebut la dosi major (25 mg/kg) (Figura 4.50). L'efecte ha estat

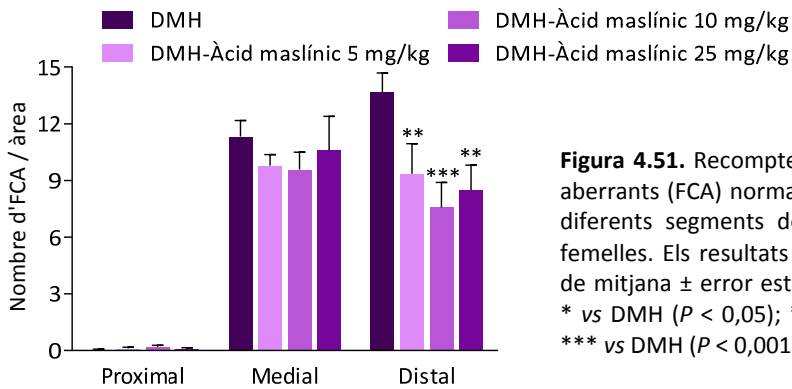


**Figura 4.50.** Recompte dels focus de criptes aberrants (FCA) normalitzats per àrea en el còlon total de les rates femelles. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 3-8/\text{grup}$ . \* vs DMH ( $P < 0,05$ ); \*\* vs DMH ( $P < 0,01$ ); \*\*\* vs DMH ( $P < 0,001$ ).



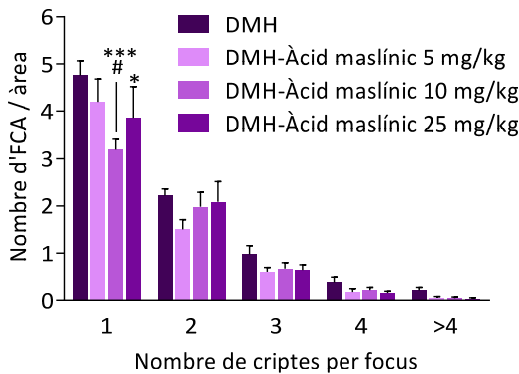
estadísticament significatiu a les dues primeres dosis ( $P < 0,05$  i  $P < 0,01$ , respectivament).

*Focus de criptes aberrants per segments.* La distribució de les lesions en els diferents segments de còlon ha estat també semblant a la dels mascles, en tant que s'han concentrat en els segments medial i distal, mentre que en el proximal gairebé no se n'han trobat (Figura 4.51). A més, també s'han observat diferències en el segment distal, en aquest cas entre el grup DMH i tots els grups tractats amb àcid maslínic. En concret, i respecte el grup induït, el nombre d'FCA/àrea s'ha reduït en un 32%, 45% i 38% en resposta a l'administració del triterpè a dosis de 5, 10 i 25 mg/kg, respectivament ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,001$  i  $P < 0,01$ ).



**Figura 4.51.** Recompte dels focus de criptes aberrants (FCA) normalitzats per àrea en els diferents segments del còlon de les rates femelles. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 3-8$ /grup. \* vs DMH ( $P < 0,05$ ); \*\* vs DMH ( $P < 0,01$ ); \*\*\* vs DMH ( $P < 0,001$ ).

*Multiplicitat.* Quan s'han representat els resultats en funció del nombre de criptes que constitueixen cada focus s'ha obtingut un perfil idèntic a l'observat en els mascles, en el qual el nombre d'FCA/àrea és menor com més gran és el nombre de criptes en cada focus (Figura 4.52). A nivell de lesions formades per una sola cripta s'han observat diferències entre el grup DMH i els grups DMH-àcid maslínic 10 i 25 mg/kg, amb una reducció del 33% ( $P < 0,001$ ) i del 19% ( $P < 0,05$ ), respectivament.



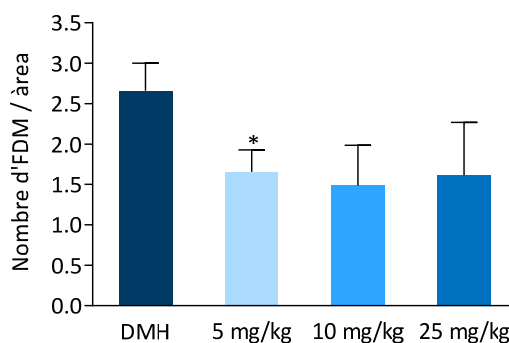
**Figura 4.52.** Recompte dels focus de criptes aberrants (FCA) normalitzats per àrea en el còlon de les rates femelles, representat en funció del nombre de criptes presents en cada lesió. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 3-8$ /grup. \* vs DMH ( $P < 0,05$ ); \*\*\* vs DMH ( $P < 0,001$ ); # vs DMH-àcid maslínic 5 mg/kg ( $P < 0,05$ ).

#### 4.6.5.2. Focus de criptes amb depleció de mucines

Un cop realitzats els recomptes de focus de criptes aberrants els segments de còlon s'han tenyit amb la solució de diamines i ferro i els colorants blau alcià i vermell neutre per a la observació i recompte dels focus amb depleció de mucines (FDM). Els recomptes d'aquestes lesions han estat en general inferiors als d'FCA, considerant en global tots els grups experimentals, tant mascles com femelles. Tal com s'ha fet per als FCA, el nombre de lesions s'ha normalitzat per àrea de còlon, ja sigui total o per segments.

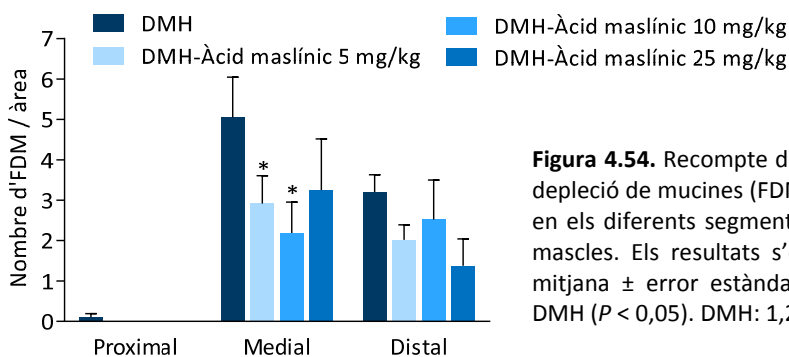
##### a) Estudis en rates mascles

*Focus de criptes amb depleció de mucines en còlon total.* En mascles, el nombre d'FDM en còlon total s'ha reduït en resposta al tractament amb àcid maslínic a les diferents dosis. Així, mentre que en el grup DMH s'han trobat  $2,7 \pm 0,3$  FDM/àrea, en els grups que han rebut àcid maslínic a les dosis de 5, 10 i 25 mg/kg els recomptes han estat d' $1,7 \pm 0,3$ ;  $1,5 \pm 0,5$ ;  $1,6 \pm 0,7$  FDM/àrea, respectivament (Figura 4.53), que representen una disminució del 38%, 44% i 39%, respectivament. A la dosi menor l'efecte del triterpè ha estat estadísticament significatiu ( $P < 0,05$ ).



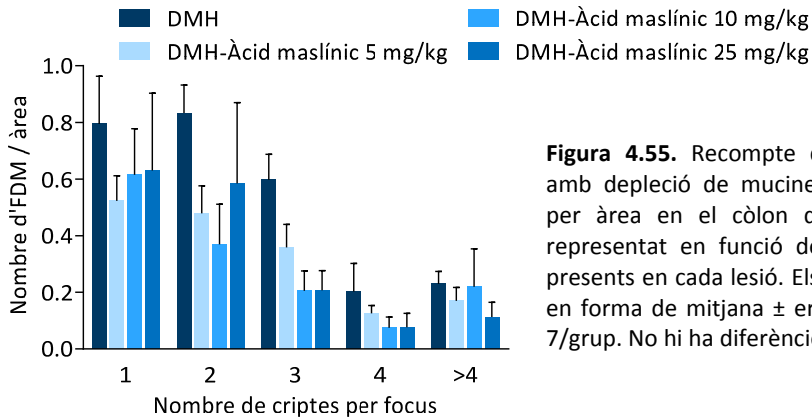
**Figura 4.53.** Recompte dels focus de criptes amb depleció de mucines (FDM) normalitzats per àrea en el còlon total de les rates mascles. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 4-7$ /grup. \* vs DMH ( $P < 0,05$ ). DMH: 1,2-dimetilhidrazina.

*Focus de criptes amb depleció de mucines per segments.* La distribució dels FDM en els diferents segments de còlon ha estat similar a la dels FCA, de manera que les lesions s'han localitzat majoritàriament en el segment medial seguit del distal i gairebé no se n'han trobat en el segment proximal (Figura 4.54). A més, en el segment medial s'han observat diferències entre el grup DMH i els grups DMH-àcid maslínic 5 i 10 mg/kg, en els quals la reducció del nombre d'FDM/àrea respecte el grup induït ha estat d'un 42% i 57% a les respectives dosis ( $P < 0,05$ ).



**Figura 4.54.** Recompte dels focus de criptes amb depleció de mucines (FDM) normalitzats per àrea en els diferents segments del còlon de les rates mascles. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 4-8$ /grup. \* vs DMH ( $P < 0,05$ ). DMH: 1,2-dimetilhidrazina.

*Multiplicitat.* La classificació dels FDM segons el nombre de criptes pel qual estan formats ha proporcionat uns resultats semblants als obtinguts per als FCA, és a dir, que el nombre d'FDM/àrea disminueix progressivament a mesura que es consideren lesions amb un major nombre de criptes. En canvi, la diferència entre el nombre d'FDM/àrea d'una i de dues criptes no és tan acusada com l'observada per als FCA/àrea, i en la majoria de grups experimentals el nombre de lesions de més de quatre criptes és lleugerament més elevat que el nombre de lesions de quatre criptes (Figura 4.55).



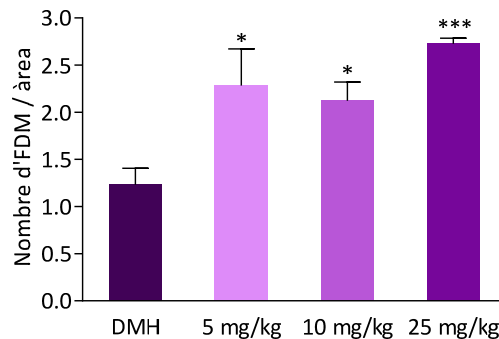
**Figura 4.55.** Recompte dels focus de criptes amb depleció de mucines (FDM) normalitzats per àrea en el còlon de les rates mascles, representat en funció del nombre de criptes presents en cada lesió. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 4-7$ /grup. No hi ha diferències.

## b) Estudi en rates femelles

D'altra banda, el recompte d'FDM en les rates femelles ha proporcionat uns resultats amb una tendència oposada a l'observada fins ara, de manera que el nombre d'FDM/àrea en els grups tractats amb àcid maslínic a les diferents dosis és superior al del grup DMH.

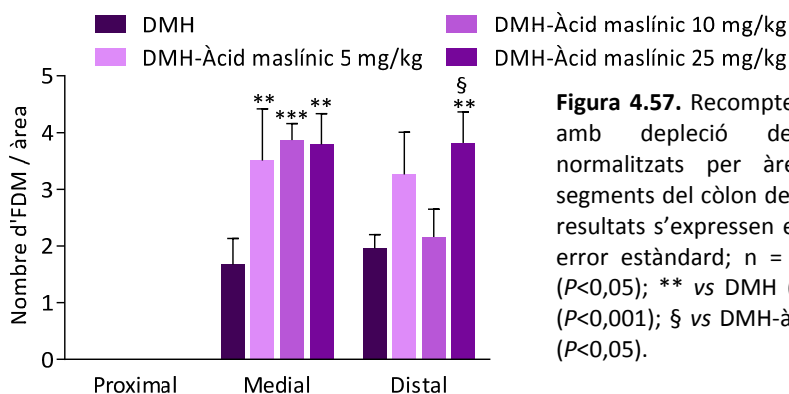
*Focus de criptes amb depleció de mucines en còlon total.* En còlon total, el nombre de lesions en els grups que han rebut el triterpè és, de mitjana, 1,9 vegades superior al del grup induït i estadísticament significatiu a les tres dosis ( $P < 0,05$  per a 5 i 10 mg/kg i  $P < 0,001$  per a 25 mg/kg) (Figura 4.56).

*Focus de criptes amb depleció de mucines per segments.* Si es consideren separatament els tres segments, en el proximal no s'han trobat FDM en cap dels grups experimentals. En canvi, les lesions es distribueixen homogèniament entre els segments medial i distal, amb l'única excepció del grup DMH-àcid maslínic 10



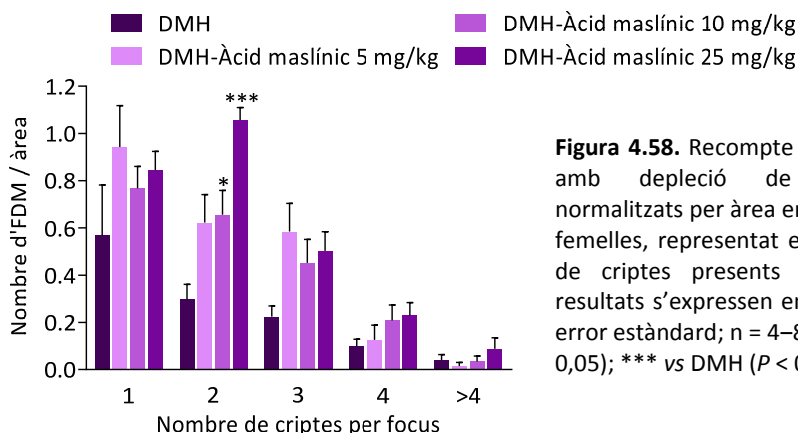
**Figura 4.56.** Recompte dels focus de criptes amb depleció de mucines (FDM), normalitzats per àrea, en el còlon total de les rates femelles. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 4-8$ /grup. \* vs DMH ( $P < 0,05$ ); \*\* vs DMH ( $P < 0,01$ ); \*\*\* vs DMH ( $P < 0,001$ ); § vs DMH-àcid maslínic 10 mg/kg ( $P < 0,05$ ).

mg/kg, en el qual el nombre d'FDM/àrea és notablement superior en el medial. A més, en aquest segment, les diferències entre el grup DMH i els grups DMH-àcid maslínic 5 i 10 mg/kg són més acusades que en còlon total ( $P < 0,01$  i  $P < 0,001$ , respectivament), mentre que ocorre el contrari en el grup que ha rebut la dosi major ( $P < 0,01$ ). Pel que fa el segment distal, només s'observen diferències entre el grup induït i el grup tractat amb 25 mg/kg del triterpè ( $P < 0,01$ ) (Figura 4.57).



**Figura 4.57.** Recompte dels focus de criptes amb depleció de mucines (FDM) normalitzats per àrea en els diferents segments del còlon de les rates femelles. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 4-8$ /grup. \* vs DMH ( $P < 0,05$ ); \*\* vs DMH ( $P < 0,01$ ); \*\*\* vs DMH ( $P < 0,001$ ); § vs DMH-àcid maslínic 10 mg/kg ( $P < 0,05$ ).

**Multiplicitat.** Finalment, en la representació del recompte d'FDM segons el nombre de criptes en cada focus es manté el patró observat en tots els altres recomptes, alhora que el grup DMH segueix sent el que presenta un menor nombre d'FDM/àrea (Figura 4.58). Les diferències són estadísticament significatives a nivell dels focus de dues criptes entre el grup induït i els grups tractats amb àcid maslínic 10 mg/kg ( $P < 0,05$ ) i amb àcid maslínic 25 mg/kg ( $P < 0,001$ ).



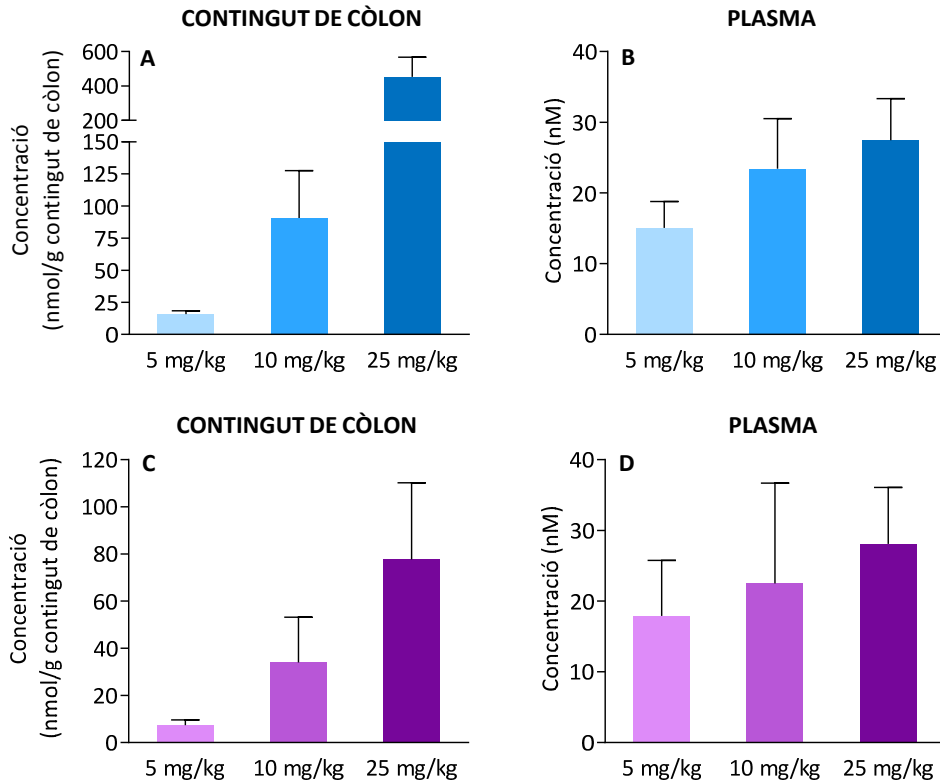
**Figura 4.58.** Recompte dels focus de criptes amb depleció de mucines (FDM) normalitzats per àrea en el còlon de les rates femelles, representat en funció del nombre de criptes presents en cada lesió. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 4-8$ /grup. \* vs DMH ( $P < 0,05$ ); \*\*\* vs DMH ( $P < 0,001$ ).

#### 4.6.6. Determinació de l'àcid maslínic en el contingut de còlon i en el plasma

L'àcid maslínic s'ha determinat en el contingut del còlon i el plasma d'aquells animals als quals s'han induït lesions amb DMH i que alhora han estat tractats amb àcid maslínic, a fi de poder correlacionar l'efecte del triterpè amb la concentració que ha assolit en el teixit diana i en la sang.

En mascles, la concentració d'àcid maslínic en contingut de còlon ha incrementat d'acord amb la dosi, de manera que s'ha trobat una mitjana de  $15,8 \pm 2,54$  nmol/g,  $90,7 \pm 36,9$  nmol/g i  $453,6 \pm 114,3$  nmol/g d'àcid maslínic en els animals que han rebut el triterpè a 5, 10 i 25 mg/kg, respectivament (Figura 4.59.A). Pel que fa el plasma, tot i que la concentració del compost ha estat notablement menor respecte les anteriors, també ha augmentat en paral·lel amb la dosi administrada, amb valors de  $15,1 \pm 3,7$  nM,  $23,4 \pm 7,1$  nM i  $27,5 \pm 7,9$  nM, respectivament (Figura 4.59.B).

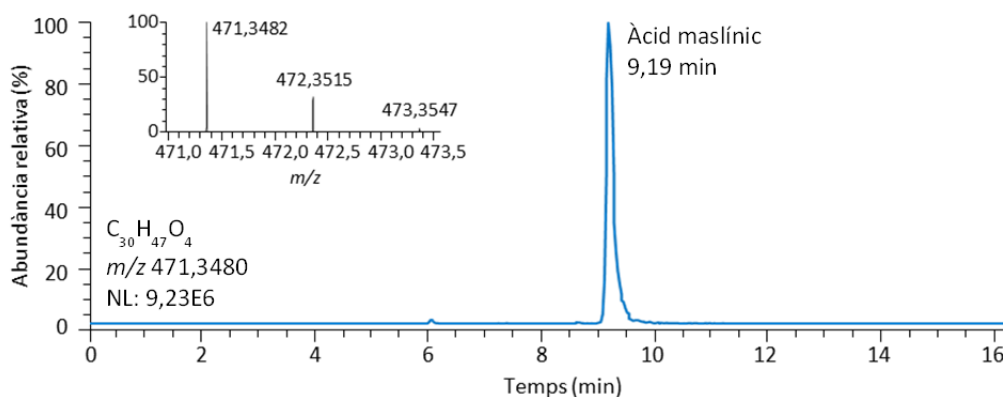
En femelles, la concentració d'àcid maslínic ha seguit una tendència similar a les anteriors, tant en el contingut del còlon com en el plasma. En la primera matriu, però, la concentració d'àcid maslínic ha estat marcadament inferior a l'observada en els mascles a les tres dosis (5, 10 i 25 mg/kg), amb mitjanes de  $7,32 \pm 2,28$  nmol/g,  $34,0 \pm 19,2$  nmol/g i  $77,6 \pm 32,5$  nmol/g, respectivament (Figura 4.59.C). En canvi, en el plasma s'han trobat concentracions del triterpè molt semblants a les determinades en els mascles, amb valors de  $17,9 \pm 7,9$  nM,  $22,5 \pm 14,2$  nM i  $28,1 \pm 8,0$  nM (Figura 4.59.C).



**Figura 4.59.** Concentracions d'àcid maslínic en el contingut del còlon i en el plasma de les rates mascles (A i B) i de les rates femelles (C i D) incloses en l'estudi de l'activitat quimiopreventiva del triterpè. Les mostres s'han obtingut 24 h després de la darrera administració de l'àcid maslínic.

#### 4.6.6.1. Identificació dels metabòlits de l'àcid maslínic en el contingut del còlon

Per a la identificació dels metabòlits de l'àcid maslínic en el contingut del còlon s'han emprat mostres obtingudes de rates del grup àcid maslínic 10 mg/kg que s'han analitzat per HPLC-ACPI-LTQ-Orbitrap-MS. Abans, però, la injecció d'un patró ha permès establir el temps de retenció de l'anàlit (9,19 min) i determinar-ne la massa exacta ( $m/z$  de 471,3480) amb un error de 0,49 mDa. En l'espectre de masses del triterpè s'ha observat la molècula desprotonada i sense fragmentar (Figura 4.60). Per a cada metabòlit s'ha comprovat que en contingut de còlon blanc, procedent de rates que no han rebut àcid maslínic, no hi hagi pics als respectius temps de retenció.



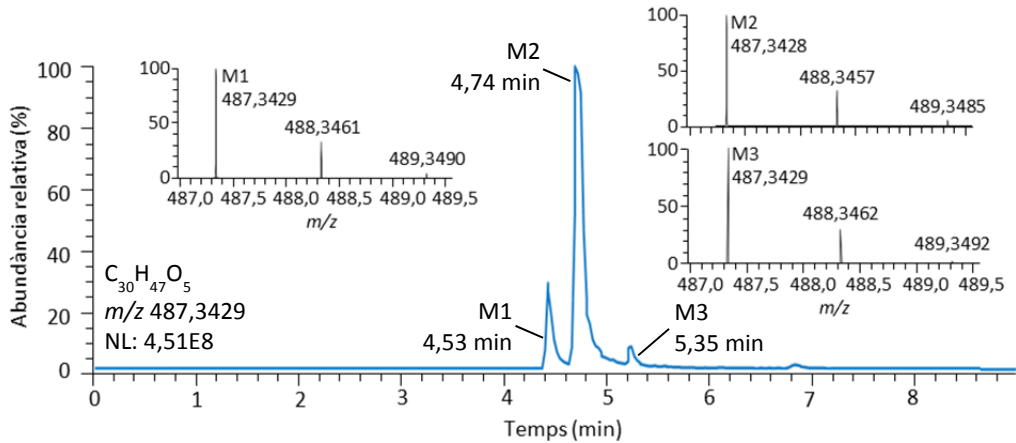
**Figura 4.60.** Cromatograma corresponent a l' $m/z$  de l'àcid maslínic (471,3) obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS després de l'anàlisi d'una mostra de contingut de còlon procedent d'una rata la qual se li ha administrat el triterpè a una dosi de 10 mg/kg per via oral durant 49 dies. L'insert mostra la distribució isotòpica del compost.

La identificació dels metabòlits en aquestes mostres s'ha realitzat seguint les pautes establertes anteriorment (apartat 4.4.2). De nou, els derivats han presentat uns canvis de massa de  $-2$ ,  $+14$ ,  $+16$ ,  $+30$  i  $+32$  Da, tots ells resultants de reaccions de fase I, i no s'han trobat metabòlits conjugats.

##### a) M1 – M3 ( $m/z$ 487,3)

En les mostres de contingut de còlon s'han trobat tres metabòlits de l'àcid maslínic amb una  $m/z$  (formes desprotonades) de 487,3 i uns temps de retenció de 4,53 min, 4,74 min i 5,35 min, tots ells anteriors al de l'àcid maslínic (Figura 4.61). La fórmula molecular predita d'aquests compostos ( $C_{30}H_{48}O_5$ ) i l'increment de massa respecte la molècula original (15,9949 Da) indiquen que els derivats es poden haver format per la incorporació d'un grup hidroxil.

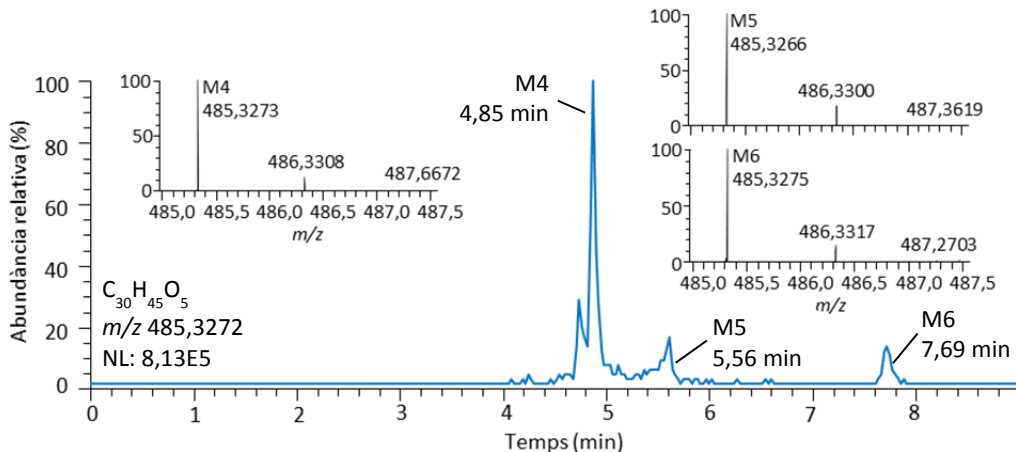
L'error en la mesura de la massa s'ha trobat entre  $-0,04$  mDa i  $1,07$  mDa. En l'espectre de cadascun d'ells s'ha observat una distribució isotòpica similar a la teòrica.



**Figura 4.61.** Cromatograma corresponent a l' $m/z$  de 487,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS després de l'anàlisi d'una mostra de contingut de còlon procedent d'una rata la qual se li ha administrat el triterpè a una dosi de 10 mg/kg per via oral durant 49 dies. Els inserts mostren la distribució isotòpica de cadascun dels compostos identificats com a metabòlits de l'àcid maslínic.

#### b) M4 – M6 ( $m/z$ 485,3)

També s'han identificat tres metabòlits amb una  $m/z$  de 485,3 i uns temps de retenció de 4,85 min, 5,56 min i 7,69 min (Figura 4.62). La fórmula molecular predita ha estat  $C_{30}H_{46}O_5$  i la massa ha incrementat en 13,9792 Da respecte la del compost original, per la qual cosa aquesta biotransformació es pot atribuir a una hidroxilació i una deshidrogenació de la molècula de l'àcid maslínic.



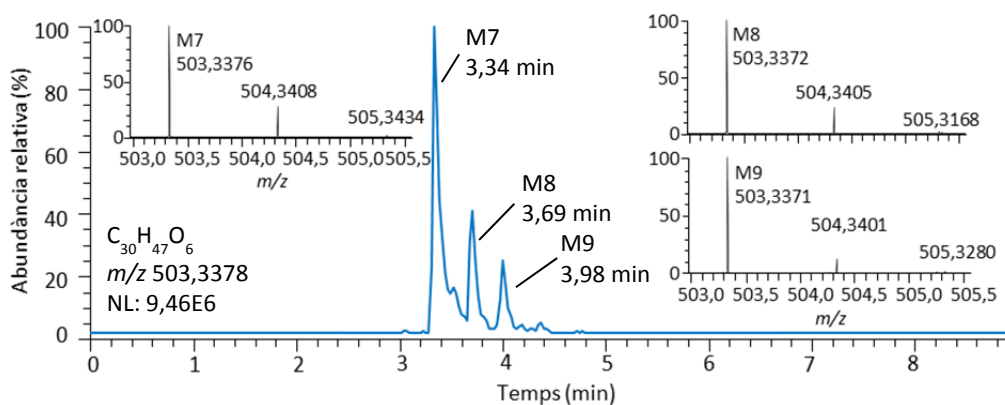
**Figura 4.62.** Cromatograma corresponent a l' $m/z$  de 485,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS després de l'anàlisi d'una mostra de contingut de còlon procedent d'una rata la qual se li ha administrat el triterpè a una dosi de 10 mg/kg per via oral durant 49 dies. Els inserts mostren la distribució isotòpica de cadascun dels compostos identificats com a metabòlits de l'àcid maslínic.

L'error de les masses mesurades respecte les teòriques ha estat en tots els casos inferior a 0,5 mDa. Els espectres corresponents han mostrat distribucions isotòpiques pràcticament idèntiques a les esperades.

### c) M7 – M9 ( $m/z$ 503,3)

En els cromatogrames corresponents a l' $m/z$  de 503,3 s'han trobat també tres pics, a uns temps de retenció de 3,34 min, 3,69 min i 3,98 min (Figura 4.63) i per als quals s'ha predit la fórmula molecular  $C_{30}H_{48}O_5$ . La massa d'aquests compostos, 31,9898 Da més elevada que la de l'àcid maslínic, suggereix la incorporació de dos grups hidroxil.

La distribució isotòpica de cada derivat ha presentat un perfil similar al de la distribució isotòpica teòrica. La diferència entre les masses observades i les esperades dels derivats M7, M8 i M9 ha estat de 0,43 mDa, 0,14 mDa i 0,01 mDa, respectivament.



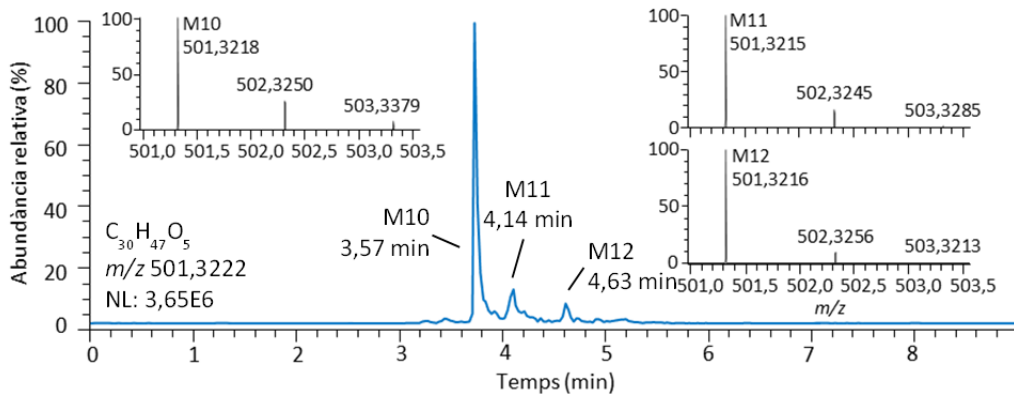
**Figura 4.63.** Cromatograma corresponent a l' $m/z$  de 503,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS després de l'anàlisi d'una mostra de contingut de còlon procedent d'una rata la qual se li ha administrat el triterpè a una dosi de 10 mg/kg per via oral durant 49 dies. Els inserts mostren la distribució isotòpica de cadascun dels compostos identificats com a metabòlits de l'àcid maslínic.

### d) M10 – M12 ( $m/z$ 501,3)

També s'han identificat tres derivats amb una  $m/z$  de 501,3 i uns temps de retenció de 3,57 min, 4,14 min i 4,63 min (Figura 4.64). Donat l'increment de massa (29,9442 Da) i la fórmula molecular predita ( $C_{30}H_{46}O_6$ ), aquests derivats es poden atribuir a la incorporació de dos grups hidroxil i una deshidrogenació de l'àcid maslínic.

Els errors en la mesura de les masses han estat de -0,47 mDa (ppm), -1,36 mDa (ppm) i -0,62 mDa (ppm) per als metabòlits M10, M11 i M12, respectivament, i els espectres corresponents han mostrat una distribució isotòpica correcta.

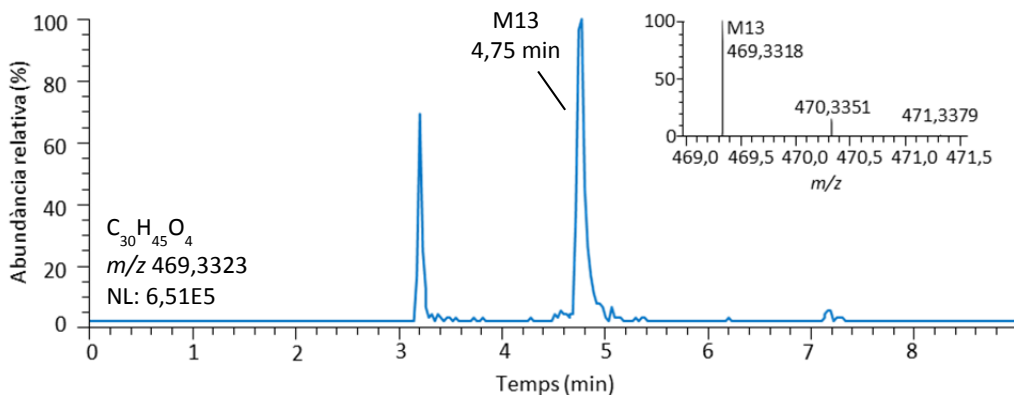




**Figura 4.64.** Cromatograma corresponent a l' $m/z$  de 501,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS després de l'anàlisi d'una mostra de contingut de còlon procedent d'una rata la qual se li ha administrat el triterpè a una dosi de 10 mg/kg per via oral durant 49 dies. Els inserts mostren la distribució isotòpica de cadascun dels compostos identificats com a metabòlits de l'àcid maslínic.

### e) M13 ( $m/z$ 469,3)

Per últim, també s'ha trobat un derivat amb una  $m/z$  de 469,3 i un temps de retenció de 4,75 min (Figura 4.65). Aquest compost s'ha atribuït a una deshidrogenació de la molècula d'àcid maslínic, en tant que mostra una disminució de la massa de 2,0157 Da i una fórmula molecular  $C_{30}H_{46}O_4$ . L'error en la identificació d'aquest metabòlit ha estat de 0,40 mDa i en distribució isotòpica s'ha observat el perfil esperat.



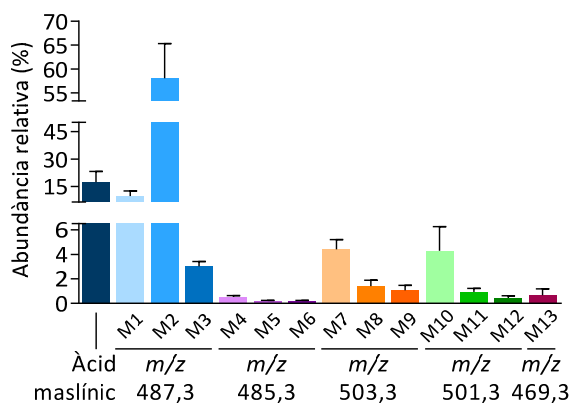
**Figura 4.65.** Cromatograma corresponent a l' $m/z$  de 469,3 obtingut per HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS després de l'anàlisi d'una mostra de contingut de còlon procedent d'una rata la qual se li ha administrat el triterpè a una dosi de 10 mg/kg per via oral durant 49 dies. Els inserts mostren la distribució isotòpica de cadascun dels compostos identificats com a metabòlits de l'àcid maslínic.

A la Taula 4.17 es resumeixen tots els metabòlits de l'àcid maslínic identificats, així com també el temps de retenció, la fórmula molecular, la massa exacta i l'error, és a dir, la diferència entre la massa exacta i la massa mesurada (en mDa i en ppm), de cadascun d'ells.

**Taula 4.17.** Metabòlits de l'àcid maslínic identificats mitjançant HPLC-APCI-LTQ-Orbitrap-MS en el contingut del còlon després de l'administració diària del triterpè a una dosi de 10 mg/kg durant 49 dies. En els encapçalaments, entre parèntesi, s'indiquen la fórmula molecular i la massa teòrica ( $m/z$ ).

	Temps de retenció (min)	Massa mesurada ( $m/z$ )	Error	
			mDa	Ppm
<b>Àcid maslínic (<math>C_{30}H_{48}O_4</math>, 487,3429)</b>				
Àcid maslínic	9,19	471,3480	0,49	0,06
<b>Metabòlits monohidroxilats (<math>C_{30}H_{48}O_5</math>, 487,3429)</b>				
M1	4,53	487,3426	-0,09	-0,56
M2	4,74	487,3427	0,28	-0,31
M3	5,35	487,3428	1,07	-0,25
<b>Metabòlits monohidroxilats i deshidrogenats (<math>C_{30}H_{46}O_5</math>, 485,3272)</b>				
M4	4,85	485,3273	0,33	0,17
M5	5,56	485,3270	0,19	-0,56
M6	7,69	485,3271	0,41	-0,24
<b>Metabòlits dihidroxilats (<math>C_{30}H_{48}O_6</math>, 503,3378)</b>				
M7	3,34	503,3378	0,43	-0,03
M8	3,69	503,3375	0,14	-0,84
M9	3,98	503,3373	0,01	-1,08
<b>Metabòlits dihidroxilats i deshidrogenats (<math>C_{30}H_{46}O_6</math>, 501,3222)</b>				
M10	3,57	501,3219	0,33	-0,47
M11	4,14	501,3216	0,05	-1,20
M12	4,63	501,3218	0,19	-0,62
<b>Metabòlit deshidrogenat (<math>C_{30}H_{46}O_4</math>, 469,3323)</b>				
M13	4,75	469,3320	0,40	-0,66

L'abundància relativa dels diferents metabòlits es mostra en la Figura 4.66. El metabòlit monohidroxilat M2 ha estat el majoritari, en una proporció del  $58,1 \pm 2,4\%$ , seguit de l'àcid maslínic i del derivat M1, que han representat al voltant d'un 15% i un 10%, respectivament. L'abundància relativa de la resta de compostos ha estat inferior al 5%, però destaquen l'M3 (3%), el derivat dihidroxilat M7 (4%) i el metabòlit M10, resultant d'una doble hidroxilació i una deshidrogenació (4%).



**Figura 4.66.** Abundància relativa de l'àcid maslínic i els metabòlits identificats en el contingut del còlon de rates que han rebut el triterpè (10 mg/kg) per via oral durant 49 dies. Els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  error estàndard;  $n = 2$ /metabòlit.



**DISCUSSIÓ**



L'àcid maslínic és un metabòlit secundari pertanyent al grup de triterpens pentacíclics que s'ha aïllat d'una gran varietat d'espècies vegetals, incloent plantes usades com a remeis en medicina tradicional asiàtica i també fonts alimentàries, com són fruites, verdures i llegums de consum habitual en la dieta mediterrània. En el decurs de les darreres dècades hi ha hagut un interès creixent per aquest compost a mesura que se li han anat atribuint efectes biològics diversos, des d'antitumoral, antidiabètic i antioxidant fins neuroprotector, antiparasitari i estimulant del creixement, entre altres (Lozano-Mena *et al.*, 2014; veure Annex I). La major part d'aquestes activitats s'han posat de manifest en cultius cel·lulars, fet que ha permès aprofundir en els mecanismes d'acció de l'àcid maslínic, però també hi ha algunes evidències en models animals. Tot i així, en el moment de l'inici de la tesi no existia cap estudi que demostrés que l'administració d'aquest compost no té efectes adversos.

Per aquest motiu, el primer objectiu que s'ha plantejat ha estat avaluar la toxicitat aguda i subaguda de l'àcid maslínic, seguint les recomanacions de l'OECD (2008). Per a la toxicitat aguda s'ha administrat per via oral una dosi única d'1 g/kg del triterpè a ratolins Swiss CD-1, que s'han mantingut en observació durant els 14 dies següents. En el decurs del període experimental no s'han observat alteracions en el pes corporal ni anomalies en l'estat general i el comportament dels animals. En la necròpsia, l'examen macroscòpic dels principals òrgans no ha evidenciat efectes nocius derivats de l'administració d'una dosi elevada d'àcid maslínic. Aquests resultats concorden amb els descrits per a l'àcid oleanòlic i l'àcid ursòlic, uns altres triterpens pentacíclics que van ser administrats a una dosi de 2 g/kg a ratolins BALB/c sense conseqüències negatives (Da Silva Ferreira *et al.*, 2010).

A continuació s'ha dut a terme l'estudi de la toxicitat subaguda, en el qual l'àcid maslínic s'ha administrat oralment a una dosi de 50 mg/kg a ratolins de la mateixa soca durant 28 dies. En l'elecció de la dosi s'ha tingut en compte que les olives i l'oli d'oliva són les fonts d'àcid maslínic més habitualment consumides en els països de la conca mediterrània. S'estima que diàriament es consumeixen unes 10 olives mitjanes (40 g) i uns 33 g d'oli d'oliva; d'altra banda, la concentració de l'àcid maslínic en aquests aliments es troba al voltant de 553 mg/kg (Romero *et al.*, 2010) i de 194 mg/kg (Pérez-Camino i Cert, 1999), respectivament. Així, doncs, en aquestes condicions la ingesta diària del compost és d'aproximadament 0,4 mg/kg i la dosi emprada en el present estudi (50 mg/kg) és uns 125 cops superior.

Al llarg del tractament amb àcid maslínic no s'han registrat alteracions de l'estat general ni el comportament dels animals. Si bé el consum d'aigua no ha diferit respecte el del grup control, el consum de pinso ha estat un 13% inferior, efecte que també ha estat observat en experiments amb altres models animals. En ratolins KK-A<sup>Y</sup>, un model de diabetis tipus 2, es va observar que l'administració oral del triterpè a dosis de 10 i 30 mg/kg durant dues setmanes resultava en una menor ingesta de pinso, concretament del 28% i 34%, respectivament (Liu *et al.*, 2007a). En dorades alimentades amb pinso enriquit amb àcid maslínic (100 mg/kg pinso) el consum també

es va trobar disminuït (18%) respecte els animals que no havien rebut el triterpè. Tot i la menor ingesta associada al tractament amb àcid maslínic en el nostre estudi aquest fet no ha repercutit en el creixement dels ratolins, ja que no s'han observat diferències en el pes corporal respecte els animals control. En la literatura no hi ha dades sobre l'efecte del triterpè en ratolins sans, l'única informació descrita correspon a models animals en els quals el pes corporal és una variable (Liu *et al.*, 2007a; Li *et al.*, 2010). En canvi, en altres espècies sí que existeixen dades relatives a l'efecte de l'àcid maslínic sobre el pes corporal. En rates de la soca Wistar, per exemple, l'administració del compost durant una setmana a una dosi de 15 mg/kg no va modificar-ne el pes (Hussain-Shaik *et al.*, 2012). D'altra banda, en peixos s'ha observat que l'alimentació amb pinso enriquit amb àcid maslínic estimula notablement el creixement dels animals, per la qual cosa el triterpè s'ha proposat com a additiu en aqüicultura per augmentar la taxa de producció (Fernández-Navarro *et al.*, 2008; Rufino-Palomares *et al.*, 2011). En truites de riu, l'alimentació amb dietes suplementades amb àcid maslínic a 25 i 250 mg/kg pinso al llarg de 225 dies va resultar en increments del pes corporal del 19% i 29%, respectivament (Fernández-Navarro *et al.*, 2008). Aquest fet es va atribuir a un augment del pes del múscul blanc, que es va correlacionar amb una hipertròfia d'aquest teixit mediada per un increment del contingut proteic, així com també del contingut d'ADN i ARN. En un experiment similar en dorades, que van ser alimentades amb pinso enriquit amb àcid maslínic (100 mg/kg pinso) durant 210 dies, també es va observar un augment del pes corporal al final del tractament respecte els animals control, si bé en aquest cas tan sols va ser del 5% (Rufino-Palomares *et al.*, 2011).

En l'estudi de la toxicitat subaguda de l'àcid maslínic l'administració oral repetida (50 mg/kg) tampoc no ha alterat les variables hematològiques ni bioquímiques determinades al final del període experimental (28 dies). El recompte dels diferents tipus cel·lulars, és a dir, eritròcits, leucòcits i plaquetes, així com també la determinació de l'hematòcrit i la concentració d'hemoglobina, entre altres, no han mostrat diferències respecte els dels animals control. De manera similar, l'anàlisi de les variables bioquímiques ha posat de manifest que l'àcid maslínic no afecta el perfil lipídic dels animals, en tant que la concentració de colesterol total, colesterol-HDL i triglicèrids han estat semblants a les dels ratolins que han rebut el vehicle. Per contra, el triterpè va normalitzar els valors d'aquestes variables, així com també del colesterol-LDL, en rates Sprague-Dawley alimentades amb una dieta rica en colesterol, després de l'administració del compost per via oral a una dosi de 100 mg/kg durant 15 dies (Liu *et al.*, 2007b). En aquest estudi, a més, es va investigar el mecanisme d'acció de l'àcid maslínic i es va observar que disminuïa l'expressió del gen codificant per a l'acil-CoA colesterol aciltransferasa, responsable de l'esterificació del colesterol per al seu emmagatzematge (Chang *et al.*, 2009). En el nostre estudi la funció hepàtica i renal també s'han trobat intactes després de tractament amb àcid maslínic, tal com ha evidenciat la determinació dels corresponents marcadors. Aquests resultats coincideixen amb els observats per Liu *et al.* (2007b), en els quals els nivells d'aspartat aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), lactat deshidrogenasa (LDH), fosfatasa

alcalina (ALP), creatinina i urea no van mostrar diferències respecte els de les rates control. La concentració de glucosa en dejú també ha estat semblant entre ambdós grups experimentals, fet que concorda amb les observacions de Tang *et al.* (2008) en ratolins sans als quals es va administrar àcid maslínic a dosis de 25, 50 i 100 mg/kg durant 7 dies. Malgrat això, en diferents models animals de diabetis s'ha descrit que l'àcid maslínic exerceix un efecte hipoglucemiant (Wen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007a; Khathi *et al.*, 2013).

També s'han examinat els principals òrgans dels animals inclosos en l'estudi de la toxicitat subaguda de l'àcid maslínic, a fi de determinar si el triterpè indueix alteracions en la seva estructura. En primer lloc se n'ha determinat el pes humit, que s'ha trobat incrementat per al fetge (6%,  $P > 0,05$ ) i per al cervell (11%,  $P < 0,01$ ). Mentre que el primer efecte podria relacionar-se amb una lleugera hiperplàsia, tal com s'ha descrit en les truites de riu (Fernández-Navarro *et al.*, 2006), el segon rarament s'associa amb neurotoxicitat (Sellers *et al.*, 2007) i, de fet, podria obrir un camí sobre la possible activitat neuroprotectora d'aquest triterpè pentacíclic (Guan *et al.*, 2011; Qian *et al.*, 2011a; Qian *et al.*, 2011b). L'examen histopatològic de seccions tenyides amb hematoxilina/eosina ha confirmat l'absència d'efectes adversos derivats de l'exposició a l'àcid maslínic. L'observació al microscopi òptic ha revelat una arquitectura hepàtica normal, que combinada amb la concentració sèrica inalterada d'ALT prèviament determinada corrobora la manca d'alteracions hepàtiques derivades del tractament amb el triterpè. De manera similar, també s'ha descartat que el compost indueixi nefrotoxicitat, en tant que les estructures renals s'han trobat inalterades i la concentració sèrica de creatinina ha estat un 26% inferior respecte la del grup no tractat ( $P > 0,05$ ). En la melsa de tots els animals també s'han observat fol·licles limfoides i sinus normals, fet que concorda amb l'absència d'alteracions en les variables hematològiques analitzades.

Tots els resultats derivats de l'estudi de la toxicitat de l'àcid maslínic han estat publicats en l'article de Sánchez-González *et al.* (2013), de la qual és coautora la signant d'aquesta tesi (veure Annex I).

La manca d'efectes adversos sobre les diferents variables estudiades indica que l'administració d'àcid maslínic per via oral, ja sigui a una dosi única i elevada (1 g/kg) o bé una dosi diària (50 mg/kg) al llarg de quatre setmanes, té un ampli marge de seguretat. Així, aquests resultats constitueixen el punt de partida per al desenvolupament dels següents objectius de la present memòria, amb la finalitat que l'àcid maslínic pugui considerar-se un ingredient funcional i/o un nutricional.

A més de l'absència d'informació sobre la seguretat de l'àcid maslínic *in vivo* a l'inici de la tesi es desconeixia el comportament d'aquest compost en l'organisme després de la seva administració oral, és a dir, aspectes com l'absorció intestinal o les concentracions que s'assoleixen en plasma i en la llum intestinal, que alhora poden servir per establir correlacions amb els efectes biològics observats en models animals. Aquest desconeixement es devia, en



part, al fet que no es disposava de cap mètode analític per determinar el compost en fluids biològics, per la qual cosa el segon objectiu que s'ha plantejat ha estat desenvolupar un mètode per determinar l'àcid maslínic en plasma. Diversos estudis l'han quantificat en plantes i aliments mitjançant cromatografia de gasos (GC), en alguns casos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS) (Pérez-Camino i Cert, 1999; Guinda *et al.*, 2010; Kalogeropoulos *et al.*, 2010; Caligiani *et al.*, 2013). Però la baixa volatilitat i l'elevat pes molecular dels triterpens pentacíclics impedeixen la injecció directa al cromatògraf, per la qual cosa és necessària una etapa prèvia de derivatització que tradicionalment s'ha dut a terme per reaccions de silació (Bianchi *et al.*, 1994; Pérez-Camino i Cert, 1999). Aquest pas, però, presenta diferents desavantatges, com són una major durada del procés de tractament de les mostres i un increment de l'ús de reactius i materials, fet que es tradueix en un augment del cost de l'anàlisi. Per a l'anàlisi de molècules no volàtils, com és l'àcid maslínic, la cromatografia de líquids constitueix una alternativa apropiada, ja que no requereix derivatització (Rhourri-Frih *et al.*, 2009). En la present tesi s'ha emprat la tècnica de cromatografia de líquids d'alta eficàcia (HPLC), comuna en molts laboratoris ja que proporciona anàlisis ràpides i assequibles amb una separació satisfactòria dels components de les mostres i una correcta identificació i quantificació. De fet, l'HPLC ja ha estat usada per a la determinació de l'àcid maslínic i l'àcid oleanòlic en olives (Romero *et al.*, 2010; Peragón, 2013). Per al desenvolupament del mètode analític en primer lloc s'han posat a punt les condicions cromatogràfiques. S'ha emprat un detector de díodes UV-visible, ja que la longitud d'ona de màxima absorbància de l'àcid maslínic ha estat de 200 nm. En general els triterpens pentacíclics no tenen grups cromòfors en la seva estructura, com poden ser dobles enllaços conjugats, de manera que solen presentar una baixa absorbància a la llum UV. Per això, la longitud d'ona de lectura del detector ha estat una de les variables optimitzades, així com també la fase mòbil, pel que fa la composició, el tipus d'elució i el flux, i la temperatura de la columna. L'instrument s'ha validat seguint les directrius establertes en *The United States Pharmacopeia and The National Formulary* (2008) i s'ha vist que és lineal des de 0,25 µM fins a 1000 µM i que presenta un límit de quantificació (LOQ) d'aproximadament 0,1 µM. Seguidament s'ha posat a punt un procés d'extracció de l'àcid maslínic de plasma. L'extracció d'anàlits de matrius biològiques té per objectiu aïllar al màxim possible els compostos d'interès de la resta de components, a fi de minimitzar les interferències en la determinació. Habitualment l'extracció d'àcids triterpènics de plasma es realitza per mitjà d'extraccions líquid-líquid amb solvents de caràcter molt apolar, immiscibles amb l'aigua, que posteriorment són evaporats a sequedat (Udeani *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008; Rada *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2011). Un cop eliminat el solvent el residu és reconstituït en un solvent també orgànic però miscible amb l'aigua, ja que l'anàlisi per HPLC implica que les mostres s'incorporin a la fase mòbil. El solvent majoritàriament usat és l'acetat d'etil, tal com s'ha fet per a 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 diclorometà s'ha aplicat per a

l'extracció de l'àcid betulínic i l'àcid 23-hidroxibetulínic de plasma (Udeani *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2005). Altres solvents que també s'han emprat són el dietilèter per extreure l'àcid ursòlic, l'àcid betulínic i l'àcid oleanòlic en un mateix experiment (Rada *et al.*, 2011), el metil-tert-butilèter per a l'àcid oleanòlic (Jeong *et al.*, 2007) i l'acetonitril per a l'àcid betulínic (Cheng *et al.*, 2003). En el present estudi l'extracció de l'àcid maslínic del plasma s'ha realitzat per mitjà d'una estratègia líquid-líquid amb acetat d'etil seguit d'evaporació a sequedat i reconstitució amb metanol al 75%. El procediment d'extracció ha de permetre recuperar un percentatge elevat de la quantitat total de l'anàlit de les mostres, idealment superior al 95% (Bansal i DeStefano, 2007). En aquest sentit, el mètode desenvolupat ha proporcionat una recuperació mitjana d'un  $98,8 \pm 7,4\%$ . Aquest paràmetre de validació s'ha avaluat a sis concentracions diferents (1; 2,5; 5; 10; 15 i 25  $\mu\text{M}$ ) a fi d'assegurar que el mètode és adient per a concentracions tant altes com baixes. A més, la precisió intradia i interdia, expressades com a coeficient de variació, han estat inferiors al 6% i 10%, respectivament, indicatiu que el mètode és precís, ja que s'estableix que aquest paràmetre sigui inferior al 15% (Bansal i DeStefano, 2007). El mètode també és lineal en el rang de 0,5  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$  i selectiu, ja que en els cromatogrames de plasma blanc, és a dir, sense àcid maslínic, no s'ha observat cap altre pic al temps de retenció de l'anàlit. Per últim, la sensibilitat s'ha avaluat per mitjà del límit de detecció (LOD) i el LOQ, que han estat de 0,02  $\mu\text{M}$  i 0,32  $\mu\text{M}$ , respectivament. Aquesta sensibilitat és similar a la descrita per Sánchez-Ávila *et al.* (2009) per a la determinació dels àcids maslínic, oleanòlic i ursòlic, així com també per als alcohols eritrodíol i uvaol en les fulles de l'olivera mitjançant HPLC acoblada a espectrometria de masses (HPLC-MS). En aquest cas, els LOQ es van trobar entre 0,19  $\mu\text{M}$  i 0,65  $\mu\text{M}$ . Altres mètodes de GC per a la quantificació de triterpens pentacíclics han mostrat sensibilitats molt menors, com per exemple el LOQ de 32  $\mu\text{M}$  per a la determinació de triterpens pentacíclics en olives i fulles d'olivera per mitjà de GC amb detector de ionització de flama (GC-FID) (Guinda *et al.*, 2010) o el LOQ de 21  $\mu\text{M}$  per a la determinació d'àcids triterpènics en extractes de plantes emprats com a complementos dietètics (Caligiani *et al.*, 2013).

El mètode analític desenvolupat per a la quantificació de l'àcid maslínic en el plasma és adequat per a la seva aplicació a mostres biològiques i ha estat publicat en l'article de Lozano-Mena *et al.* (2012) (veure Annex I).

Així, doncs, a continuació s'ha emprat per determinar les concentracions plasmàtiques del triterpè després de la seva administració (50 mg/kg) per via oral a rates Sprague-Dawley. El mètode ha permès quantificar el compost en totes les mostres, obtingudes a diferents temps fins als 60 min. Alhora, l'aparició en plasma és indicativa que el triterpè és absorbit a nivell intestinal i que assoleix la circulació sanguínia. Les dades de concentracions plasmàtiques en funció del temps s'han analitzat mitjançant el programa WinNonLin, que ha permès obtenir una primera aproximació a la farmacocinètica de l'àcid maslínic. En primer lloc, les dades s'han analitzat mitjançant un mètode no compartimental, que proporciona una descripció dels esdeveniments observats en una situació i un individu concrets, és a dir, sense ajustar els valors

a una funció matemàtica. D'aquesta manera no és possible predir el que succeiria en escenaris no assajats (Domènech *et al.*, 2013). Aquesta aproximació ha servit de punt de partida per a la realització d'anàlisis compartimentals, en els quals les dades experimentals s'ajusten a una funció matemàtica, més o menys complexa, que permet explicar el comportament del compost en l'organisme. L'obtenció d'un model farmacocinètic és útil per predir el que tindria lloc en situacions no assajades experimentalment, com per exemple en altres temps de presa de mostra o canvis que es produirien en les concentracions plasmàtiques del compost si s'administrés una dosi diferent (Domènech *et al.*, 2013). Les anàlisis compartimentals es basen en considerar l'organisme com un sistema format per un o diversos compartiments de distribució homogènia. Els més habituals són els models d'un o dos compartiments, anomenats mono- o bicompartimentals, respectivament. En el present estudi el millor ajust de les concentracions plasmàtiques d'àcid maslínic en funció del temps s'ha obtingut per a un model monocompartimental en el qual s'assumeix que l'entrada i la sortida de l'organisme segueixen una cinètica lineal o d'ordre 1 i que el compost es distribueix homogèniament per tot l'organisme. Entre altres paràmetres farmacocinètics estimats destaca la concentració màxima assolida en plasma ( $C_{max}$ ), de  $3,74 \mu\text{M}$ , i el temps en el qual es produeix aquest pic ( $T_{max}$ ), de 18,0 min, indicatius que el triterpè presenta una absorció baixa però força ràpida. Donat que no s'ha disposat de dades obtingudes després de l'administració intravenosa, no ha estat possible calcular la biodisponibilitat i els valors del volum de distribució i l'aclariment són aparents.

En la literatura només s'ha trobat un altre estudi en el qual s'ha determinat l'àcid maslínic en plasma, si bé el disseny experimental va ser diferent. El triterpè es va incorporar a la dieta de ratolins durant 4 o 8 setmanes i només en els animals tractats durant el període més llarg es va trobar l'àcid maslínic en plasma, a una concentració d'aproximadament  $1 \mu\text{M}$  (Yin *et al.*, 2012). En l'article la informació sobre la validació del mètode analític és escassa, tan sols s'hi indica que el límit de detecció era de  $0,21 \mu\text{M}$ , que és 10 vegades més gran que el del mètode descrit en la present memòria. En canvi, les concentracions plasmàtiques d'altres triterpens pentacíclics han estat més estudiades. La biodisponibilitat de l'àcid oleanòlic, per exemple, s'ha determinat en rates (Jeong *et al.*, 2007) i en humans (Song *et al.*, 2006). L'administració oral de  $50 \text{ mg/kg}$  d'àcid oleanòlic als animals va resultar en una  $C_{max}$  de  $0,29 \pm 0,27 \mu\text{M}$ , que és notablement inferior al trobat per a l'àcid maslínic a la mateixa dosi. En canvi, el  $T_{max}$  va ser de  $21,0 \pm 17,0 \text{ min}$ , similar a l'obtingut en el present estudi. Els autors indiquen que l'àcid oleanòlic va ser absorbit mínimament, amb una biodisponibilitat oral absoluta del 0,7% (Jeong *et al.*, 2007). D'altra banda, l'administració oral d'una dosi de  $40 \text{ mg}$  d'àcid oleanòlic a humans sans va proporcionar una  $C_{max}$  de  $26,5 \pm 15,0 \text{ nM}$  a les  $5,2 \pm 2,9 \text{ h}$  (Song *et al.*, 2006).

Posteriorment, amb l'objectiu d'aplicar el mètode analític per dur a terme un estudi complet de la farmacocinètica de l'àcid maslínic se n'ha incrementat l'especificitat i la sensibilitat tot substituint el detector de díodes-UV per un espectròmetre de masses de quadrupol senzill amb font de ionització a pressió atmosfèrica (APCI) (Sánchez-González *et al.*, 2013; veure Annex II).

La tècnica d'HPLC-MS es considera actualment la d'elecció per a l'anàlisi quantitativa de compostos en matrius biològiques (Van Eeckhaut *et al.*, 2009) i és adient per la determinació de triterpens pentacíclics (Rhourri-Frih *et al.*, 2009). Altres millores que s'han introduït respecte el mètode d'HPLC han estat la reducció del volum inicial de mostra o la disminució de la durada del programa d'elució. El nou mètode també ha estat validat satisfactòriament i s'ha aplicat no només per a l'estudi de la farmacocinètica poblacional de l'àcid maslínic (Sánchez-González *et al.*, 2014; veure Annex II), sinó també per a les determinacions en plasma que es presenten en aquesta tesi. És destacable que els resultats obtinguts en l'anàlisi farmacocinètica presentats anteriorment s'aproximen notablement als trobats en l'anàlisi farmacocinètica poblacional, en la qual s'ha estimat una  $C_{max}$  de 5,36  $\mu\text{M}$  i un  $T_{max}$  de 30,0 min. Cal tenir present que en el darrer cas els paràmetres s'han calculat a partir de les concentracions plasmàtiques obtingudes després de l'administració oral (50 mg/kg) i també intravenosa (1 mg/kg) de l'àcid maslínic, que l'interval de recollida de mostres s'ha allargat fins a les 6 h en la via intravenosa i fins a les 24 h en la via oral i que la tècnica emprada per a la determinació del triterpè ha estat l'HPLC-MS. A més, l'anàlisi de les dades mitjançant la farmacocinètica poblacional ha permès desenvolupar un model que representa una primera aproximació a la farmacocinètica de l'àcid maslínic que s'observaria en humans.

Les baixes concentracions plasmàtiques observades després de l'administració oral de l'àcid maslínic suggereixen que la biodisponibilitat d'aquest compost és limitada. Aquest fet pot estar relacionat, per una banda, amb un efecte de primer pas, és a dir, que sigui metabolitzat a nivell intestinal i/o hepàtic, la qual cosa evitaria que assolís la circulació sistèmica. D'altra banda, una absorció intestinal reduïda també explicaria l'escassa aparició de l'àcid maslínic en sang. En aquest cas, l'administració oral de l'àcid maslínic resultaria en elevades quantitats del triterpè a l'intestí, per la qual cosa podria tractar-se d'un òrgan diana en el qual exerciria una activitat protectora enfront del càncer de còlon (Juan *et al.*, 2008), tal com s'ha descrit per altres components bioactius del aliments, com és el *trans*-resveratrol (Juan *et al.*, 2012). A fi de quantificar l'àcid maslínic en el contingut intestinal, el següent objectiu plantejat en la present tesi doctoral ha estat posar a punt i validar un mètode analític per a la determinació del triterpè en aquesta matriu. Aprofitant que en aquest punt de la tesi ja s'havien optimitzat les condicions d'HPLC-MS per a la determinació de l'àcid maslínic en plasma, per a l'anàlisi del contingut intestinal també s'ha emprat aquesta tècnica. Un dels aspectes introduïts arrel de l'acoblament de l'espectròmetre de masses al cromatògraf ha estat l'ús de patró intern per a la quantificació de l'anàlit. Aquest mètode consisteix en afegir a totes les mostres la mateixa concentració d'un compost que presenti un comportament similar al de l'anàlit en l'instrument. La concentració de l'anàlit es calcula a partir de relació entre les àrees dels pics cromatogràfics de l'anàlit i del patró intern, que s'interpola en una recta patró. El principal avantatge d'aquest mètode és que s'eliminen els problemes de fluctuació de l'instrument i es minimitzen les conseqüències dels errors que es puguin produir durant el tractament de les mostres, ja que tant l'anàlit com el

patró intern experimenten les mateixes variacions (Hernández i González, 2002). El patró intern emprat per a la determinació de l'àcid maslínic en contingut intestinal ha estat l'àcid betulínic, un triterpè pentacíclic que ja ha estat usat per a la quantificació de l'àcid maslínic en olis vegetals (Pérez-Camino i Cert, 1999), en fulles d'olivera (Sánchez-Ávila *et al.*, 2009) i en plasma (Sánchez-González *et al.*, 2013; veure Annex II).

Pel que fa el procés de preparació de la mostra, l'extracció líquid-líquid permet obtenir extractes més nets i amb una major recuperació en comparació amb altres tècniques com la precipitació de proteïnes o l'extracció en fase sòlida (Van Eeckhaut *et al.*, 2009). En el present estudi l'extracció de l'àcid maslínic del contingut intestinal s'ha basat en la descrita per Espín *et al.* (2007), que van extreure urolitines de femtes mitjançant una barreja de metanol/àcid clorhídric/aigua (79,9:0,1:20). El procés consisteix en l'homogeneïtzació de les mostres en el solvent orgànic seguit de centrifugació, separació del sobrenedant i filtració abans de l'anàlisi per HPLC-MS. Per a l'àcid maslínic es van provar diferents solvents, el primer dels quals va ser l'acetat d'etil, ja que s'havia emprat anteriorment per a l'extracció del triterpè de plasma, si bé en aquest cas no es va aconseguir una homogeneïtzació adequada de les mostres. Per això, a continuació es va assajar el metanol, al 100% i al 80%, així com també amb diferents modificadors, tant àcids (àcid clorhídric) com bàsics (hidròxid sòdic). El dissolvent amb el qual es va aconseguir una millor recuperació de l'àcid maslínic, afegit a concentracions conegudes a 1 g de contingut intestinal blanc, a ser el metanol al 80%. Es va emprar un volum de dissolvent de 8 mdividit en dues fraccions: la primera (4 mL) per a l'homogeneïtzació de les mostres i la segona (4 mL) per al rentat de l'homogeneïtzador, donat que per la naturalesa semisòlida de la matriu n'hi quedaven restes.

Un cop optimitzat el procés d'extracció s'ha procedit a validar el mètode analític, per a la qual cosa s'han estudiat els paràmetres de recuperació, efecte matriu i eficiència del procés, precisió i exactitud, linealitat, sensibilitat i selectivitat. S'han emprat set concentracions diferents d'àcid maslínic, compreses entre 0,1 µM i 30 µM. L'efecte matriu, descrit per primera vegada per Kebarle i Tang (1993), és un paràmetre d'especial rellevància en l'anàlisi de compostos per espectrometria de masses. Un dels punts crítics en aquesta tècnica és la ionització dels anàlits; en aquest moment, la presència d'altres components de la mostra que coelueixen amb els anàlits pot afectar el procés de ionització, potenciant-lo o inhibint-lo, fet que determina la quantitat d'anàlit que pot ser posteriorment detectada. L'efecte matriu es pot valorar juntament amb la recuperació i l'eficiència del procés seguint l'estratègia proposada per Matuszewski *et al.* (2003), que van aplicar-la en plasma i emprant una extracció líquid-líquid.

L'assaig consisteix en preparar en paral·lel tres conjunts de mostres que, un cop analitzades, donaran resultats directament comparables. El primer conjunt està format per patrons que contenen anàlit i patró intern a unes determinades concentracions en un volum de dissolvent. Donat que aquesta matriu no conté compostos que puguin interferir en la determinació dels

anterior, aquestes mostres no són sotmeses al procés d'extracció. El segon conjunt està constituït per mostres de matriu biològica blanca, és a dir, sense l'anàlit ni el patró intern, a les quals s'aplica el procés d'extracció i seguidament s'afegeixen ambdós compostos a les mateixes concentracions que en el primer conjunt. D'aquesta manera l'anàlit i el patró intern es troben en la matriu biològica en presència d'altres components interferents, però no han estat sotmesos a cap extracció, per la qual cosa no se n'han produït pèrdues. El tercer conjunt consisteix en mostres de matriu biològica blanca a les quals s'afegeixen inicialment l'anàlit i el patró intern a unes concentracions tals que al final del procés d'extracció siguin iguals que les del conjunt 1. Així, doncs, en aquestes mostres l'anàlit i el patró intern es troben en la matriu biològica i han estat sotmesos al procés d'extracció. El càlcul dels diferents paràmetres de validació, en percentatge, es realitza de la següent manera. Per a la recuperació es comparen les àrees dels pics cromatogràfics de les mostres del conjunt 3 amb les àrees dels pics del conjunt 2, ja que l'únic que els diferencia és el fet que els compostos han estat sotmesos o no al procés d'extracció. Per a l'efecte matriu es comparen les àrees dels pics de les mostres del conjunt 2 amb les àrees dels pics del conjunt 1, en tant que la diferència entre ambdós conjunts rau en la presència d'altres components en la matriu. La validació del mètode analític per a la determinació de l'àcid maslínic en el contingut intestinal ha mostrat una recuperació individual mitjana d'un 96,7% per a l'anàlit a les diferents concentracions assajades (0,1–30  $\mu\text{M}$ ) i d'un 94,9% per al patró intern. La similitud entre aquests valors indica que el comportament de l'àcid betulínic durant el procés d'extracció és semblant al de l'àcid maslínic, indicatiu que el seu ús com a patró intern en aquest mètode és adequat. Si la recuperació de l'àcid maslínic es calcula a partir de la relació entre les àrees de l'anàlit i del patró intern llavors s'assoleixen valors propers al 98%. D'altra banda, l'efecte matriu mitjà ha estat d'un 110% aproximadament, indicatiu que es produeix una lleugera potenciació de la ionització dels anàlits. Aquest fet és assumible sempre que es reproduïx en tots els experiments, per la qual cosa és convenient comprovar l'efecte matriu periòdicament.

Les precisions intradia i interdia, expressades com a coeficient de variació, han estat del 3,90% i del 5,51%, respectivament, indicatiu que el mètode és precís, ja que s'accepta que aquest valor ha de ser inferior al 15% (Bansal i DeStefano, 2007). De manera similar, el mètode també ha mostrat una exactitud adequada, atès que el valor mitjà d'aquest paràmetre ha estat del 3,03%. D'altra banda, la sensibilitat ha estat suficientment elevada per a la determinació de l'àcid maslínic en el contingut intestinal, amb uns valors del LOD i el LOQ d'1,3 nM i 4,4 nM, respectivament. La selectivitat del mètode s'ha evidenciat per l'absència de pics en els temps de retenció de l'àcid maslínic i l'àcid betulínic (patró intern) en els cromatogrames obtinguts després de l'anàlisi de contingut intestinal blanc.

Per últim, la linealitat del mètode analític també s'ha assajat en el rang de concentracions entre 0,1  $\mu\text{M}$  i 30  $\mu\text{M}$ . Com per a la resta de paràmetres de validació, s'han preparat patrons de calibratge a partir de contingut intestinal blanc al qual s'ha afegit àcid maslínic a diferents

concentracions i patró intern a una concentració constant, i que tot seguit han estat sotmesos al procés d'extracció prèviament optimitzat. Tenint en compte que per a la preparació d'un patró de calibratge es requereix 1 g de contingut intestinal blanc, la quantitat total necessària per preparar una recta patró ascendiria pràcticament als 20 g. Donat que un sol animal proporciona un total d'uns 5 g de contingut intestinal, això implicaria el sacrifici d'un elevat nombre d'animals que es destinarien exclusivament a la preparació d'una recta patró. Per aquest motiu, i aplicant el principi de les 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*; Russell i Burch, 1959), s'ha cercat una alternativa per a la preparació de les rectes patró. Així, s'ha provat d'emprar com a matriu per a aquestes mostres l'extracte metanòlic resultant del processament de contingut intestinal blanc. D'aquesta manera, a partir d'1 g de contingut s'han obtingut aproximadament 8 mL d'extracte metanòlic; per a cada patró s'han emprat 180 µL d'extracte, per tant amb aquesta nova estratègia a partir d'1 g de contingut intestinal blanc s'han preparat uns 40 patrons de calibratge. La validesa d'aquests nous patrons s'ha comprovat comparant l'àrea del pic de l'àcid maslínic amb l'obtinguda en patrons preparats afegint l'anàlit a contingut intestinal blanc seguit del procés d'extracció. S'ha vist que les àrees tan sols difereixen en un 0,05%, indicatiu que els nous patrons són equivalents als anteriors i que es poden emprar tant per avaluar la linealitat del mètode com per a la preparació de rectes patró a l'hora de quantificar l'àcid maslínic en mostres.

En resum, el mètode d'HPLC-MS desenvolupat presenta una robustesa i reproductibilitat apropiades per a la determinació de l'àcid maslínic en investigació preclínica. Així, doncs, amb la finalitat de caracteritzar el comportament del triterpè al llarg del tracte intestinal després de la seva administració oral, el mètode analític s'ha aplicat a mostres de contingut de diferents segments (duodè i jejú, ili, cec i còlon) obtingudes de rates Sprague-Dawley que han rebut àcid maslínic a dosis d'1, 2 o 5 mg/kg durant dos dies consecutius. El triterpè s'ha quantificat en totes les mostres, si bé amb notables diferències entre els segments. En el contingut dels dos primers (duodè i jejú, ili) és on s'han trobat les concentracions més baixes, fet que s'explica pel temps de presa de mostra (24 h després de la darrera administració). En canvi, en el contingut del còlon i del cec la quantitat d'àcid maslínic ha estat major; en aquests segments el trànsit intestinal és més lent i ha permès l'acumulació del compost.

Tal com s'ha comentat anteriorment, una de les raons que podrien explicar les baixes concentracions plasmàtiques d'àcid maslínic observades després de la seva administració oral a rates és un extens metabolisme intestinal o hepàtic. El metabolisme té per objectiu incrementar la hidrosolubilitat d'aquestes substàncies a fi de facilitar-ne l'excreció a través dels fluids biològics. Les reaccions que tenen lloc sobre les molècules es classifiquen en dues fases; la fase I consisteix en oxidacions, reduccions i hidròlisis, que en general augmenten la reactivitat de les molècules de cara a les reaccions de fase II, en les quals els derivats de fase I es conjuguen amb espècies endògenes hidrofíliques, com són l'àcid glucurònic, grups sulfat o el glutatí (Benedetti *et al.*, 2009). La formació de metabòlits pot servir per explicar la biodisponibilitat de fàrmacs o

compostos bioactius, alhora que pot ser determinant de la seva activitat biològica. Tot i que tradicionalment s'ha considerat que el fetge és l'òrgan amb una funció metabòlica més rellevant, donada la seva mida i el seu elevat contingut en enzims implicats en el metabolisme de xenobiòtics, en els darrers anys nombrosos estudis han demostrat que l'intestí, a més de ser responsable de l'absorció de nutrients i aigua, contribueix de manera substancial al metabolisme d'aquestes substàncies (Komura i Iwaki, 2011; Waterschoot i Schinkel, 2011). En conseqüència, es redueix la quantitat de xenobiòtics que poden assolir la circulació sanguínia procedents de l'administració oral. Per tant, el següent objectiu de la present tesi ha estat identificar els metabòlits de l'àcid maslínic que apareixen en el contingut dels diferents segments intestinals després de l'administració oral del triterpè. Donat que podia ser que les concentracions fossin baixes, s'han emprat mostres obtingudes de l'administració de la dosi major (5 mg/kg). Pel que fa la tècnica analítica, si bé les més emprades per a l'elucidació estructural de compostos són la difracció de raigs X i la ressonància magnètica nuclear (NMR), les segueix de prop l'espectrometria de masses, que aporta l'avantatge de poder-se acoblar fàcilment a tècniques separatives, és a dir, la cromatografia de líquids o de gasos, per a l'anàlisi de mostres biològiques complexes (Holčapek *et al.*, 2008). El pas previ a l'entrada a l'espectròmetre de masses consisteix en la ionització de les molècules als corresponents cations o anions. Tot i que no existeix una tècnica de ionització universal, donada l'elevada varietat estructural dels compostos orgànics, l'ampli ventall de polaritats i de pesos moleculars queda coberta per tres tècniques de ionització, que són la ionització per electroesprai (ESI), l'APCI i la fotoionització a pressió atmosfèrica (APPI). Mentre que la primera és la d'elecció per a compostos polars i iònics, l'APCI i l'APPI proporcionen una millor eficiència de ionització i sensibilitat per a compostos de menor polaritat (Holčapek *et al.*, 2008). En el present estudi la font d'APCI ha estat la que ha donat millors resultats en la ionització de l'àcid maslínic. D'altra banda, en l'analitzador es produeix la separació dels ions d'acord amb les diferents relacions massa-càrrega ( $m/z$ ) abans d'assolir el detector. La qualitat de la separació està determinada pel grau en el qual poden ser distingits valors propers d' $m/z$ . Així, segons el poder de resolució els analitzadors es classifiquen en dos grups. En general, els analitzadors de baixa resolució, com són els de quadrupols o de trampes iòniques, tenen una resolució de pocs milers, mentre que els d'alta resolució proporcionen resolucions mínimes de 15000 per als analitzadors basats en el temps de volada (TOF) o superiors a 50000 per als analitzadors basats en la transformada de Fourier, com és l'Orbitrap (Holčapek *et al.*, 2008). L'ús d'analitzadors d'alta resolució s'associa a un paràmetre important, l'exactitud de la massa, que es defineix com la diferència entre l' $m/z$  experimental i l' $m/z$  teòrica, dividida per l' $m/z$  teòrica i multiplicat per  $10^6$ . Es considera que les mesures realitzades en aquests analitzadors haurien de proporcionar valors d'exactitud de massa inferiors a 5 ppm. Les masses exactes permeten determinar la fórmula elemental correcta entre diferents possibilitats o, almenys, a reduir-ne el nombre. Una altra dada en la qual es basa la determinació de la composició elemental d'una molècula és la comparació de la



distribució isotòpica experimental amb el patró teòric (Holčapek *et al.*, 2008). L'analitzador de masses en tàndem d'alta resolució més habitualment emprat per a la identificació de metabòlits és l'híbrid de doble quadrupol-TOF, però els analitzadors basats en la transformada de Fourier proporcionen exactituds de massa significativament més elevades. Aquest analitzador de masses té un poder de resolució de fins a 100000 a una  $m/z$  de 400 (per a un temps d'escombratge d'1,9 s) i una exactitud en la massa inferior a 2 ppm (Makarov *et al.*, 2006). Així, doncs, l'analitzador Orbitrap permet la detecció d'un gran nombre de metabòlits de masses exactes similars amb un alt nivell de confiança en la seva identificació. Makarov *et al.* (2006) van proposar l'ús d'un instrument híbrid consistent en un analitzador Orbitrap precedit d'una trampa iònica lineal (LTQ-Orbitrap). Els ions procedents de la font són recollits en aquesta trampa; seguidament, aquells ions que no són d'interès són ejectats per mitjà de l'aplicació de condicions específiques, de manera que només els ions que es volen determinar queden retinguts a la trampa i són transmesos al detector. La caracterització dels principals paràmetres de funcionament d'aquest equip va demostrar que permet realitzar anàlisis ràpides i exactes de mostres complexes (Makarov *et al.*, 2006), per la qual cosa l'LTQ-Orbitrap és una eina analítica adequada per a la identificació de metabòlits en matrius biològiques. Des de la seva aparició diversos estudis l'han aplicat amb èxit (Ding *et al.*, 2007; Lim *et al.*; 2007; Li *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014) i donat que es troba disponible en els Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCIT-UB) s'ha emprat en el nostre grup per a la identificació dels metabòlits de l'àcid maslínic, inicialment en plasma (Sánchez-González *et al.*, 2015; veure Annex II) i també en contingut intestinal, tal com es descriu en la present tesi.

En les mostres de contingut de tots els segments intestinals s'han cercat derivats tant de fase I com de fase II, si bé no s'ha trobat cap conjugat. En canvi, s'han identificat diversos metabòlits de fase I, resultants de reaccions d'hidroxilació i/o deshidrogenació en diferents combinacions. La informació disponible actualment en relació amb el metabolisme al qual són sotmesos els triterpens pentacíclics és escassa. *In vivo*, només l'estudi de Krüger *et al.* (2008) ha abordat aquesta qüestió, concretament per a l'aparició de derivats dels àcid boswèllics en plasma. Els àcid boswèllics són uns compostos aïllats de *Boswellia serrata* als quals s'ha atribuït una potent activitat antiinflamatòria (Poeckel i Werz, 2006). Després de l'administració oral de 12,5 mg/kg d'àcid 11-ceto-boswèllic a rates Wistar femella, es van trobar en plasma dos derivats monohidroxilats i cap conjugat (Krüger *et al.*, 2008). En la present tesi, els metabòlits denominats M1–M3 són tres isòmers estructurals corresponents a la incorporació d'un grup hidroxil a la molècula de l'àcid maslínic. Tots tres derivats s'han trobat en el contingut de l'ili i del còlon, en el contingut del cec tan sols han aparegut l'M1 i l'M2 i en el contingut del primer segment (duodè i jejú) no s'han detectat. El fet que la hidroxilació sigui la principal via metabòlica a la qual se sotmeten els triterpens pentacíclics ha estat confirmat per diversos assajos *in vitro* consistents en la incubacions amb microsomes hepàtics de rata i humans, tal com s'ha fet per a l'àcid oleanòlic (Jeong *et al.*, 2007) o els mateixos àcid boswèllics (Krüger *et*

*al.*, 2008). La biotransformació de l'àcid maslínic, en concret, només s'ha investigat *in vitro* mitjançant cultius de fongs com *Cunninghamella blakesleana* CGMCC 3.910 (Feng *et al.*, 2012) i *Rhizomucor miehei* (Martínez *et al.*, 2013). Ambdues espècies expressen enzims del citocrom P450, que realitzen reaccions de fase I equivalents a les observades en mamífers i per aquest motiu estan sent àmpliament emprades per a l'anàlisi de la biotransformació de fàrmacs i altres xenobiòtics (Murphy, 2015). Els resultats obtinguts en aquests models es troben en concordança amb els descrits en aquesta tesi. Feng *et al.* (2012) van observar que l'àcid maslínic era biotransformat a quatre derivats, concretament dos derivats monohidroxilats i dos derivats dihidroxilats. A més, els autors van proposar una via metabòlica per explicar l'aparició d'aquests nous compostos. En primer lloc, la incorporació d'un grup hidroxil a la molècula de l'àcid maslínic es produiria en els carbonis 7 (amb orientació  $\beta$ ) i 15 ( $\alpha$ ); a continuació, el primer seria sotmès a unes segones hidroxilacions en les posicions 15 $\alpha$  i 13 $\beta$ , amb una migració del doble enllaç en el darrer cas (Feng *et al.*, 2012). D'altra banda, la biotransformació de l'àcid maslínic per *Rhizomucor miehei* també va donar lloc a un derivat monohidroxilat, tot i que en aquest cas l'addició del grup funcional es va produir en el grup metil angular de la posició 30 (Martínez *et al.*, 2013). Tenint en compte aquests resultats, els tres isòmers identificats en la present tesi podrien haver-se obtingut per hidroxilació de l'àcid maslínic en els carbonis 7, 13, 15 o 30. Després de l'administració oral del triterpè a rates també han aparegut en el contingut del cec i del còlon els derivats M4 i M5, així com també l'M5 en l'ili. L'increment de massa de 14 Da indica que podria tractar-se de la incorporació d'un grup hidroxil seguit d'una deshidrogenació, compatible amb l'oxidació d'un grup hidroxil a una cetona. L'esquelet pentacíclic de l'àcid maslínic conté dos hidroxils, en els carbonis 2 i 3, susceptibles de ser biotransformats, si bé aquesta modificació no ha estat mai descrita per a aquest compost. En canvi, sí que ho ha estat per als àcids boswèllics després de la incubació amb microsomes hepàtics de rata (Krüger *et al.*, 2008) i també per a l'àcid betulínic després de la incubació amb diferents models microbians emprats per al metabolisme de fàrmacs (Chatterjee *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2007). En el contingut intestinal també s'han identificat derivats corresponents a una doble hidroxilació de l'àcid maslínic (M7–M9 en el cec i el còlon; M7 en l'ili). Aquesta biotransformació també s'ha observat després de la incubació del compost amb *Cunninghamella blakesleana* CGMCC 3.910 (Feng *et al.*, 2012), tal com s'ha descrit anteriorment. Pel que fa als derivats M10 i M11, amb un increment de massa de 30 Da, es podrien atribuir a l'addició de dos grups hidroxil i una deshidrogenació. Ambdós compostos s'han detectat en el contingut del cec i del còlon i l'M10 s'ha trobat també en l'ili. Aquesta biotransformació també ha estat observada per a l'àcid ursòlic després de la incubació amb el fong *Pestalotiopsis microspora* (Fu *et al.*, 2011). Finalment, tot i que només en el contingut del còlon, també s'ha trobat un derivat amb un canvi de massa de -2 Da, indicatiu d'una deshidrogenació que bé podria correspondre's amb l'oxidació d'un grup hidroxil a una cetona.

L'altre fet que justificaria les baixes concentracions plasmàtiques d'àcid maslínic observades després de la seva administració oral a rates podria ser una escassa absorció intestinal. Per aquest motiu el següent objectiu plantejat en la present tesi ha estat estudiar el mecanisme de pas del triterpè a través de la paret intestinal, mitjançant experiments *ex vivo* i *in situ* en jejú de rata. Les tècniques *ex vivo* permeten estudiar els mecanismes implicats en l'absorció intestinal en una preparació d'intestí sotmesa a unes condicions artificials que simulen les fisiològiques. Tot i que la manipulació del teixit és més senzilla que la que es requereix en l'ús de models animals i que les condicions experimentals es poden establir d'una forma molt acurada, resulta difícil compensar la manca d'aportació sanguínia.

La tècnica *ex vivo* dels sacs evertits emprada en la present memòria va ser descrita per Wilson i Wiseman (1954) i consisteix en la preparació de segments intestinals tancats pel extrems i plens d'un medi fisiològic que conté o no el compost en estudi. Els sacs es mantenen submergits en un medi fisiològic que conté el compost en estudi a una determinada concentració, a 37°C i durant un període de temps determinat. Si la solució que hi ha a l'interior dels sacs no conté el compost es pot estudiar el pas a través de la paret intestinal a favor de gradient, mentre que si la solució conté el compost es poden posar de manifest mecanismes de transport actiu, que es produeixen en contra de gradient de concentració. L'eversió de l'intestí fa que la mucosa, que té una elevada activitat metabòlica, quedi exposada al medi d'incubació que es troba ben oxigenat, alhora que la distensió de la paret intestinal un cop els sacs han estat totalment omplerts de solució incrementa l'àrea de la superfície i redueix el gruix de la paret. El petit volum de solució de l'interior del sac (costat serosal) permet que la concentració del compost en estudi hi incrementi ràpidament, amb la qual cosa s'hi pot quantificar malgrat que el pas de la substància sigui molt reduït. Un altre avantatge és el fet que a partir de l'intestí d'un sol animal es poden estudiar en paral·lel diverses condicions experimentals (Wilson i Wiseman, 1954). Cal tenir en compte, però, una sèrie de factors que poden afectar els resultats obtinguts mitjançant aquesta tècnica. Aquests factors poden estar relacionats amb l'animal, com per exemple l'espècie, el sexe, l'edat, la dieta i l'estat de salut/malaltia, o bé amb el disseny experimental, entre els quals es troben el pH de les solucions d'incubació, el grau d'oxigenació, la temperatura, el temps que es tarda en obtenir el segment intestinal o la manera com s'ha sacrificat l'animal (Alam *et al.*, 2011). En el present estudi s'han aplicat dues condicions experimentals, que han suggerit que l'àcid maslínic presenta una baixa absorció intestinal en la qual no hi ha implicats mecanismes de transport actiu. En primer lloc, els sacs evertits s'han incubat en un medi mucosal amb àcid maslínic (100 µM) i un medi mucosal sense el compost. El gradient de concentració ha resultat en l'entrada del triterpè als sacs, si bé les concentracions assolides han estat molt baixes. Aquesta observació concorda amb la poca quantitat d'àcid maslínic que s'havia trobat en plasma en l'estudi farmacocinètic. A fi de conèixer si el triterpè pot ser transportat a través de la paret intestinal en contra de gradient de concentració s'han incubat sacs amb medis mucosal i serosal amb la mateixa concentració d'àcid maslínic (100

$\mu\text{M}$ ). Al cap dels 35 min d'incubació la concentració del compost a l'interior dels sacs no ha incrementat, indicatiu que no hi ha cap mecanisme de transport actiu implicat en el pas del triterpè a través de la paret intestinal.

D'altra banda, també s'ha aplicat la tècnica *in situ* de la perfusió intestinal en jejú de rata, seguint un procediment similar al descrit originalment per Ponz *et al.* (1979). Aquest mètode consisteix en aïllar un segment intestinal entre dues cànules i perfundir-hi una solució amb una concentració coneguda del compost en estudi, a un flux i durant un temps concrets. La quantificació de l'anàlit en la solució recollida després de la perfusió permet obtenir, per diferència, la quantitat desapareguda, fet que en reflecteix l'entrada als enteròcits. En un sol animal es poden perfundir diverses solucions successives, ja sigui amb concentracions diferents del compost, fet que permet obtenir una aproximació a la cinètica d'absorció intestinal, o bé en presència d'inhibidors, per poder posar de manifest la implicació de proteïnes transportadores. Malgrat que aquesta tècnica implica mantenir l'animal anestesiàt en tot moment, les condicions fisiològiques són notablement semblants a les que es donen *in vivo*, especialment pel que fa la irrigació sanguínia del teixit i el flux limfàtic. La quantitat de substància desapareguda de les solucions perfundides es pot normalitzar per diferents paràmetres, com són la longitud del segment emprat, la superfície o el pes sec, per la qual cosa s'aconsegueix una elevada reproductibilitat entre diferents animals (Ponz *et al.*, 1979).

En la present tesi s'han realitzat perfusions amb recirculació durant un període de temps de 5 min. La recirculació s'empra quan s'estudien compostos que se sospita que poden presentar una baixa absorció, ja que s'incrementa el temps durant el qual estan en contacte amb la mucosa intestinal. Pel que fa el temps de perfusió de cada solució, períodes inferiors a 2 minuts no són adequats per tal que es produeixi la recirculació correcta de la solució, mentre que períodes superiors a 5 min poden disminuir excessivament la concentració de substrat en les solucions perfundides (Ponz *et al.*, 1979).

Per a l'estudi de la cinètica d'absorció intestinal de l'àcid maslínic s'han emprat 13 concentracions diferents en el rang entre 0,01  $\mu\text{M}$  i 20  $\mu\text{M}$ , limitades respectivament pel LOQ del mètode analític (aproximadament de 5 nM) i per la solubilitat del compost en el medi de perfusió. Per aconseguir concentracions superiors a 20  $\mu\text{M}$  la quantitat d'excipient s'hauria hagut d'incrementar, fet que hauria introduït un element de variabilitat. Els resultats han mostrat que l'àcid maslínic desapareix de les solucions perfundides seguint una cinètica lineal, atribuïble a un procés de difusió simple. Per a l'àcid maslínic això és possible ja que es tracta d'una molècula liposoluble i amb un pes molecular relativament baix (472,7 g/mol). L'absència de mecanismes de transport actiu s'ha corroborat per mitjà de l'addició al medi de perfusió de 2,4-dinitrofenol (DNP), un agent desacoblant de la fosforilació oxidativa. En condicions fisiològiques, la cadena de transport d'electrons genera un gradient de protons en l'espai intermembranós i els protons retornen a la matriu a través de l'ATP sintasa, que aprofita aquest

gradient per produir ATP. En aquest context, el DNP fa que la membrana interna dels mitocondris sigui permeable als protons, de manera que poden difondre cap a la matriu sense necessitat de la intervenció de l'ATP sintasa. En conseqüència, es deixa de produir ATP i s'aturen tots els processos cel·lulars dependents d'energia. Aquests experiments s'han realitzat emprant una concentració de DNP d'1 mM (Cheng *et al.*, 2010) i d'àcid maslínic de 0,01; 0,5; 2,5 i 20  $\mu$ M. En cap cas no s'han observat diferències en la desaparició del triterpè de les solucions perfundides, fet que confirma l'absència de processos de transport dependents d'ATP implicats en l'entrada de l'àcid maslínic als enteròcits.

Pel que fa l'efecte antitumoral de l'àcid maslínic, en els darrers anys ha estat el que ha despertat més interès, tal com evidencia l'elevat nombre d'estudis publicats en aquest camp (Juan *et al.*, 2008; Reyes-Zurita *et al.*, 2009; Li *et al.*; 2010; Wu *et al.*; 2011; Zhang *et al.*, 2014; Sánchez-Tena *et al.*, 2013). La major part d'aquests estudis han estat realitzats en línies cel·lulars tumorals, fet que ha permès dilucidar alguns dels mecanismes d'acció de l'àcid maslínic. Així, s'ha vist que el triterpè exerceix una activitat antiproliferativa i proapoptòtica per la via mitocondrial o intrínseca (Juan *et al.*, 2008), però també a través de la via extrínseca modificant la via de l'NF $\kappa$ B (Li *et al.*, 2010). A més, en una línia de càncer de pròstata el triterpè ha mostrat un efecte inhibitori sobre la capacitat de migració cel·lular, així com també sobre la secreció d'HIF-1 $\alpha$  en condicions d'hipòxia, factor responsable de la inducció de l'angiogènesi (Park *et al.*, 2013). L'efecte anticancerigen també ha estat provat en alguns models animals, concretament en ratolins als quals s'havien implantat cèl·lules tumorals pancreàtiques (Li *et al.*, 2010), ratolins Apc<sup>Min/+</sup>, que desenvolupen espontàniament poliposi intestinal (Sánchez-Tena *et al.*, 2013) i ratolins als quals s'havien implantat cèl·lules de carcinoma de bufeta urinària (Zhang *et al.*, 2014). En tots aquests models s'ha avaluat l'efecte de l'àcid maslínic en etapes relativament avançades del procés carcinogènic, des de la formació de pòlips intestinals (Sánchez-Tena *et al.*, 2013) fins a tumors malignes, dels quals s'ha vist que en redueix el volum i el pes (Li *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014). En canvi, en el moment de l'inici d'aquesta tesi mai no s'havia estudiat si el triterpè exercia algun efecte sobre l'aparició de lesions preneoplàsiques. Així, doncs, el darrer objectiu ha estat avaluar l'activitat quimiopreventiva de l'àcid maslínic *in vivo* en un model de lesions preneoplàsiques induïdes per 1,2-dimetilhidrazina (DMH) en còlon de rata. Aquest estudi està recolzat, d'una banda, per la potent activitat antiproliferativa i proapoptòtica observada prèviament pel nostre grup en una línia cel·lular d'adenocarcinoma de còlon (Juan *et al.*, 2008); d'altra banda, pel fet que l'absorció intestinal d'aquest triterpè és baixa i que es troba en elevades concentracions en el còlon després de la seva administració oral, tal com s'ha exposat anteriorment. El model animal havia estat posat a punt en el grup i emprat per a l'estudi de l'activitat quimiopreventiva del *trans*-resveratrol, un polifenol del raïm (Alfaras *et al.*, 2010). La inducció de lesions s'ha dut a terme mitjançant injeccions intraperitoneals de DMH a una dosi de 20 mg/kg un cop per setmana durant tres setmanes. S'han assajat tres dosis d'àcid maslínic (5, 10 i 25 mg/kg), administrades per via oral diàriament

durant la setmana prèvia a la inducció de lesions, en el decurs de les tres setmanes de les injeccions de DMH i fins al dia 49, tant en rates mascles com femelles. L'efecte del triterpè s'ha valorat mitjançant el recompte de focus de criptes aberrants (FCA) i focus de criptes amb depleció de mucines (FDM) en la mucosa del còlon dels animals, després de les tincions corresponents. Les primeres lesions s'empren en estudis a curt termini com a biomarcadors per predir l'efecte d'un compost sobre el desenvolupament d'un tumor (Corpet i Taché, 2002). En alguns casos, però, la correlació entre FCA i càncer colorectal no s'ha pogut establir (Magnusson *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 1999), en tant que en humans i en rosegadors s'ha vist que els FCA presenten diferents nivells de displàsia i només alguns acaben evolucionant fins a un tumor (McLellan *et al.*, 1991). Els FDM, en canvi, s'han proposat com lesions premalignes predictives de la carcinogènesi (Caderni *et al.*, 2003), ja que l'alteració en la producció de mucines és una de les característiques més rellevants de displàsia en el còlon (Jass i Sobin, 1989).

En el present estudi s'ha observat que el tractament amb àcid maslínic a les diferents dosis redueix l'aparició d'FCA en còlon total de manera similar en rates mascles (en un 22%, 24% i 35% a 5, 10 i 25 mg/kg) i en rates femelles (en un 24%, 29% i 21%, respectivament). Pel que fa la distribució de les lesions en tots els experiments s'ha observat un major nombre d'FCA en el segment medial seguit del distal, mentre que en el proximal pràcticament no se n'han trobat. Per als FDM el perfil ha estat similar, tot i que les diferències entre el segments medial i distal no han estat tan acusades. La classificació de les lesions segons el nombre de criptes aberrants que contenen ha posat de manifest que la majoria de focus estan formats per una sola cripta i que l'abundància va disminuint progressivament a mesura que incrementa el nombre de criptes en cadascun. Furtado *et al.* (2008) han realitzat un estudi amb un disseny experimental similar per avaluar l'efecte d'uns altres triterpens pentacíclics, l'àcid ursòlic i l'àcid oleanòlic. Aquest darrer està estretament lligat amb l'àcid maslínic, en tant que n'és el precursor en la ruta biosintètica descrita per Stiti *et al.* (2007) en l'*Olea europaea* L. En aquest experiment, realitzat en rates mascles de la soca Wistar, les lesions es van induir mitjançant quatre injeccions subcutànies de DMH (40 mg/kg), dos cops per setmana durant dues setmanes consecutives. D'altra banda, els triterpens es van administrar per via oral a una dosi de 25 mg/kg cadascun, sols o conjuntament (en una proporció del 65% per a l'àcid ursòlic i del 35% per a l'àcid oleanòlic). El recompte d'FCA va posar de manifest que ambdós triterpens reduïen significativament l'aparició de lesions en el còlon distal, concretament en un 60% en resposta al tractament amb àcid ursòlic, en un 68% per a l'àcid oleanòlic i en un 58% per a la combinació d'ambdós compostos. Pel que fa la multiplicitat, expressada com a nombre d'FCA en funció del nombre de criptes en cada focus, els resultats han estat similars als observats en la present tesi, en tant que en tots els grups experimentals la major part d'FCA estaven constituïts per una sola cripta i disminuïen a mesura que incrementava el nombre de criptes (Furtado *et al.*, 2008). Les diferències entre rates mascles i femelles referent al nombre de lesions induïdes pel tractament amb DMH concorden amb els resultats de Barbolt i Abraham (1980), que en rates de la mateixa

soca (Sprague-Dawley) a les quals es va administrar per via oral i setmanalment el carcinogen (30 mg/kg) durant 10 setmanes la incidència de tumors colònics va ser del 100% en els mascles i de tan sols el 30% en les femelles. També es va trobar una menor incidència de càncer induït per DMH en rates femelles de les soques BD-II i BD-IX; en aquest cas el carcinogen es va administrar setmanalment per via subcutània a una dosi de 15 mg/kg durant 20 setmanes (Moon i Fricks, 1977). Prèviament, un estudi toxicològic havia demostrat que les femelles de la soca de ratolins NMRI eren més tolerants a la DMH, amb una  $DL_{50}$  de 22 mg/kg en contraposició amb 12 mg/kg per als mascles (Pegg i Hawks, 1971).

La DMH és un procarcinogen, de manera que per exercir el seu efecte requereix ser metabolitzat a un derivat actiu. Aquesta reacció té lloc per mitjà del citocrom P450, concretament de la isoforma CYP2E1 (Sohn *et al.*, 2001). Així, un dels mecanismes pels quals el tractament amb àcid maslínic podria resultar en una menor aparició de lesions preneoplàsiques en còlon consistiria en la inhibició de l'enzim CYP2E1 per part del triterpè. En un estudi recent en microsomes hepàtics de rata s'ha vist que l'àcid maslínic té un efecte inhibitori feble sobre aquest enzim, ja que a una concentració de 100  $\mu$ M l'activitat metabòlica és inhibida en un 35% (Sun *et al.*, 2015). Per tant, per dilucidar en el mecanisme pel qual l'àcid maslínic redueix l'aparició de criptes aberrants caldria avaluar l'efecte del triterpè sobre vies metabòliques implicades en el desenvolupament d'aquestes lesions. En resum, l'efecte quimiopreventiu de l'àcid maslínic observat en la present tesi confirma els resultats trobats prèviament *in vitro* i plantegen un possible ús d'aquest component bioactiu com un ingredient funcional o un nutraceutic en la prevenció del càncer de còlon.

**CONCLUSIONS**





The conclusions derived from the present work are as follows:

- The safety assessment of maslinic acid performed in mice provides evidence of the absence of adverse effects attributable to the triterpene after its oral administration. The body weight, food conversion efficiency and general behaviour of the animals were not altered by the treatments (1 g/kg or 50 mg/kg), compared to controls.
- Following the administration of maslinic acid (50 mg/kg) along 28 days, the haematological and biochemical variables analysed were not modified. In addition, neither the gross necropsy nor the histopathological examination of the main organs revealed alterations as a consequence of the repeated exposure to the triterpene. On the contrary, the relative weight of the brain was found increased (11%) in the treated animals.
- An analytical method was developed for the determination of maslinic acid in rat plasma, consisting of a liquid-liquid extraction with ethyl acetate followed by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. The method showed good recovery (98.8%) and precision, with relative standard deviation (RSD) values lower than 10%, as well as linearity up to 25  $\mu\text{M}$ . It was also selective for maslinic acid, and its sensitivity, evaluated by means of the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ), was of 0.02  $\mu\text{M}$  and 0.32  $\mu\text{M}$ , respectively.
- The previous analytical method was used for the quantification of maslinic acid in plasma up to 60 min after its oral administration (50 mg/kg) to rats. The plasma concentration vs time curve was best characterized by a monocompartmental model, with estimated  $C_{\text{max}}$  and  $T_{\text{max}}$  of 3.74  $\mu\text{M}$  and 18.0 min, respectively.
- An HPLC coupled to mass spectrometry method was developed for the determination of maslinic acid in rat intestinal content. The extraction of the analyte was performed by homogenization with methanol 80% after the addition of betulinic acid as internal standard. The individual recoveries of both analytes were 96.7% and 94.9%, respectively, and the matrix effect for maslinic acid was around 110%. The method showed good linearity up to 30  $\mu\text{M}$ , and it was selective and sensitive, with a LOD of 1.31 nM and a LOQ of 4.37 nM.
- The above-described method was employed for the quantification of maslinic acid in the content of different segments of the intestinal tract after its oral administration to rats (1, 2 or 5 mg/kg) for two consecutive days. In all segments the concentration of the triterpene was correlated with the dose. The higher amount was found in the caecum at all doses (5–77 nmol/g), followed by the colon and the ileum, while in the first intestinal segment (duodenum and jejunum) the concentration of maslinic acid was below 1.5 nmol/g.
- Moreover, maslinic acid metabolites were identified by high resolution mass spectrometry in the content of all intestinal segments obtained after the oral administration of the higher dose (5 mg/kg). A total of eleven derivatives resulting from phase I reactions were detected, which

consisted of the incorporation of one or two hydroxyl groups and/or a single dehydrogenation. In the duodenum and jejunum only maslinic acid was found, while in the ileum mainly dihydroxylated derivatives were detected. Almost all metabolites were observed in the content of the caecum and all of them were present in the colon. Further research on the metabolism of maslinic acid in the colon has been performed in samples obtained from rats orally administered with the triterpene (10 mg/kg) for 49 days, resulting in two additional phase I derivatives.

- In everted intestinal sacs maslinic acid crossed the intestinal wall from the mucosal towards the serosal side by a simple diffusion process, without the intervention of active transport mechanisms. The calculated net transport suggested a low intestinal absorption of the triterpene.
- The intestinal perfusion of maslinic acid at different concentrations through a segment of jejunum in rat evidenced that the absorption of the triterpene takes place through linear kinetics and with an apparent diffusion constant ( $K_d$ ) of  $6.95 \pm 0.37 \mu\text{L}/5 \text{ min}\cdot\text{mg}$  dry weight. Furthermore, when ATP synthesis was inhibited by the addition of 2,4-dinitrophenol to the medium no differences in the disappearance of the triterpene from the perfused solutions were observed. Altogether, these results show that maslinic acid is taken up by a simple diffusion process without the involvement of any mechanism of mediated transport.
- The daily oral administration of maslinic acid at doses of 5, 10 and 25 mg/kg for 49 days attenuated the formation of aberrant crypt foci in the colonic mucosa induced by 1,2-dimethylhydrazine, both in male and female rats. While in the former the number of lesions was diminished by 22%, 24% and 35%, at the respective doses, in females it was reduced by 24%, 29% and 21%, compared to controls. Mucin-depleted foci were 40% lower in male rats; on the contrary, the number of these lesions in females was increased in response to maslinic acid treatment at the three doses.





**A**cebey-Castellón, I.L.; Voutquenne-Nazabadioko, L.; Mai, D.T.H.; Roseau, N.; Bouthagane, N.; Muhammad, D.; le Debar, M.E.; Gangloff, S.C.; Litaudon, M.; Sevenet, T.; *et al.* Triterpenoid saponins from *Symplocos lancifolia*. *J Nat Prod.* 2011, 74:163–168.

Alam, M.A.; Al-Jenoobi, F.I.; Al-Mohizea, A.M. Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: limitations and applications. *J Pharm Pharmacol.* 2011, 64:326–336.

Alfaras, I.; Juan, M.E.; Planas, J.M. *trans*-Resveratrol reduces precancerous colonic lesions in dimethylhydrazine-treated rats. *J Agric Food Chem.* 2010, 58:8104–8110.

Allouche, Y.; Beltrán, G.; Gaforio, J.J.; Uceda, M.; Mesa, M.D. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food Chem Toxicol.* 2010, 48:2885–2890.

Alqahtani, S.; Mohamed, L.A.; Kaddoumi, A. Experimental models for predicting drug absorption and metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013, 9:1241–1254.

**B**ächler, L. Chemische Untersuchungen über die Früchte von *Crataegus oxyacantha* L. (Monographie der Mehlbeeren); Universität Basel: Basel, Switzerland, 1927.

Balimane, P.V.; Chong, S.; Morrison, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000, 44:301–312.

Banno, N.; Akihisa, T.; Tokuda, H.; Yasukawa, K.; Taguchi, Y.; Akazawa, H.; Ukiya, M.; Kimura, Y.; Suzuki, T.; Nishino, H. Anti-inflammatory and antitumor-promoting effects of the triterpene acids from the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Biol Pharm Bull.* 2005, 28:1995–1999.

Bansal, S.; DeStefano, A. Key elements of bioanalytical method validation for small molecules. *AAPS J.* 2007, 9:E109–E114.

Barbolt, T.A.; Abraham, R. Dose-response, sex difference, and the effect of bran in dimethylhydrazine-induced intestinal tumorigenesis in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1980, 55:417–422.

Bastos, D.Z.; Pimentel, I.C.; de Jesús, D.A.; de Oliveira, B.H. Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi. *Phytochemistry.* 2007, 68:834–839.

Benedetti, M.S.; Whomsley, R.; Poggesi, I.; Cawello, W.; Mathy, F.X.; Delporte, M.L.; Papeleu, P.; Watelet, J.B. Drug metabolism and pharmacokinetics. *Drug Metab Rev.* 2009, 41:344–390.

Bianchi, G.; Pozzi, N.; Vlahov, G. Pentacyclic triterpene acids in olives. *Phytochemistry.* 1994, 37:205–207.

Binefa, G.; Rodríguez-Moranta, F.; Teule, À.; Medina-Hayas, M. Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. *World J Gastroenterol.* 2014, 20:6786–6808.

Bird, R.P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* 1987, 37:147–151.

Bird, R.P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.* 1995, 93:55–71.

Bohets, H.; Annaert, P.; Mannens, G.; Van Beijsterveldt, L.; Anciaux, K.; Verboven, P.; Meuldermans, W.; Lavrijsen, K. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. *Curr Top Med Chem.* 2001, 1:367–383.

Boron, W.F.; Boulpaep, E.L. *Medical Physiology*. 2<sup>a</sup> edició. Philadelphia: Saunders; 2009.

Bourboulia, D.; Stetler-Stevenson, W.G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol.* 2010, 20:161–168.

Burckhardt, G.; Wolff, N.A. Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000, 278:F853–866.

**C**aderni, G.; Femia, A.P.; Giannini, A.; Favuzza, A.; Luceri, C.; Salvadori, M.; Dolara, P. Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis. *Cancer Res.* 2003, 63:2388–2392.

Caglioti, L.; Cainelli, G.; Minutilli, F. Constitution of maslinic acid. *Chim Ind.* 1961, 43:278.

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, 136:735–741.

Cao, X.; Gibbs, S.T.; Fang, L.; Miller, H.A.; Landowski, C.P.; Shin, H.C.; Lennernas, H.; Zhong, Y.; Amidon, G.L.; Yu, L.X.; Sun, D. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. *Pharm Res.* 2006, 23:1675–1686.

Caputo, R.; Mangoni, L.; Monaco, P.; Previtiera, L. Triterpenes in husks of *Olea europaea*. *Phytochemistry.* 1974, 13:1551–1552.

Chang, T.Y.; Li, B.L.; Chang, C.C.Y.; Urano, Y. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009, 297:E1–E9.

Chatterjee, P.; Kouzi, S.A.; Pezzuto, J.M.; Hamann, M.T. Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Appl Environ Microbiol.* 2000, 66:3850–3855.

Chen, J.; Huang, X.F. The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. *Cancer Biol Ther.* 2009, 8:1313–1317.

Cheng, J.; Wu, Z.H.; Ping, Q.N.; Wang, B.; Lu, J. The absorption characteristics of bifendate solid dispersion in rat intestinal tissue. *Drug Dev Ind Pharm*. 2010, 36:283–291.

Cheng, X.; Shin, Y.G.; Levine, B.S.; Smith, A.C.; Tomaszewski, J.E.; van Breemen, R.B. Quantitative analysis of betulinic acid in mouse, rat and dog plasma using electrospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003, 17: 2089–2092.

Choi, Y.H.; Yu, A.M. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. *Curr Pharm Des*. 2014, 20:793–807.

Clarke, L.L. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009, 296:G1151–G1166.

Colorectal cancer [Internet]. Toronto: Canadian Cancer Society; 2014 [accès 6 de novembre de 2014]. Disponible en: <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/colorectal/colorectal-cancer/?region=on>

Corpet, D.E.; Pierre, F. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *Eur J Cancer*. 2005, 41:1911–1922.

Corpet, D.E.; Taché, S. Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency. *Nutr Cancer*. 2002, 43:1–21.

**D**a Silva Ferreira, S.; Esperandim, V.R.; Toldo, M.P.; Saraiva, J.; Cunha, W.R.; de Albuquerque, S. Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids. *Parasitol Res*. 2010, 106:985–989.

Dannenber, A.J.; Subbaramaiah, K. Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: Rationale and promise. *Cancer Cell*. 2003, 4:431–436.

De Pablos, L.M.; dos Santos, M.F.; Montero, E.; García-Granados, A.; Parra, A.; Osuna, A. Anticoccidial activity of maslinic acid against infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Parasitol Res*. 2010b, 107:601–604.

De Pablos, L.M.; González, G.; Rodrigues, R.; García-Granados, A.; Parra, A.; Osuna, A. Action of a pentacyclic triterpenoid, maslinic acid, against *Toxoplasma gondii*. *J Nat Prod*. 2010a, 73:831–834.

Deng, Y.; Ren, X.; Yang, L.; Lin, Y.; Wu, X. A JNK-dependent pathway is required for TNF $\alpha$ -induced apoptosis. *Cell*. 2003, 115:61–70.

Ding, J.; Sorensen, C.M.; Zhang, Q.; Jiang, H.; Jaitly, N.; Livesay, E.A.; Shen, Y.; Smith, R.D.; Metz, T.O. Capillary LC coupled with high-mass measurement accuracy mass spectrometry for metabolic profiling. *Anal Chem*. 2007, 79:6081–6093.



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, 40:758–762.

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

**E**spín, J.C.; González-Barrio, R.; Cerdá, B.; López-Bote, C.; Rey, A.I.; Tomás-Barberán, F.A. Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *J Agric Food Chem.* 2007, 55:10476–10485.

Evers, R.; Zaman, G.J.; van Deemter, L.; Jansen, H.; Calafat, J.; Oomen, L.C.; Oude Elferink, R.P.; Borst, P.; Schinkel A.H. Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. *J Clin Invest.* 1996, 97:1211–1218.

**F**earon, E.R.; Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990, 61:759–767.

Femia, A.P.; Dolara, P.; Luceri, C.; Salvadori, M.; Caderni, G. Mucin-depleted foci show strong activation of inflammatory markers in 1,2-dimethylhydrazine-induced carcinogenesis and are promoted by the inflammatory agent sodium dextran sulfate. *Int J Cancer.* 2009, 125:541–547.

Femia, A.P.; Giannini, A.; Fazi, M.; Tarquini, E.; Salvadori, M.; Roncucci, L.; Tonelli, F.; Dolara, P.; Caderni, G. Identification of mucin depleted foci in the human colon. *Cancer Prev Res (Phila).* 2008a, 1:562–567.

Femia, A.P.; Tarquini, E.; Salvadori, M.; Ferri, S.; Giannini, A.; Dolara, P.; Caderni, G. K-ras mutations and mucin profile in preneoplastic lesions and colon tumors induced in rats by 1,2-dimethylhydrazine. *Int J Cancer.* 2008b, 117–123.

Feng, X.; Luan, J.; Guo, F.F.; Li, D.P.; Chu, Z.Y. Microbial transformation of maslinic acid by *Cunninghamella blakesleana*. *J Mol Catal B Enzym.* 2012, 82:127–130.

Fernández-Navarro, M.; Peragón, J.; Amores, V.; de la Higuera, M.; Lupiáñez, J.A. 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.

Fernández-Navarro, M.; Peragón, J.; Esteban, F.J.; de la Higuera, M.; Lupiáñez, J.A. 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.

Fiala, E.S. Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane. *Cancer.* 1977, 40:2436–2445.

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

Furtado, R.A.; Rodrigues, E.P.; Araújo, F.R.; Oliveira, W.L.; Furtado M,A.; Castro, M.B.; Cunha, W.R.; Tavares, D.C. Ursolic acid and oleanolic acid suppress preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colon. *Toxicol Pathol*. 2008, 36:576–580.

**G**arcía-Granados, A, inventor. Universidad de Granada, titular. Procedimiento de aprovechamiento industrial de los ácidos oleanólico y maslínico contenidos en los subproductos de la molturación de la aceituna. Patent española. ES 2 111 498 B1, BOPI 1-9-1998.

GLOBOCAN2012. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 [Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization; 2014 [acces 10 de novembre de 2014]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>

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, 89:1829–1839.

Guidance for industry: Bioanalytical method validation [Internet]. Maryland: Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, U.S. Department of Health and Human Services; 2001 [acces 12 de desembre de 2014]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>

Guideline on bioanalytical method validation [Internet]. Londres: European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human use; 2011 [acces 12 de desembre de 2014]. Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf)

Guinda, A.; Rada, M.; Delgado, T.; Gutiérrez-Adánez, P.; Castellano, J.M. Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf. *J Agric Food Chem*. 2010, 58:9685–9691.

**H**agenbuch, B.; Meier, P.J. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta*. 2003, 1609:1–18.

He, X.; Liu, R.H. Triterpenoids isolated from apple peels have potent anti-proliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. *J Agric Food Chem*. 2007, 55:4366–4370.

Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000, 407:770–776.

Hernández, L.; González, C. Introducción al análisis instrumental. Barcelona: Ariel; 2002.

Holčapek, M.; Kolářová, 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.

Hsum, Y.W.; Yew, W.T.; Hong, P.L.; Soo, K.K.; Hoon, L.S.; Chieng, Y.C.; Mooi, L.Y. Cancer chemopreventive activity of maslinic acid: Suppression of COX-2 expression and inhibition of NF- $\kappa$ B and AP-1 activation in Raji cells. *Planta Med.* 2011, 77:152–157.

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, 672:169–174.

Hunter, J.; Hirst, B.H. Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997, 25:129–157.

Hussain Shaik, A.; Rasool, S.N.; Abdul Kareem, M.; Krushna, G.S.; Akhtar, P.M.; Devi, K.L. Maslinic acid protects against isoproterenol-induced cardiotoxicity in albino Wistar rats. *J Med Food.* 2012, 15:741–746.

Ishikawa, T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci.* 1992, 17:463–468.

Jaggi, M.; Rajendran, P.; Ramadoss, S.; Siddiqui, M. J. A., inventors. Dabur Research Fundation, titular. Betulinic acid derivatives having antiangiogenic activity, processes for producing such derivatives and their use for treating tumor associated angiogenesis. Patent nord-americana, US 6,403,816 B1, 2002.

Jass, J.R.; Sobin, L.H. Histological typing of intestinal tumours. Berlin: Springer-Verlag, 1989.

Jeong, D. W.; Kim, Y. H.; Kim, H. H.; Ji, H. Y.; Yoo, S. D.; Choi, W. R.; Lee, S. M.; Han, C. K.; Lee, H. S. Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats. *Biopharm Drug Dispos.* 2007, 28:51–57.

Jirásko, R.; Holčapek, M.; Nobilis, M. Identification of phase I and phase II metabolites of benfluron and dimefluron in rat urine using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2011, 25:2153–2162.

Johnson, R.L.; Fleet J.C. Animal models of colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2013, 32:39–61.

Juan, M.E.; Alfaras, I.; Planas, J.M. Colorectal cancer chemoprevention by *trans*-resveratrol. *Pharmacol Res.* 2012, 65:584–591.

Juan, M.E.; González-Pons, E.; Planas J.M. Multidrug Resistance Proteins restrain the intestinal absorption of *trans*-resveratrol in rats. *J Nutr.* 2010, 489–495.

Juan, M.E.; Planas, J.M.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Daniel, H.; Wenzel, U. Anti-proliferative 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, M.E.; Wenzel, U.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Daniel, H.; Planas, J.M. Olive fruit extracts inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr.* 2006, 136:2553–2557.

Juliano, R.L.; Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976, 455:152–162.

**K**alogeropoulos, N.; Chiou, A.; Ioannou, M.; Karathanos, V.T.; Hassapidou, M.; Andrikopoulos, N.K. 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.

Kanai, Y.; Hediger, M.A. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: Molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch.* 2004, 447:469–479.

Karin, M. Nuclear factor- $\kappa$ B in cancer development and progression. *Nature* 2006, 441:431–436.

Kebarle, 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, M.R.; Myburg, R.B.; van Heerden, F.R.; Musabayane, C.T. Effects of *Syzygium aromaticum*-derived triterpenes on postprandial blood glucose in streptozotocin-induced diabetic rats following carbohydrate challenge. *PLoS One.* 2013, 8:e81632.

Kim, D.H.; Han, K.M.; Chung, I.S.; Kim, D.K.; Kim, S.H.; Kwon, B.M.; Jeong, T.S.; Park, M.H., Ahn, E.M.; Baek, N.I. Triterpenoids from the flower of *Campsis grandiflora* K. Schum. as human acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase inhibitors. *Arch Pharm Res.* 2005, 28:550–556.

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.

Komura, H.; Iwaki, M. *In vitro* and *in vivo* small intestinal metabolism of CYP3A and UGT substrates in preclinical animals species and humans: species differences. *Drug Metab Rev.* 2011, 43:476–498.

Krüger, P.; Daneshfar, R.; Eckert, G.P.; Klein, J.; Volmer, D.A.; Bahr, U.; Müller, W.E.; Karas, M.; Schubert-Zsilavecz, M.; Abdel-Tawab, M. Metabolism of boswellic acids *in vitro* and *in vivo*. *Drug Metab Dispos.* 2008, 36:1135–1142.

**L**au, A.; Tymianski, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch.* 2010, 460:525–542.

Leary, R.J.; Lin J.C.; Cummins, J.; Boca, S.; Wood, L.D.; Parsons, D.W.; Jones, S.; Sjöblom, T.; Park, B.H. *et al.* Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008, 105:16224–16229.

Li, C.; Yang, Z.; Li, Z.; Ma, Y.; Zhang, L.; Zheng, C.; Qiu W.; Wu, X.; Wang, X.; Li, H.; *et al.* Maslinic acid suppresses osteoclastogenesis and prevents ovariectomy-induced bone loss by regulating RANKL-mediated NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways. *J Bone Miner Res*. 2011b, 26:644–656.

Li, C.; Yang, Z.; Zhai, C.; Qiu, W.; Li, D.; Yi, Z.; Wang, L.; Tang, J.; Qian, M.; Luo, J.; *et al.* Maslinic acid potentiates the anti-tumor activity of tumor necrosis factor  $\alpha$  by inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Mol Cancer*. 2010, 73:1–73:13.

Li, G.L.; You, J.M.; Song, C.H.; Xia, L.; Zheng, J.; Suo, Y.R. 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*. 2011a, 59:2972–2979.

Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S.M.; Ahmad, M.; Alnemri, E.S.; Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997, 91:479–489.

Li, X.; Zhao, Y.; Hou, S.; Huang, S.; Yang, W.; Lai, X.; Zeng, X. Identification of the bioactive components of orally administered *Lithocarpus polystachyus* Rehd and their metabolites in rats by liquid chromatography coupled to LTQ Orbitrap mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014, 962:37–43.

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, 125:509–515.

Lim, H.K.; Chen, J.; Sensenhauser, C.; Cook, K.; Subrahmanyam, V. Metabolite identification by data-dependent accurate mass spectrometric analysis at resolving power of 60,000 in external calibration mode using an LTQ/Orbitrap. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2007, 21:1821–1832.

Lin, C.C.; Huang, C.Y.; Mong, M.C.; Chan, C.Y.; Yin, M.C. Antiangiogenic potential of three triterpenic acids in human liver cancer cells. *J Agric Food Chem*. 2011, 59:755–762.

Liu, J.; Sun, H.; Duan, W.; Mu, D.; Zhang, L. Maslinic acid reduces blood glucose in KK- $A^Y$  mice. *Biol Pharm Bull*. 2007a, 30:2075–2078.

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, Y.P.; Mao, L.F.; Shang, J.; Sun, H.B.; Zhang, L.Y. Maslinic acid modulates glycogen metabolism by enhancing the insulin signaling pathway and inhibiting glycogen phosphorylase. *Chin J Nat Med*. 2014, 12:259–265.

Lozano-Mena, G.; Juan, M.E.; García-Granados, A.; Planas, J.M. Determination of maslinic acid, a pentacyclic triterpene from olives, in rat plasma by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem.* 2012, 60:10220–10225.

Lozano-Mena, G.; Sánchez-González, M.; Juan, M. E.; Planas, J. M. Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives – a promising nutraceutical? *Molecules.* 2014, 19: 11538–11559.

Lu, H.; Xi, C.; Chen, J.; Li, W. Determination of triterpenoid acids in leaves of *Eriobotrya japonica* collected at in different seasons. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2009, 34:2353–2355.

**M**ackness, M.; Mackness, B. Targeting paraoxonase-1 in atherosclerosis. *Expert Opin Ther Targets.* 2013, 17:829–837.

Magnuson, B.A.; Carr, I.; Bird R,P. Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic tumor incidence in rats fed cholic acid. *Cancer Res.* 1993, 53:4499–4504.

Makarov, A.; Denisov, E.; Kholomeev, A.; Balschun, W.; Lange, O.; Strupat, K.; Horning, S. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/Orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem.* 2006, 78:2113–2120.

Márquez-Martín, A.; de la Puerta, R.; Fernández-Arche, A.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Yaqoob P. Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. *Cytokine.* 2006, 36:211–217.

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, 94:229–237.

Masayuki Takahashi b, Satoru Yasuda b, Juergen Mueller aRufino-Palomares, E.; Reyes-Zurita, F.J.; Fuentes-Almagro, C.A.; de la Higuera, M.; Lupiáñez, J.A.; 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, 11:3312–3325.

Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem.* 2003, 75:3019–3030.

McLellan, E.A.; Medline, A.; Bird, R.P. Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions. *Cancer Res.* 1991, 51:5270–5274.

Megaraj, V.; Ding, X.; Fang, C.; Kovalchuk, N.; Zhu, Y.; Zhang, QY. Role of hepatic and intestinal p450 enzymes in the metabolic activation of the colon carcinogen azoxymethane in mice. *Chem Res Toxicol.* 2014, 27:656–662.

Mekkawy, A.H.; Morris, D.L.; Pourgholami, M.H. Urokinase plasminogen activator system as a potential target for cancer therapy. *Future Oncol.* 2009, 5:1487–1499.

Micheau, O.; Tschopp, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell.* 2003, 114:181–190.

Miyashita, T.; Krajewski, S.; Krajewska, M.; Wang, H.G.; Lin, H.K.; Liebermann, D.A.; Hoffman, B.; Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene.* 1994, 9:1799–1805.

Moncada, S.; Erusalimsky, J.D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002, 3:214–220.

Moneriz, C.; Marín-García, P.; Bautista, J.M.; Diez, A.; Puyet, A. Parasitostatic effect of maslinic acid. II. Survival increase and immune protection in lethal *Plasmodium yoelii*-infected mice. *Malar J.* 2011b, 10:1–10:9.

Moneriz, C.; Marín-García, P.; García-Granados, A.; Bautista, J.M.; Diez, A.; Puyet, A. Parasitostatic effect of maslinic acid. I. Growth arrest of *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic stages. *Malar J.* 2011a, 10:1–10:10.

Montilla, M.P.; Agil, A.; Navarro, M.C.; Jiménez, M.I.; García-Granados, A.; Parra, A.; Cabo, M.M. Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Med.* 2003, 69:472–474.

Moon, R.C.; Fricks, C.M. Influence of gonadal hormones and age on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Cancer.* 1977, 40(5 Suppl):2502–2508.

Mori, H.; Hata, K.; Yamada, Y.; Kuno, T.; Hara, A. Significance and role of early-lesions in experimental colorectal carcinogenesis. *Chem Biol Interact.* 2005, 155:1–9.

Moro, M.A.; de Alba, J.; Leza, J.C.; Lorenzo, P.; Fernández, A.P.; Bentura, M.L.; Boscá, L.; Rodrigo, J.; Lizasoain, I. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur J Neurosci.* 1998, 10:445–456.

Moyer, M.P. Culture of human gastrointestinal epithelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1983, 174:12–15.

Multidrug resistance proteins restrain the intestinal absorption of *trans*-resveratrol in rats. *J Nutr.* 2010, 140:489–495.

Murphy, C.D. Drug metabolism in microorganisms. *Biotechnol Lett.* 2015, 37:19–28

**N**apetschnig, J.; Wu, H. Molecular basis of NF- $\kappa$ B signaling. *Annu Rev Biophys.* 2013, 42:443–468.

Nicklas, W. (coordinador); Baneux, P.; Boot, R.; Decelle, T.; Deeny, A.A.; Fumanelli, M.; Illgen-Wilcke, B. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. Recommendations of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Health Monitoring of Rodent and Rabbit Colonies accepted by the FELASA Board of Management, 9 June 2001. *Lab Anim.* 2002, 36:20–42.

Nieto, F.R.; Cobos, E.J.; Entrena, J.M.; Parra, A.; García-Granados, A.; Baeyens, J.M. Antiallodynic and analgesic effects of maslinic acid, a pentacyclic triterpenoid from *Olea europaea*. *J Nat Prod.* 2013, 76:737–740.

**O**micinski, C.J.; Vanden Heuvel, J.P.; Perdew, G.H.; Peters, J.M. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol Sci.* 2011, 120 Suppl 1:S49-75.

Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). Guidelines for testing chemicals. Repeated dose 28-d oral toxicity study in rodents, no. 407, 2008. OECD, Paris, France.

Ott, M.; Gogvadze, V.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007, 12:913–922.

**P**ark, S.Y.; Nho, C.W.; Kwon, D.Y.; Kang, Y.H.; Lee, K.W.; Park, J.H. Maslinic acid inhibits the metastatic capacity of DU145 human prostate cancer cells: Possible mediation via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  signalling. *Br J Nutr.* 2013, 109:210–222.

Pegg, A.E.; Hawks, A. Increased transfer ribonucleic acid methylase activity in tumours induced in the mouse colon by the administration of 1,2-dimethylhydrazine. *Biochem J.* 1971, 122:121–123.

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, 61:6671–6678.

Pérez-Camino, M. C.; Cert, A. Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J Agric Food Chem.* 1999, 47:1558–1562.

Perše, M.; Cerar, A. Morphological and molecular alterations in 1,2-dimethylhydrazine- and azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol.* 2011, 473964.

Perše, M.; Cerar, A. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat - experimental colorectal carcinogenesis. *Radiol Oncol.* 2005, 39:61–70.

Petzinger, E.; Geyer, J. Drug transporters in pharmacokinetics. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2006, 372:465–475.



Pialoux, V.; Mounier, R.; Brown, A.D.; Steinback, C.D.; Rawling, J.M.; Poulin, M.J. Relationship between oxidative stress and HIF-1 $\alpha$  mRNA during sustained hypoxia in humans. *Free Radic Biol Med.* 2009, 46:321–326.

Poekel, D.; Werz, O. Boswellic acids: biological actions and molecular targets. *Curr Med Chem.* 2006, 13:3359–3369.

Ponz, F.; Ilundain, A.; Lluch, M. Method for successive absorptions with intestinal perfusion *in vivo*. *Rev Esp Fisiol.* 1979, 35:97–103.

Porth, C.M. Fisiopatología. 7<sup>ª</sup> edición. Madrid: Médica Panamericana; 2006.

Prades, J.; Vögler, O.; Alemany, R.; Gómez-Florit, M.; Funari, S.S.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Barceló, F. Plant pentacyclic triterpenic acids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochim Biophys Acta.* 2011, 1808:752–760.

Pretlow, T.P.; Barrow, B.J.; Ashton, W.S.; O'Riordan, M.A.; Pretlow, T.G.; Jurcisek, J.A.; Stellato, T.A. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res.* 1991, 51:1564–1567.

Pretlow, T.P.; Pretlow, T.G. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer?. *Biochim et Biophys Acta.* 2005, 1756:83–96.

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.

**Q**ian, 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.* 2011a, 670:148–153.

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.* 2011b, 651:59–65.

**R**ada, M.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Guinda, A. Determination of triterpenic acids in human serum by high-performance liquid chromatography: triterpenoid interaction with serum protein. *J Agric Food Chem.* 2011, 59:2308–2313.

Rankin, E.B.; Giaccia, A.J. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 2008, 15:678–685.

Reyes, F.J.; Centelles, J.J.; Lupiáñez, J.A.; Cascante, M. (2 $\alpha$ ,3 $\beta$ )-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, 580:6302–6310.

Reyes-Zurita, F.J.; Pachón-Peña, G.; Lizárraga, D.; Rufino-Palomares, E.E.; Cascante, M.; Lupiáñez, J.A. The natural triterpene maslinic acid induces apoptosis in HT29 colon cancer cells by a JNK-p53-dependent mechanism. *BMC Cancer*. 2011, 154:1–154:13.

Reyes-Zurita, F.J.; Rufino-Palomares, E.E.; Lupiáñez, J.A.; 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.

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.

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.

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

Rosenberg, D.W.; Giardina, C.; Tanaka, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2009, 30:183–196.

Rozeňnal, V.; Nakai, D.; Hoepner, U.; Fischer, T.; Kamiyama, E. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. *Eur J Pharm Sci*. 2012, 46:367–373.

Russell, W.M.S.; Burch, R.L. The principles of humane experimental technique. Londres: Methuen; 1959.

**S**altiel, A.R.; Kahn, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001, 414: 799–806.

Sánchez-Ávila, N.; Priego-Capote, F.; Ruiz-Jiménez, J.; de Castro, M.D. 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, 78:40–48.

Sánchez-González, M.; Colom, H.; Lozano-Mena, G.; Juan, M.E.; Planas, JM. Population pharmacokinetics of maslinic acid, a triterpene from olives, after intravenous and oral administration in rats. *Mol Nutr Food Res*. 2014, 58:1970–1979.

Sánchez-González, M.; Lozano-Mena, G.; Juan, M. E.; García-Granados, A.; Planas, J.M. Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L. *Mol Nutr Food Res*. 2013, 57:339–346.

Sánchez-González, M.; Lozano-Mena, G.; Juan, M.E.; 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, 141:4375–4381.

Sánchez-González, M.; Lozano-Mena, G.; Parra, A.; Juan, M.E.; Planas, J.M. Identification in rat plasma and urine by LTQ-Orbitrap mass spectrometry of the metabolites of maslinic acid, a triterpene from olives. *J Agric Food Chem.* 2015, doi: 10.1021/jf505379g

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

Schulze-Osthoff, K.; Ferrari, D.; Riehemann, K.; Wesselborg, S. Regulation of NF-kappa B activation by MAP kinase cascades. *Immunobiology.* 1997, 198:35–49.

Sellers, R.S.; Morton, D.; Michael, B.; Roome, N.; Johnson, J.K.; Yano, B.L.; Perry, R.; Schafer, K. Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicol Pathol.* 2007, 35:751–755.

Shin, S.; Kang, C.A. Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. *Lett Appl Microbiol.* 2003, 36:111–115.

Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España 2014 [monografía a Internet]. Madrid: SEOM; 2014 [acceso 8 de noviembre de 2014]. [http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las\\_cifras\\_del\\_cancer\\_2014.pdf](http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_cifras_del_cancer_2014.pdf)

Sohn, O.S.; Fiala, E.S.; Requeijo, S.P.; Weisburger, J.H.; González, F.J. Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. *Cancer Res.* 2001, 61:8435–8440.

Song, M.; Hang, T. J.; Wang, Y.; Jiang, L.; Wu, X. L.; 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, 40:190–196.

Spicer, S.S. Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. *J Histochem Cytochem.* 1965, 13:211–234.

Stappaerts, J.; Brouwers, J.; Annaert, P.; Augustijns, P. *In situ* perfusion in rodents to explore intestinal drug absorption: Challenges and opportunities. *Int J Pharm.* 2014, 478(2):665–681.

Stennicke, H.R.; Jürgensmeier, J.M.; Shin, H.; Deveraux, Q.; Wolf, B.B.; Yang, X.; Zhou, Q.; Ellerby, H.M.; Ellerby, L.M.; Bredesen, D.; *et al.* Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 27084–27090.

Stiti, N.; Triki, S.; Hartmann, M.A. Formation of triterpenoids throughout *Olea europaea* fruit

ontogeny. *Lipids*. 2007, 42:55–67.

Stralka, D.; Strobel, H.W. Characterization of cytochrome P450-dependent dimethylhydrazine metabolism in human colon microsomes. *Cancer*. 1991, 68:2363–2369.

Sultana, N.; Lee, N.H. Antielastase and free radical scavenging activities of compounds from the stems of *Cornus kousa*. *Phytother Res*. 2007, 21:1171–1176.

Sun, M.; Tang, Y.; Ding, T.; Liu, M.; Wang, X. Investigation of cytochrome P450 inhibitory properties of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L., and its structure–activity relationship. *Phytomedicine*. 2015, 22:56–65.

Suzuki, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci*. 2013, 70:631–659.

**T**akahashi, M.; Wakabayashi, K. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci*. 2004, 95:475–480.

Tanaka, T. Colorectal carcinogenesis: review of human and experimental animal studies. *J Carcinog*. 2009, 8:5.

Tang, S.C.; Hendriks, J.J.; Beijnen, J.H.; Schinkel, A.H. Genetically modified mouse models for oral drug absorption and disposition. *Curr Opin Pharmacol*. 2013, 13:853–858.

Tang, X.Z.; Guan, T.; Qian, Y.S.; Li, Y.M.; Sun, H.B.; Huang, J.H.; 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.

The United States Pharmacopeia and The National Formulary, USP31-NF26. 2008, 1225, 752–756.

Thiebaut, F.; Tsuruo, T.; Hamada, H.; Gottesman, M.M.; Pastan, I.; Willingham, M.C. Cellular localization of the multi- drug resistance gene product in normal human tissues, *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987, 84:7735–7738.

Tortora, G.J.; Derrickson, B. Principios de Anatomía y Fisiología. 11<sup>a</sup> edición. Madrid: Médica Panamericana; 2006.

Totty, A. Mucins. En: Bancroft, J.D.; Gamble, M. Theory and practice of histological techniques. 5<sup>a</sup> edición. Londres: Churchill Livingstone; 2002.

Tschesche, R.; Fugmann, R. Crataegolsäure, ein neues triterpenoid aus *Crataegus oxyacantha*. Ein Beitrag zur Konstitution der  $\alpha$ -Amyrine. *Chem Ber*. 1951, 84:810–826.

Tschesche, R.; Heesch, A.; Fugmann, R. Über triterpenoide, III. Mitteil.: Zur Kenntnis der Crataegolsäure. *Chem Ber*. 1953, 86:626–629.

Tschesche, R.; Poppel, G.; Über Triterpene, V. Zur Kenntnis der crataegolsäure und über zwei neue triterpencarbonsäuren aus *Crataegus oxyacantha* L. *Chem Ber.* 1959, 92:320–328.

Tsuruta, F.; Sunayama, J.; Mori, Y.; Hattori, S.; Shimizu, S.; Tsujimoto, Y.; Yoshioka, K.; Masuyama, N.; Gotoh, Y. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J.* 2004, 23:1889–1899.

**U**deani, G.P.; Zhao, G.M.; Geun Shin, Y.; Cooke, B.P.; Graham, J.; Beecher, C.W.W.; Kinghorn, A.D.; Pezzuto, J.M. Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 Mice. *Biopharm Drug Dispos.* 1999, 20:379–383.

Ullah, F.; Hussain, H.; Hussain, J.; Bukhari, I.A.; Khan, M.T.; Choudhary, M.I.; Gilani, A.H.; Ahmad, V.U. Tyrosinase inhibitory pentacyclic triterpenes and analgesic and spasmolytic activities of methanol extracts of *Rhododendron collettianum*. *Phytother Res.* 2007, 21:1076–1081.

**V**an 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, 877:2198–2207.

Van Waterschoot, R.A.; Schinkel, A.H. A critical analysis of the interplay between cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: recent insights from knockout and transgenic mice. *Pharmacol Rev.* 2011, 63:390–410.

Villar, V.H.; Vögler, O.; Barceló, F.; Gómez-Florit, M.; Martínez-Serra, J.; Obrador-Hevia, A.; Martín-Broto, J.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Alemany, R. Oleanolic and maslinic acid sensitize soft tissue sarcoma cells to doxorubicin by inhibiting the multidrug resistance protein MRP-1, but not P-glycoprotein. *J Nutr Biochem.* 2014, 25:429–438.

Vioque, A.; Morris, L. Minor components of olive oils. I. Triterpenoid acids in an acetone-extracted orujo oil. *J Am Oil Chem Soc.* 1961, 38:458–488.

Voipio, H.M. (coordinadora); Baneux, P.; Gomez de Segura, I.A.; Hau, J.; Wolfensohn, S. Guidelines for the veterinary care of laboratory animals: report of the FELASA/ECLAM/ESLAV Joint Working Group on Veterinary Care. *Lab Anim.* 2008, 42:1–11.

**W**ang, R.; Wang, W.; Wang, L.; Liu, R.; Ding, Y.; Du, L. Constituents of the flowers of *Punica granatum*. *Fitoterapia.* 2006, 77:534–537.

Wen, X.; Sun, H.; Liu, J.; Cheng, K.; Zhang, P.; Zhang, L.; Hao, J.; Zhang, L.; Ni, P.; Zographos, S.E.; *et al.* Naturally occurring pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase: Synthesis, structure-activity relationships, and X-ray crystallographic studies. *J Med Chem.* 2008, 51:3540–3554.

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: 4944–4948.

Wilkinson, J.C.; Wilkinson, A.S.; Scott, F.L.; Csomos, R.A.; Salvesen, G.S.; Duckett, C.S. Neutralization of Smac/Diablo by inhibitors of apoptosis (IAPs). A caspase-independent mechanism for apoptotic inhibition. *J Biol Chem*. 2004, 279:51082–51090.

Wilson, T.H.; Wiseman, G. Metabolic activity of the small intestine of the rat and golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Physiol*. 1954, 123:126–130.

Wood, L.D.; Parsons, D.W.; Jones, S.; Lin, J.; Sjöblom, T.; Leary, R.J.; Shen, D.; Boca, S.M.; Barber, T.; Ptak, J. *et al*. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2007, 318(5853):1108–1113.

Wu, D.M.; Zhao, D.; Li, D.Z.; Xu, D.Y.; Chu, W.F.; Wang, X.F. Maslinic acid induces apoptosis in salivary gland adenoid cystic carcinoma cells by Ca<sup>2+</sup>-evoked p38 signaling pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2011, 383:321–330.

**X**ia, 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: Anal Technol Biomed Life Sci*. 2011, 879:219–224.

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.

Xu, R.; Fazio, G.C.; Matsuda, S.P.T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*. 2004, 65:261–291.

**Y**amada, Y.; Yoshimi, N.; Hirose, Y.; Kawabata, K.; Matsunaga, K.; Shimizu, M.; Hara, A.; Mori, H. Frequent  $\beta$ -catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 2000, 60:3323–3327.

Yan, S.L.; Yang, H.T.; Lee, H.L.; Yin, M.C. Protective effects of maslinic acid against alcohol-induced acute liver injury in mice. *Food Chem Toxicol*. 2014, 74:149–155.

Yang, M.; Wang, G.J.; Wang, S.J.; Li, X.T.; Xu, Y.P.; Wang, S.P.; Xiang, J.D.; Pan, S.R.; Cao, G.X.; Ye, W.C. Quantitative analysis of 23-hydroxybetulinic acid in mouse plasma using electrospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2005, 19:1619–1623.

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.

Yoshida, T.; Okuda, T.; Memon, M.U.; Shingu, T. Tannins of rosaceous medicinal plants. Part 2. Gemins A, B, and C, new dimeric ellagitannins from *Geum japonicum*. *J Chem Soc Perkin Trans*. 1985,

1:315–321.

Zhang, J.; Xu, X.J.; Xu, W.; Huang, J.; Zhu, D.Y.; Qiu, X.H. Rapid characterization and identification of flavonoids in Radix Astragali by Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography coupled with Linear Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometry. *J Chromatogr Sci.* 2014b, doi: 10.1093/chromsci/bmu155

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.* 2014a, 392:281–287.

Zhao, W.J.; Wang, B.J.; Wei, C.M.; Yuan, G.Y.; Bu, F.L.; Guo, R.C. Determination of glycyrrhetic acid in human plasma by HPLC-MS method and investigation of its pharmacokinetics. *J Clin Pharm Ther.* 2008, 33:289–294.

Zheng, Y.; Kramer, P.M.; Lubet, R.A.; Steele, V.E.; Kelloff, G.J.; Pereira, M.A. Effect of retinoids on AOM-induced colon cancer in rats: modulation of cell proliferation, apoptosis and aberrant crypt foci. *Carcinogenesis.* 1999, 20:255–260.

Zhong, H.; de Marzo, A.M.; Laughner, E.; Lim, M.; Hilton, D.A.; Zagzag, D.; Buechler, P.; Isaacs, W.B.; Semenza, G.L.; Simons, J.W. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999, 59:5830–5835.

Zou, Z.M.; Cong, P.Z. Studies on the chemical constituents from roots of *Agastache rugosa*. *Yao Xue Xue Bao.* 1991, 26:906–910.

## **ANNEX I**

**Articles derivats de la tesi**





Articles derivats de la tesi:

**Lozano-Mena, G.**; Juan, M.E.; García-Granados, A.; Planas, J.M. Determination of maslinic acid, a pentacyclic triterpene from olives, in rat plasma by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem.* 2012, 60:10220–10225.

Sánchez-González, M.; **Lozano-Mena, G.**; Juan, M. E.; García-Granados, A.; Planas, J.M. Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L. *Mol Nutr Food Res.* 2013, 57:339–346.

**Lozano-Mena, G.**; Sánchez-González, M.; Juan, M. E.; Planas, J. M. Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives – a promising nutraceutical? *Molecules.* 2014, 19: 11538–11559.



# Determination of Maslinic Acid, a Pentacyclic Triterpene from Olives, in Rat Plasma by High-Performance Liquid Chromatography

Glòria Lozano-Mena,<sup>†</sup> M. Emília Juan,<sup>†</sup> Andrés García-Granados,<sup>‡</sup> and Joana M. Planas<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Departament de Fisiologia and Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona (UB), Avinguda de Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

<sup>‡</sup>Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus Fuentenueva, 18071 Granada, Spain

**ABSTRACT:** Maslinic acid, a pentacyclic triterpene from olives, has been reported to exert beneficial effects on health, including anticarcinogenic activity. Despite its importance, little is known about its bioavailability in both humans and animals. A fundamental step for this evaluation consisted of measuring this compound in blood. Therefore, a simple high-performance liquid chromatography (HPLC) method with diode array detection has been developed. Maslinic acid contained in plasma was extracted twice using ethyl acetate. After centrifugation, the organic fraction was evaporated to dryness and the residue was reconstituted with methanol/water (75:25, v/v) and analyzed by HPLC. The method was validated by obtaining a linear correlation ( $r^2 = 0.999$ ) and an average recovery of 99%. Precision expressed as the coefficient of variation ranged from 1.23 to 9.06%. The oral administration of maslinic acid (50 mg/kg) to rats and its subsequent detection in plasma showed that the method is suitable for absorption, distribution, and metabolism studies.

**KEYWORDS:** Maslinic acid, HPLC, pentacyclic triterpenic acids, olives, rat

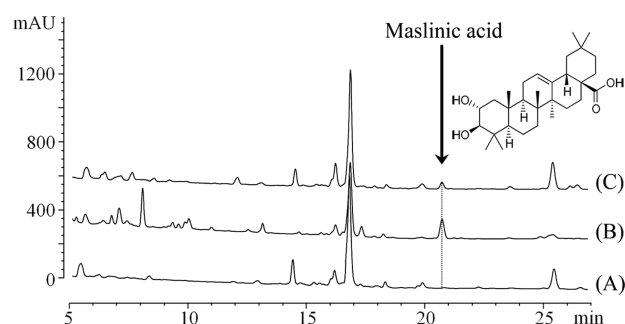
## INTRODUCTION

The different regions of the Mediterranean basin have their own dietary traditions, but in all of them, olives and olive oil are regularly consumed.<sup>1</sup> Olive oil, rich in monounsaturated fatty acids and bioactive compounds, has been associated with a reduced risk of cardiovascular disease and certain cancers.<sup>2,3</sup> However, scant attention has been given to the fruit of *Olea europaea* L., which yields the nutritious edible oil and harbors compounds with important biological properties.<sup>4,5</sup> In addition to their fatty acid profile, table olives contain tocopherols, phospholipids, carotenoids, phenols, and triterpenic acids.<sup>6</sup> Among the latter, maslinic acid (Figure 1) is the most abundant pentacyclic triterpene,<sup>7</sup> which is mainly localized in the cuticular lipid layer of the drupe, where it protects the integrity of the fruit by acting as an insect antifeedant<sup>8</sup> and antimicrobial agent.<sup>6</sup> The concentration of this compound in commercial table olives ranges from  $287.1 \pm 66.6$  to  $1318.4 \pm 401.0$  mg/kg

depending upon the variety and the method of processing.<sup>9</sup> The amount of maslinic acid in the oil is much lower than in the fruit, and its concentration depends upon the oil extraction process. In extra virgin olive oil with acidity inferior to 1%, maslinic acid can be found at  $64.2 \pm 8.1$  mg/kg, whereas it increases to  $193.9 \pm 14.0$  mg/kg in virgin olive oil.<sup>10</sup>

Recently, much attention has been paid to maslinic acid because of its beneficial effects on health.<sup>4,11–14</sup> An extract from the skin of olive fruits containing 73.25% maslinic acid and 25.75% oleanolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells.<sup>4</sup> Further studies demonstrated that maslinic acid was the compound with the highest antitumoral effect that inhibits cell growth with an  $EC_{50}$  of  $101.2 \pm 7.8$   $\mu$ M without cytotoxicity and with pro-apoptotic activity at 25  $\mu$ M.<sup>12</sup> The antitumor effect has also been reported in different human tumor cell lines, such as astrocytoma,<sup>15</sup> pancreatic cancer cells,<sup>13</sup> and human breast cancer cells.<sup>16</sup> Moreover, maslinic acid, an inhibitor of glycogen phosphorylase,<sup>17</sup> has been proposed as a promising antidiabetic agent for its prevention of hyperglycemia in mice treated with adrenalin<sup>18</sup> and in KK-A<sup>y</sup> mice, an animal model of genetic type 2 diabetes.<sup>11</sup> Recently, a neuroprotective activity has been described, because this pentacyclic triterpene reduces cerebral ischemic injury in hyperglycemic rats.<sup>14</sup> In addition, maslinic acid elicits multiple biological activities, such as antioxidant,<sup>19</sup> antihypertensive,<sup>20</sup> and antiparasitic.<sup>21</sup>

Despite the beneficial effects on health described for maslinic acid, there is a lack of knowledge about its absorption, distribution, and metabolism in either humans or animals. The



**Figure 1.** HPLC chromatograms of (A) rat blank plasma, (B) blank plasma spiked with 25  $\mu$ M maslinic acid, and (C) plasma obtained 60 min after the oral administration of 50 mg/kg of maslinic acid to Sprague–Dawley rats.

**Received:** June 6, 2012

**Revised:** September 14, 2012

**Accepted:** September 25, 2012

**Published:** September 25, 2012

first step in *in vivo* physiological and pharmacokinetic studies is to set up a method to determine this pentacyclic triterpene in plasma. Therefore, the aim of the present study was to develop a procedure to determine maslinic acid in rat plasma by liquid–liquid extraction followed by high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis with diode array detection. The method was fully validated and applied to determine the concentration of maslinic acid in rat plasma after the oral administration of 50 mg/kg.

## MATERIALS AND METHODS

**Instrument.** HPLC analyses were performed on an Agilent model 1100 gradient liquid chromatograph equipped with an automatic injector and a diode array ultraviolet–visible (UV–vis) detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). A ChemStation for LC 3D software system (Rev. A.10.02) from Agilent Technologies controlled the equipment and performed the data processing. Separation was performed on a reversed-phase Luna C18 column (250 × 4.6 mm; 4 μm) preceded by a security guard cartridge of the same material, both provided by Phenomenex (Torrance, CA).

**Chemicals and Reagents.** Maslinic acid was obtained from olive pomace according to the patented method from García-Granados.<sup>22</sup> Briefly, the process comprises selective extractions and fractionation of the resulting mixtures with the use of hexane and ethyl acetate as solvents. The product obtained is a chemically pure white powder comprising 99.9% maslinic acid. Acetonitrile (ultra-gradient HPLC grade) and methanol were from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands), and glacial acetic acid was from Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Spain). All of the solvents used were HPLC-grade. Other chemicals employed were analytical-grade and obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Water used in all experiments was passed through a Milli-Q water purification system (18 mΩ) (Millipore, Milan, Italy).

**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 cycles, temperature of  $22 \pm 3$  °C, and relative humidity of 40–70%. They received a standard diet (2014 Teklad Global 14%, Harlan, Barcelona, Spain) and water *ad libitum*. Handling and killing of 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 intramuscular injection of 90 mg/kg of ketamine (Imalgene 1000, Merial Laboratorios S.A., Barcelona, Spain) and 10 mg/kg of xylazine (Rompun 2%, Química Farmacéutica Bayer S.A., Barcelona, Spain). All rat manipulations were carried out in the morning to minimize the effects of circadian rhythms.

**Preparation of Plasma Samples.** Plasma samples were treated by liquid–liquid extraction with ethyl acetate. An aliquot of 500 μL was added with 4 mL of ethyl acetate in glass tubes, which were vigorously vortex-mixed for 3 min and centrifuged at 1500×g for 30 min at 4 °C. The supernatant was transferred to another tube, and the pellet underwent a second extraction. The organic layers were combined and evaporated to dryness with a Concentrator 5301 (Eppendorf Ibérica S.L., San Sebastián de los Reyes, Spain) at 45 °C. The residue was reconstituted in 400 μL of methanol/water (75:25, v/v), vortex-mixed for 30 s, and centrifuged at 12000×g for 5 min at 4 °C. The supernatant was transferred to an amber vial for HPLC analysis.

**HPLC Procedure.** An aliquot of 100 μL of the sample was injected into a C18 reversed-phase column kept at 40 °C. The mobile phase included solvent A, consisting of 0.05% acetic acid in deionized water, and solvent B, containing 100% acetonitrile. The flow rate was 1 mL/min. Separation was performed using the gradient elution program: 0 min, 60% A and 40% B; 5 min, 50% A and 50% B; 10 min, 40% A and 60% B; 15 min, 30% A and 70% B; 20 min, 30% A and 70% B; 25 min, 25% A and 75% B; 30 min, 20% A and 80% B; 35 min, 0% A and 100%

B; and 40 min, 0% A and 100% B. There was a 5 min delay prior to the injection of the next sample to ensure re-equilibration of the column.

The chromatograms were obtained according to the retention time, with detection at 200 nm, at which the absorbance of maslinic acid presents its maximum. Peak identification of this compound was carried out by comparison of the retention time and its UV spectra (from 200 to 400 nm). Quantification of maslinic acid was performed using the external standard method. Calibration curves were constructed after spiking relevant concentrations of this compound in blank plasma. The standard curves were characterized by regression coefficients of  $r^2$  equal to 0.99 or above. The results of the analyses are expressed in micromoles of maslinic acid per liter.

**Method Validation.** To prove the suitability of the developed analytical method, validation was performed according to *The United States Pharmacopeia*.<sup>23</sup>

**Samples.** A pool of plasma obtained from fasted Sprague–Dawley rats that were not administered with maslinic acid was used. Aliquots of the pooled plasma were stored at  $-20$  °C until the analyses were performed. A total of 475 μL of plasma was spiked with 25 μL of working standard solutions to obtain the calibration standards at final concentrations of 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, and 25 μM and was stirred in the vortex for 1 min before being extracted, as indicated in sample preparation. Calibration standards were freshly prepared before use. A stock solution of maslinic acid was obtained by dissolving the pure standard in 80% (v/v) methanol, stored at 4 °C, and used within 4 weeks.

**Linearity.** Calibration curves of maslinic acid were prepared in the range of application of the analytical method. Integrated peak areas were plotted against the analyte concentration, and linear regression analysis was performed by the least-squares method.

**Recovery.** Recoveries were measured by spiking blank plasma samples with 1, 2.5, 5, 10, 15, and 25 μM maslinic acid. Absolute recoveries were calculated by comparing the peak area ratio from spiked samples to those of the corresponding concentrations injected directly without extraction into the HPLC system.

**Precision and Accuracy.** The precision of the analytical method was determined by assaying a sufficient number of plasma samples ( $n = 4–6$ ) at six different concentrations of maslinic acid ranging from 1 to 25 μM and was expressed as the relative standard deviation (% RSD, coefficient of variation). Peak areas were considered to calculate the concentration and establish the precision. The intra- and interday precisions were determined by analyzing the spiked samples prepared within a day and on three different days, respectively.

Accuracy was estimated on the basis of the mean percentage of error of the measured concentration ( $\text{con}_M$ ) to the theoretical concentration ( $\text{con}_T$ ) according to the following equation:

$$\text{bias (\%)} = \left( \frac{\text{con}_T - \text{con}_M}{\text{con}_T} \right) \times 100$$

**Sensitivity.** The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated by measuring the analytical background response, running six blank plasma samples using the maximum sensitivity allowed by the system. The signal-to-noise ratio was used to determine the LOD, and it was estimated as the concentration of maslinic acid in plasma samples that generated a peak with an area at least 3 times higher than the baseline noise. LOQ was considered to be 10 times superior to the baseline noise. The LOQ was subsequently validated by the analysis of six plasma samples known to be near the LOQ.

**Selectivity.** The specificity of the method was determined by comparing the chromatograms of six independent blank plasma samples to the corresponding spiked samples.

**Method Application.** Maslinic acid was administered orally to overnight fasted rats at a dose of 50 mg/kg. Given that this compound is insoluble in water, it was solubilized using (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin at 40% and sodium carboxymethylcellulose at 0.5%, following a patented procedure described for betulonic acid.<sup>24</sup> Blood was collected from the saphenous vein<sup>25</sup> at 0, 10, 30, and 60 min and placed in Microvette CB300 tubes (Sarstedt, Granollers, Spain)

containing EDTA-K2 as an anticoagulant. Plasma was obtained by centrifugation at 1500g for 15 min at 4 °C, and the analyte was extracted using the protocol described above.

## RESULTS

### Optimization of the Chromatographic Conditions.

The chromatographic conditions were optimized to achieve the maximum sensitivity and selectivity allowed by the system. The analysis of maslinic acid was attempted using reversed-phase liquid chromatography (LC), with gradient elution of aqueous and organic mobile phases. To assay acidic compounds by HPLC, the mobile phase is often acidified to improve the chromatographic peak shape and the retention time of the analytes. Therefore, water with 0.05, 0.1, and 0.5% formic acid or 0.05, 1.5, and 3% acetic acid was evaluated as the aqueous solvent. Acidification with 0.05% acetic acid provided the best chromatograms with a retention time for maslinic acid of 20.9 min as well as good peak shapes and areas. In contrast, no peak of maslinic acid was observed when higher amounts of acetic acid were used. Formic acid was not selected because it gave lower peak areas and the retention time of maslinic acid was delayed to 29 min. With regard to the organic solvents, methanol and acetonitrile were evaluated. Acetonitrile was chosen instead of methanol because of its lower UV absorbance in the region of 200–210 nm. In addition, methanol was also discarded given that a carryover effect was always observed after the injections with maslinic acid that did not take place when acetonitrile was employed.

Different gradients were evaluated until obtaining the adequate conditions that did not produce any significant interference from blank plasma at the retention time of maslinic acid. Consequently, a compromise between an appropriate retention time for maslinic acid (20.9 min) and adequate separation from compounds present in the biological matrix was achieved. The flow rate was also assessed to advance the elution of maslinic acid. A flow of 1.5 mL/min gave a retention time of 17.2 min; however, the peak areas were reduced by 33% with respect to 1 mL/min, which was finally selected. A difference in the wavelength of maximum absorbance for maslinic acid was observed depending upon the organic solvent of the mobile phase. When methanol was used, the maximum was observed at 204 nm, whereas the use of acetonitrile gave a value of 197 nm. Once acetonitrile was selected, the optimal wavelength to measure maslinic acid was assessed. Analysis at 195, 200, 205, and 210 nm was performed, and the wavelength was set at 200 nm. Peak areas obtained at 195 and 200 nm only differed by 2%, while peak areas at 205 and 210 nm were reduced by 10 and 30%, respectively. The column temperature was evaluated by keeping it at 25, 30, or 40 °C. The selected temperature was 40 °C because it yielded the highest signal intensity.

**Optimization of the Extraction Procedure.** Sample preparation is a crucial step for a successful analysis. Consequently, different extraction approaches were investigated to obtain the best extraction efficiency. Solid-phase extraction that was first assessed using reversed-phase C18 cartridges yielded recoveries of only 5% ( $n = 3$ ). Ultrafiltration of plasma samples was also evaluated. Microcon or Ultrafree-MC centrifugal filter devices were applied to plasma samples spiked with maslinic acid, and the recoveries obtained were of  $1.30 \pm 0.21\%$  ( $n = 3$ ) and  $13.5 \pm 1.5\%$  ( $n = 3$ ), respectively. Finally, liquid–liquid extraction was assessed. Various solvents, including methanol, ethanol, acetonitrile, and ethyl acetate,

were screened. Acetonitrile and ethanol gave recoveries lower than 75% ( $n = 3$ ). Protein precipitation with methanol provided recoveries of  $89.3 \pm 1.4\%$  ( $n = 6$ ). However, ethyl acetate was selected, because it yielded recoveries superior to 95% ( $n = 6$ ) and gave less interfering peaks. To optimize the extraction procedure, the volume of ethyl acetate, times of extraction, and duration of the same were also evaluated. Plasma samples were initially extracted 3 times, and the individual recoveries were  $95.1 \pm 6.2\%$  ( $n = 3$ ),  $3.98 \pm 0.91\%$  ( $n = 3$ ), and  $0.30 \pm 0.02\%$  ( $n = 3$ ), respectively. The results indicated that maslinic acid was mainly recovered in the first two extractions; thus, the last one was discarded. The established extraction method in which plasma samples were extracted 2 times with 4 mL of ethyl acetate by vigorous vortex-mixing for 3 min was appropriate for the analysis.

**Method Validation.** The analytical performance parameters assessed for the overall assay were linearity, recovery, precision, accuracy, sensitivity, and selectivity.

**Linearity.** Good linearity of the assay in plasma was found over the investigated calibration range of 0.5–25  $\mu\text{M}$ . The calibration curves were characterized by coefficients of correlation ( $r^2$ ) of 0.99 or above.

**Recovery.** The extraction recoveries of maslinic acid were conducted in plasma samples spiked with six different concentrations (Table 1). The mean recovery was  $98.8 \pm 0.74\%$  ( $n = 37$ ).

**Table 1. Precision, Accuracy, and Recovery of Maslinic Acid in Spiked Rat Blank Plasma Samples**

maslinic acid ( $\mu\text{M}$ )	accuracy (% bias)	precision (% RSD)		
		intraday	interday	recovery (%)
1 ( $n = 5$ )	0.28	5.20	9.06	$99.7 \pm 4.0$
2.5 ( $n = 6$ )	0.59	2.87	3.54	$99.4 \pm 1.4$
5 ( $n = 6$ )	1.89	3.75	4.24	$98.1 \pm 1.7$
10 ( $n = 6$ )	0.59	3.36	1.23	$99.4 \pm 0.5$
15 ( $n = 8$ )	0.98	2.35	4.68	$99.0 \pm 1.6$
25 ( $n = 6$ )	2.57	3.81	3.67	$97.4 \pm 1.5$

**Precision and Accuracy.** The precision and accuracy data for the analytical procedure are shown in Table 1. Intra- and interday precisions were lower than 10% and were within the acceptable limit to meet the guidelines for bioanalytical method validation, which is considered to be  $\leq 15\%$ .<sup>26</sup> The accuracy was also good with the deviation between the nominal concentration and calculated concentration for maslinic acid well below the limit of 15%. Precision and accuracy data indicated that the method to extract maslinic acid from plasma is highly reproducible and robust.

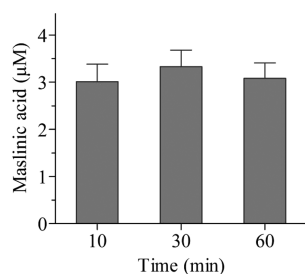
**Sensitivity.** The LOD and LOQ were calculated by measuring the magnitude of the analytical background response, running six blank plasma samples, and analyzing them using the maximum sensitivity allowed by the system. At 200 nm, the LOD for maslinic acid was 0.02  $\mu\text{M}$  and the LOQ was 0.32  $\mu\text{M}$ . The LOQ was subsequently validated by the analysis of six blank plasma samples spiked with the triterpene at 0.5  $\mu\text{M}$ .

**Selectivity.** The chromatogram at 200 nm shown in Figure 1 indicated that maslinic acid in plasma samples was well-resolved and free from interfering peaks. No interferences from endogenous substances were observed at the retention time of the analyte. The use of a diode array detector allowed for the



confirmation of the identity of the chromatographic peak by not only its retention time but also its spectrum.

**Verification of the Method.** Because the method provided good accuracy, precision, and recovery during the validation procedure, the question of the availability of maslinic acid after the oral administration could be approached. Therefore, maslinic acid at 50 mg/kg was orally administered to rats, and blood samples collected at different time points were analyzed following the validated analytical method. The representative HPLC chromatogram (Figure 1) showed that maslinic acid eluted at 20.9 min and was well-resolved from other compounds. After the administration of 50 mg/kg to overnight fasted rats, this pentacyclic triterpene reached the blood (Figure 2) and was still detected in plasma at 60 min ( $3.08 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ). The results indicate that the method developed is reliable, reproducible, and easily applied to biological samples.



**Figure 2.** Plasmatic concentrations of maslinic acid after oral administration of 50 mg/kg of the triterpene. Values are represented as means + standard error of the mean (SEM) ( $n = 3$ ).

## DISCUSSION

Table olives are regular dietary components of the different countries bordering the Mediterranean Sea and are being recognized as healthy foods from a nutritional point of view because of their content in monounsaturated fatty acids as well as bioactive components, such as polyphenols and pentacyclic triterpenes.<sup>5</sup> The fruit of *O. europaea* L. is a particularly rich source of maslinic acid,<sup>9</sup> which is a hydroxy pentacyclic triterpenic acid with health-protecting properties, such as antitumor,<sup>4,12,13</sup> antioxidant,<sup>19</sup> antidiabetic,<sup>14,17</sup> and cardioprotective.<sup>20</sup> Notwithstanding the promising effects described, the mechanisms of absorption, bioavailability, and tissue distribution of maslinic acid in either humans or experimental animals are still undefined. The absence of this knowledge is mainly due to the lack of an analytical method to determine maslinic acid in biological fluids. Consequently, the present study develops and validates a procedure that allows for the measurement of this compound in plasma by applying liquid–liquid extraction followed by HPLC analysis with diode array detection.

Gas chromatography (GC) coupled with different detectors has been traditionally used to determine pentacyclic triterpenes, such as maslinic and oleanolic acids, in olives<sup>7,27</sup> and olive oil.<sup>10</sup> However, the low volatility and high molecular weight of these compounds prevent its direct injection to the chromatograph, and a derivatization step is mandatory prior to GC analysis. Derivatization of triterpenes has traditionally been carried out by silylation,<sup>7,10</sup> which presents several disadvantages, such as an increase of time, reagents, and materials consumption. For the analysis of nonvolatile molecules, such as maslinic acid, LC constitutes an appropriate alternative that shortens analysis

time because derivatization is not required.<sup>28</sup> We analyzed maslinic acid in plasma by HPLC, which is an appropriate technique for both nutritional and pharmacological studies. These instruments are common in many laboratories, thus providing readily available and affordable analysis that renders satisfactory separation, identification, and quantification of the triterpene. For these reasons, LC is a technique that is used in the analysis of pentacyclic triterpenic acids. In fact, the concentrations of oleanolic and maslinic acids in table olives were determined by HPLC analysis with diode array detection.<sup>9</sup> Analysis was carried out with an isocratic mobile phase [92:8 (v/v) methanol/phosphoric acid in water at pH 3.0] that was delivered to a reversed-phase column kept at 35 °C at 0.8 mL/min, and the eluate was monitored at 210 nm. Under these experimental conditions, the concentrations of maslinic and oleanolic acids were quantified in different types of commercial black and green olives.<sup>9</sup> Recently, the efficacy of different drying and extraction methods were evaluated through the quantification of maslinic and oleanolic acids in olives using similar reversed-phase HPLC conditions.<sup>29</sup> Moreover, HPLC with diode array detection has also been employed to determine oleanolic, ursolic, and betulinic acids in human serum.<sup>30</sup> After liquid extraction with diethyl ether, the triterpenes were separated on a C18 reversed-phase column at 30 °C and eluted isocratically [85:15 (v/v) acetonitrile/0.5% phosphoric acid in water] at 0.8 mL/min. The method was validated but lacks verification, because it was not applied to serum samples from patients who were administered the triterpenes.

The analytical procedure to determine maslinic acid in plasma was attempted through liquid–liquid extraction, which is a basic sample preparation method that has been commonly used to determine other pentacyclic triterpenes.<sup>30–35</sup> Different organic solvents were evaluated, and ethyl acetate yielded the best recovery. Ethyl acetate has also been used in the extraction from plasma samples of other pentacyclic triterpenes, such as oleanolic acid,<sup>32</sup> ursolic acid,<sup>35</sup> and glycyrrhetic acid.<sup>31,34</sup>

The validation of the method gave an average recovery of  $98.8 \pm 0.74\%$ . This value was calculated after spiking blank plasma samples at six different concentrations to ensure that the method is adequate in both low and high concentrations.<sup>26</sup> The analytical method is accurate given that the average inter- and intraday precisions, expressed as RSD, were  $4.40 \pm 0.42$  and  $3.98 \pm 0.29\%$ , respectively. Furthermore, the method is selective, because no other peak elutes at the retention time of maslinic acid. In addition, the LOD and LOQ were 0.02 and  $0.32 \mu\text{M}$ , respectively. Consequently, the results of the validation indicated that the method showed good linearity, recovery, precision, sensitivity, and selectivity.

Once the method was established and validated, it was verified by applying it to the detection of maslinic acid after a single oral administration of a dose of 50 mg/kg to rats. The analysis of plasma revealed that the method developed is suitable for the determination of maslinic acid because it was detected in all of the samples. The results showed that maslinic acid is absorbed in the intestine and reaches the blood, where it is found 10 min after the oral administration and can still be detected in plasma at 60 min. A recently published study determines the plasmatic concentration of maslinic acid in male C57BL/6 mice after its consumption mixed in the chow at 0.5% (approximately 25 mg/kg) for 4 or 8 weeks.<sup>36</sup> Maslinic acid, analyzed by HPLC tandem mass spectrometry, was not detected in plasma after 4 weeks of administration, whereas the concentration obtained in the mice administered for 8 weeks

was  $1.00 \pm 0.15 \mu\text{M}$  ( $0.47 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$ ). The paper presents little information on method validation, indicating only a detection limit of  $0.21 \mu\text{M}$  ( $0.1 \mu\text{g/mL}$  of plasma), which is 10 times higher than the detection limit than we have reported, a precision lower than 5%, and no information about the recovery of maslinic acid from plasma.

In contrast to the scarce data existing on the bioavailability of maslinic acid, the plasmatic concentrations of other pentacyclic triterpenes have been thoroughly studied. The bioavailability of oleanolic acid, an isomer of maslinic acid that lacks a hydroxyl group at the carbon 2 position, was determined in both rats<sup>33</sup> and humans.<sup>32</sup> After the oral administration of 50 mg/kg of oleanolic acid to rats, a maximum concentration of  $0.29 \pm 0.26 \mu\text{M}$  was observed at  $21 \pm 17$  min, which is a value lower than the value that we have reported for maslinic acid at the same dose.<sup>33</sup> These authors indicated that oleanolic acid was minimally absorbed, with an absolute oral bioavailability of 0.7%. Moreover, the plasmatic concentrations of oleanolic acid have been determined in healthy male volunteers by HPLC tandem mass spectrometry.<sup>32</sup> The pharmacokinetic study showed that, after the single oral administration of 40 mg of oleanolic acid, the maximum concentration was  $26.5 \pm 15.0$  nM at  $5.2 \pm 2.9$  h.<sup>32</sup>

In conclusion, a simple, precise, reproducible, and accurate method has been developed to determine maslinic acid in plasma. The subsequent oral administration of this pentacyclic triterpene to experimental animals and its presence in blood have provided evidence of its intestinal absorption. Further experiments should be carried out to establish which circulating levels of this compound have to be reached in plasma to reproduce the *in vitro* beneficial effects described for maslinic acid.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Telephone: +34934024505. Fax: +34934035901. E-mail: jmplanas@ub.edu.

### Funding

This work was supported by Grants AGL2009-12866 from the Ministerio de Ciencia e Innovación and 2009SGR471 from the Generalitat de Catalunya, Spain. Glòria Lozano-Mena was a recipient of Ajuts de Personal Investigador en Formació (APIF) from the Universitat de Barcelona.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Irene Alfaras for help and advice.

## ABBREVIATIONS USED

LC, liquid chromatography; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; GC, gas chromatography; RSD, relative standard deviation

## REFERENCES

- Owen, R. W.; Haubner, R.; Wurtele, G.; Hull, E.; Spiegelhalter, B.; Bartsch, H. Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur. J. Cancer Prev.* **2004**, *13*, 319–326.
- Pérez-Jiménez, F.; Álvarez de Cienfuegos, G.; Badimon, L.; Barja, G.; Battino, M.; Blanco, A.; Bonanome, A.; Colomer, R.; Corella-Piquer, D.; Covas, I.; Chamorro-Quiros, J.; Escrich, E.; Gaforio, J. J.; García Luna, P. P.; Hidalgo, L.; Kafatos, A.; Kris-Etherton, P. M.; Lairon, D.; Lamuela-Raventós, R.; López-Miranda, J.; López-Segura,

- Martínez-Gonzalez, M. A.; Mata, P.; Mataix, J.; Ordovas, J.; Osada, J.; Pacheco-Reyes, R.; Perucho, M.; Pineda-Priego, M.; Quiles, J. L.; Ramírez-Tortosa, M. C.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Sánchez-Rovira, P.; Solfrizzi, V.; Soriguer-Escofet, F.; de la Torre-Fornell, R.; Trichopoulos, A.; Villalba-Montoro, J. M.; Villar-Ortiz, J. R.; Visioli, F. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur. J. Clin. Invest.* **2005**, *35*, 421–424.

- Visioli, F. Olive oil phenolics: Where do we stand? Where should we go? *J. Sci. Food Agric.* **2012**, *92*, 2017–2019.

- Juan, M. E.; Wenzel, U.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Daniel, H.; Planas, J. M. Olive fruit extracts inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 2553–2557.

- Ghanbari, R.; Anwar, F.; Alkharfy, K. M.; Gilani, A. H.; Saari, N. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)—A review. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 3291–3340.

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

- Bianchi, G.; Pozzi, N.; Vlahov, G. Pentacyclic triterpene acids in olives. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 205–207.

- 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.

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

- Pérez-Camino, M. C.; Cert, A. Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1558–1562.

- Liu, J.; Sun, H.; Duan, W.; Mu, D.; Zhang, L. Maslinic acid reduces blood glucose in KK-Ay mice. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 2075–2078.

- Juan, M. E.; Planas, J. M.; Ruiz-Gutiérrez, 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.

- 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- $\kappa$ B signaling pathway. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 73.

- 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*, 1829–1839.

- Martín, R.; Carvalho-Tavares, J.; Ibeas, E.; Hernández, M.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Nieto, M. L. Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 3741–3751.

- Allouche, Y.; Warleta, F.; Campos, M.; Sánchez-Quesada, C.; Uceda, M.; Beltrán, G.; Gaforio, J. J. 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.

- 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*, 4944–4948.

- Tang, X. Z.; Guan, T.; Qian, Y. S.; Li, Y. M.; Sun, H. B.; Huang, J. H.; 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.

- Montilla, M. P.; Agil, A.; Navarro, M. C.; Jiménez, M. I.; García-Granados, A.; Parra, A.; Cabo, M. M. Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Med.* **2003**, *69*, 472–474.

- 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.



(21) De Pablos, L. M.; dos Santos, M. F.; Montero, E.; García-Granados, A.; Parra, A.; Osuna, A. Anticoccidial activity of maslinic acid against infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Parasitol. Res.* **2010**, *107*, 601–604.

(22) 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, 2002.

(23) The United States Pharmacopeial Convention. *The United States Pharmacopeia and The National Formulary, USP31–NF26*; The United States Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, 2008; Vol. 1225, pp 752–756.

(24) 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 6,403,816 B1, 2002.

(25) 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.

(26) Bansal, S.; DeStefano, A. Key elements of bioanalytical method validation for small molecules. *AAPS J.* **2007**, *9*, 109–114.

(27) Guinda, A.; Rada, M.; Delgado, T.; Gutiérrez-Adánez, P.; Castellano, J. M. Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 9685–9691.

(28) 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.

(29) Goulas, V.; Manganaris, G. A. Towards an efficient protocol for the determination of triterpenic acids in olive fruit: A comparative study of drying and extraction methods. *Phytochem. Anal.* **2012**, *23*, 444–449.

(30) Rada, M.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Guinda, A. Determination of triterpenic acids in human serum by high-performance liquid chromatography: Triterpenoid interaction with serum protein. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2308–2313.

(31) 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*, 758–762.

(32) Song, M.; Hang, T. J.; Wang, Y.; Jiang, L.; Wu, X. L.; 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*, 190–196.

(33) Jeong, D. W.; Kim, Y. H.; Kim, H. H.; Ji, H. Y.; Yoo, S. D.; Choi, W. R.; Lee, S. M.; Han, C. K.; Lee, H. S. Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats. *Biopharm. Drug Dispos.* **2007**, *28*, 51–57.

(34) Zhao, W. J.; Wang, B. J.; Wei, C. M.; Yuan, G. Y.; Bu, F. L.; Guo, R. C. Determination of glycyrrhetic acid in human plasma by HPLC–MS method and investigation of its pharmacokinetics. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2008**, *33*, 289–294.

(35) 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: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2011**, *879*, 219–224.

(36) 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.

## RESEARCH ARTICLE

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

Marta Sánchez-González<sup>1\*</sup>, Glòria Lozano-Mena<sup>1\*</sup>, M. Emília Juan<sup>1</sup>, Andrés García-Granados<sup>2</sup> and Joana M. Planas<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Departamento 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

## 1 Introduction

Maslinic acid, also named crategolic acid or (2 $\alpha$ ,3 $\beta$ )-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  $287 \pm 67$  to  $1318 \pm 401$  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.

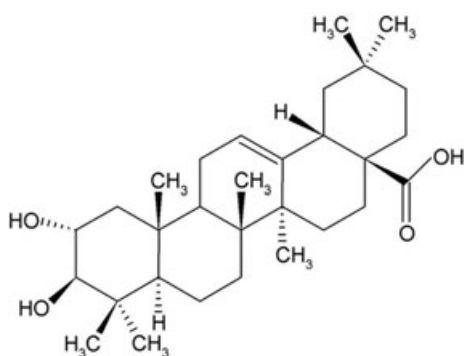


Figure 1. Chemical structure of maslinic acid.

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)- $\beta$ -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 ( $n = 3\text{--}4/\text{cage}$ ), 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)- $\beta$ -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-K<sub>3</sub> 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  $\mu\text{m}$ ) were prepared from blocks and stained with hematoxylin and eosin to examine tissue damage under a light microscope.

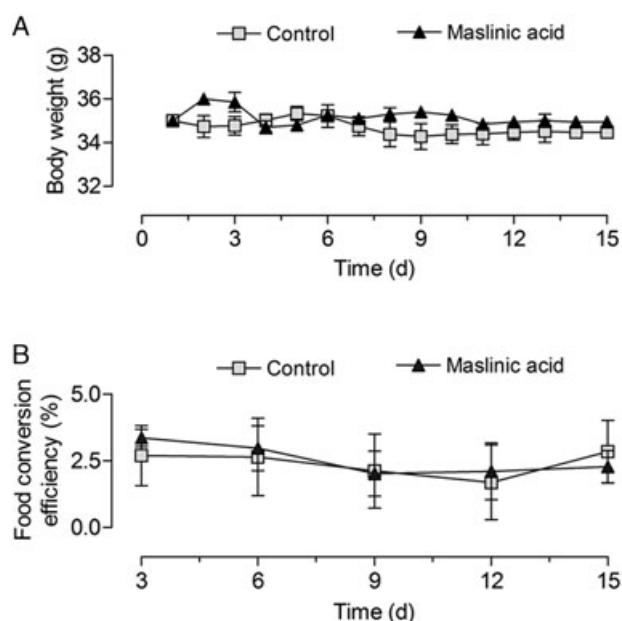
## 2.5 Statistics

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  $4.25 \pm 0.05$  g/day and  $4.75 \pm 0.05$  mL/day, respectively. In



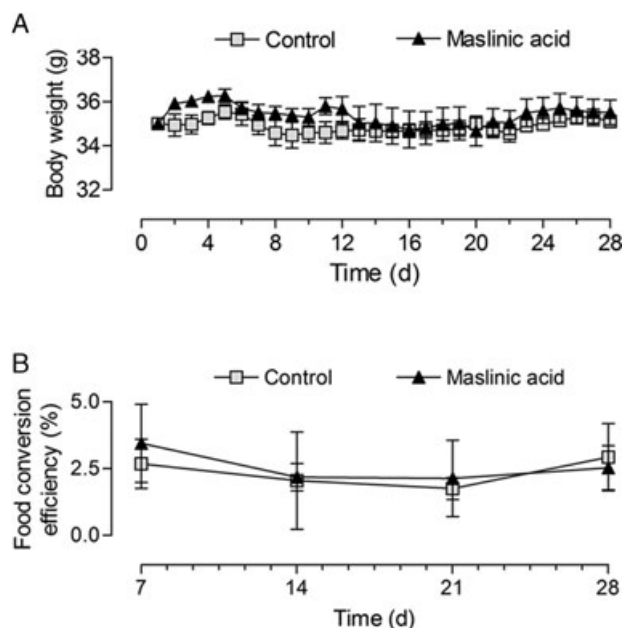
**Figure 2.** Body weight of Swiss CD-1 male mice (A) and food conversion efficiency (B) after the single oral administration of 1000 mg/kg of maslinic acid ( $n = 2$ ) compared with control mice ( $n = 2$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Groups did not differ,  $p > 0.05$ .

maslinic acid treated mice these values were  $4.82 \pm 0.08$  g/day and  $5.54 \pm 0.20$  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  $35.1 \pm 0.3$  g ( $n = 6$ ) for control mice and  $35.5 \pm 0.6$  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 <sup>a)</sup>	Maslinic acid <sup>a)</sup>
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 <sup>a)</sup>	Maslinic acid <sup>a)</sup>
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 <sup>b)</sup> (IU/L)	190 $\pm$ 58	206 $\pm$ 92
Bilirubin ( $\mu$ mol/L)	2.13 $\pm$ 0.18	2.08 $\pm$ 0.14
Creatinine ( $\mu$ mol/L)	17.3 $\pm$ 1.8	12.9 $\pm$ 1.4
Sodium <sup>c)</sup> (mmol/L)	154 $\pm$ 1	154 $\pm$ 1
Potassium <sup>c)</sup> (mmol/L)	3.75 $\pm$ 0.16	4.34 $\pm$ 0.22
Chloride <sup>c)</sup> (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 <sup>a)</sup>	Maslinic acid <sup>a)</sup>
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 <sup>b)</sup>
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.

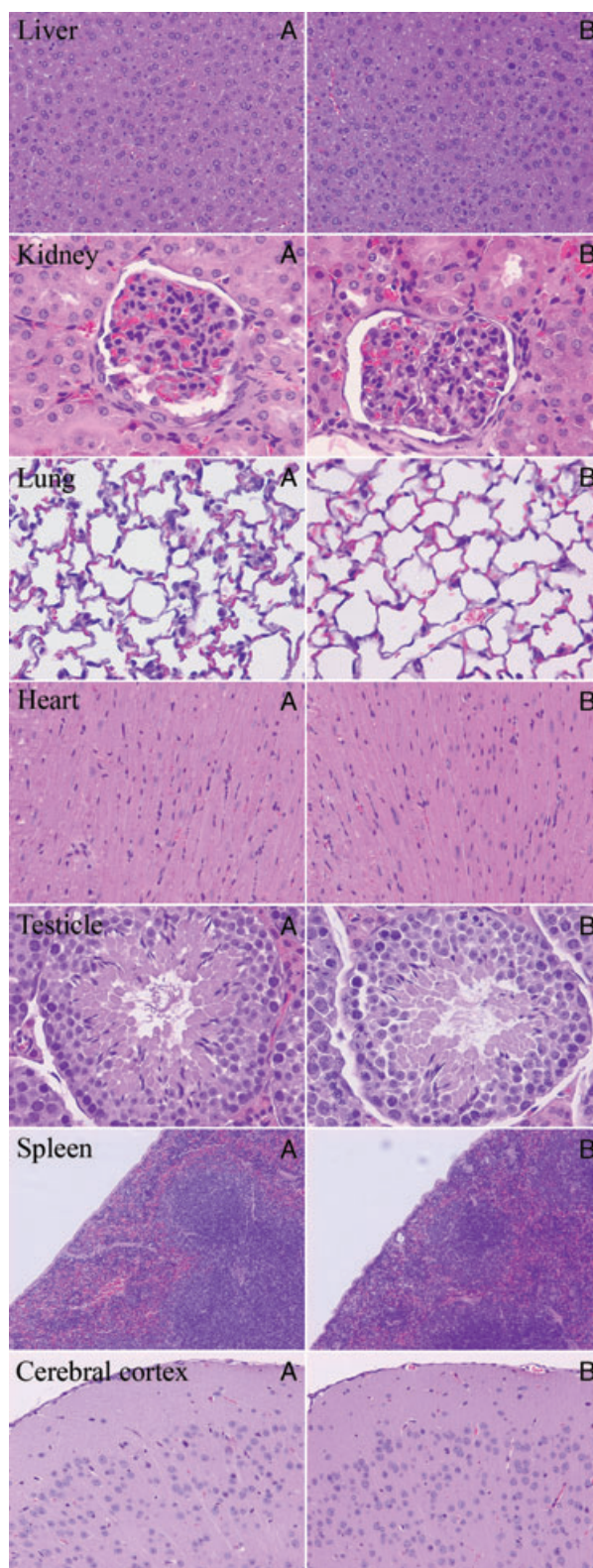
b) Different from control,  $p < 0.05$ .

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<sup>y</sup> 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<sup>y</sup> 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.

Review

## Maslinic Acid, a Natural Phytoalexin-Type Triterpene from Olives — A Promising Nutraceutical?

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

Departament de Fisiologia and Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona (UB), Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: gloria.lozano@ub.edu; Tel.: +34-93-402-45-05; Fax: +34-93-402-59-01.

Received: 20 June 2014; in revised form: 21 July 2014 / Accepted: 23 July 2014 /

Published: 4 August 2014

---

**Abstract:** Maslinic acid is a pentacyclic triterpene found in a variety of natural sources, ranging from herbal remedies used in traditional Asian medicine to edible vegetables and fruits present in the Mediterranean diet. In recent years, several studies have proved that maslinic acid exerts a wide range of biological activities, *i.e.* antitumor, antidiabetic, antioxidant, cardioprotective, neuroprotective, antiparasitic and growth-stimulating. Experimental models used for the assessment of maslinic acid effects include established cell lines, which have been often used to elucidate the underlying mechanisms of action, and also animal models of different disorders, which have confirmed the effects of the triterpene *in vivo*. Overall, and supported by the lack of adverse effects in mice, the results provide evidence of the potential of maslinic acid as a nutraceutical, not only for health promotion, but also as a therapeutic adjuvant in the treatment of several disorders.

**Keywords:** maslinic acid; phytochemical; phytoalexin; pentacyclic triterpene; biological effects; antitumor; antidiabetic; antioxidant; nutraceutical

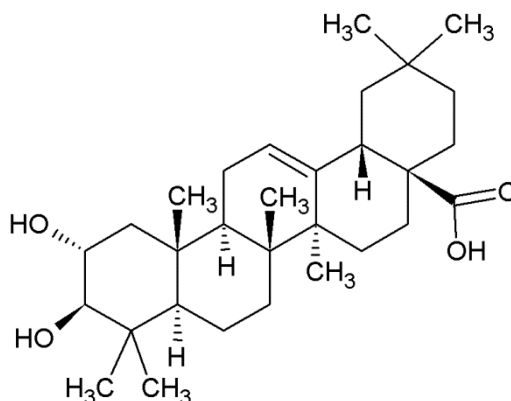
---

### 1. Introduction

Maslinic acid, also known as crategolic acid or (2 $\alpha$ ,3 $\beta$ )-2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid (Figure 1), is a pentacyclic triterpene widely distributed in the plant kingdom. In the last decades, and in response to an increasing interest to identify new natural molecules with beneficial effects on health, maslinic acid has been isolated not only from various plants used in traditional herbal medicine, but

also from edible vegetables and fruits. In parallel, the biological activities of maslinic acid have been assessed in different experimental models, from tumor cell lines to animal models of several diseases, supported by the lack of adverse effects *in vivo* after the oral administration of the triterpene [1]. In summary, maslinic acid is arising as a novel natural and safe molecule with different biological targets, which might derive to considering it as a nutraceutical in the future.

**Figure 1.** Chemical structure of maslinic acid.



Historically, maslinic acid was named “crategolic acid”, since it was first isolated from *Crataegus oxyacantha* L. [2] Tschesche *et al.* [3] described it as a triterpenoid carboxylic acid with molecular formula  $C_{30}H_{48}O_4$ , mainly found in the leaves of the abovementioned species, where it accounted for 25%–30% of the amount of triterpenoids in this tissue [4]. In the early 1960s, a series of studies by other authors reported the identification of a new triterpenic acid from *Olea europaea* L., although with some controversy. Caglioti *et al.* [5] isolated from olive husks a triterpenic acid with molecular formula and structure identical to those of crategolic acid, and named it maslinic acid. However, a few years later the study was questioned, since the results could not be reproduced, and maslinic acid was considered a product derived from the aging of the fruit [6]. In parallel to the work by Caglioti *et al.* [5], Vioque and Morris [7] found two triterpenic acids in the acetonic extract of the olive pomace, one of which was identified as oleanolic acid and the other was defined as a dihydroxytriterpenic acid, which could be maslinic acid. More than three decades later, Bianchi *et al.* [8] shed light about the composition of the olive fruit, quantifying maslinic acid together with oleanolic acid as the major lipidic compounds in the cuticle of the drupe.

### 1.1. Biosynthesis and Role as a Phytoalexin

Triterpenoids, such as maslinic acid, are a group of secondary metabolites derived from the cyclation of squalene, oxidosqualene or bis-oxidosqualene [9]. These precursors ( $C_{30}$ ) are substrate of several types of triterpene synthases, which catalyze their cyclation through intermediate cations to a wide variety of triterpenes. Depending on the number of rings, the latter are classified as mono-, bi-, tri-, tetra- or pentacyclic triterpene alcohols [9]. Lupeol,  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin are examples of pentacyclic triterpene alcohols, which not only constitute secondary metabolites themselves, but also might undergo oxidation reactions to yield other derivatives, such as betulinic, ursolic and maslinic acids.

Not long after the identification in *Crataegus oxyacantha* L., Tschesche *et al.* [10] recognized maslinic acid as a derivative of the  $\beta$ -amyrin series, but it was Stiti *et al.* [11] who more recently postulated the biosynthetic pathway that leads to the formation of maslinic acid in the fruits of *Olea europaea* L., one of the main natural sources of this triterpene. The authors suggest that in the developing olive both the sterols (primary metabolites) and the non-steroidal triterpenoids (secondary metabolites) share oxidosqualene as a common precursor. The enzyme  $\beta$ -amyrin synthase catalyzes its cyclation into  $\beta$ -amyrin, and further oxidation steps give rise to the triterpenic dialcohol erythrodiol followed by the hydroxy pentacyclic triterpenic acids oleanolic and maslinic [11].

Regarding the function, plant secondary metabolites are not essential for the growth, development and reproduction of individuals, but might contribute to their survival or give them evolutionary advantages. Phytoalexins are a particular case of secondary metabolites, involved in the protection of the plant against pathogens, and maslinic acid can be considered as such, since different studies have proved its protective activity under adverse conditions. Kombargi *et al.* [12] observed that dipping *Olea europaea* L. fruits in solutions of maslinic acid prevented the oviposition of eggs from females of the olive fruit fly (*Bactrocera oleae*), which is the major insect pest of olives in the Mediterranean countries. Furthermore, the isolated triterpene is toxic after ingestion by rice weevil adults (*Sitophilus oryzae*) [13], a widespread and destructive pest of stored cereals.

## 1.2. Natural Sources

Maslinic acid was first detected in *Crataegus oxyacantha* L., but the growing interest in this triterpene because of its wide range of health-enhancing activities has led to its identification in other natural sources, being present in more than 30 plants worldwide. On one hand, the triterpene has been found in plants used in traditional Asian medicine for the treatment of diverse affections. To mention only a few examples, the leaves of loquat (*Eriobotrya japonica*) [14], which have been used as antitussive and anti-inflammatory for chronic bronchitis, and also as diuretic, digestive and antipyretic [15]; the flowers of *Campsis grandiflora*, employed for female disorders like uterine hemorrhage [16]; the whole plant of *Geum japonicum* [17], used as diuretic [18]; and *Agastache rugosa* [19], for the treatment of anorexia, vomiting and other intestinal disorders [20]. On the other hand, maslinic acid has recently been quantified in edible vegetables, such as table olives [21], spinach and eggplant [22], aromatic herbs like mustard and basil [22,23], legumes such as chickpeas and lentils [24], and to a lesser extent in some fruits like mandarin and pomegranate [25] (Table 1). Therefore, plant-based diets might provide a constant supply of maslinic acid, which could be considered, among many other factors, partly responsible of the health-enhancing properties of these dietary habits.

**Table 1.** Maslinic acid content in edible sources.

	Maslinic Acid (mg/kg Dry Weight)	References
<b>Table olives</b>		
Kalamata (plain black)	1318	[21]
Hojiblanca (plain green)	905	[21]
Gordal (plain green)	414	[21]
Manzanilla (plain green)	384	[21]
Cacereña (plain black)	295	[21]

Table 1. Cont.

	Maslinic Acid (mg/kg Dry Weight)	References
<b>Fresh vegetables</b>		
Spinach	1260	[22]
Eggplant	840	[22]
<b>Aromatic herbs</b>		
Brown mustard	330	[23]
Leaf mustard	1740	[22]
Basil	350, 320	[22,23]
<b>Cooked legumes</b>		
Small lentils	26.3	[24]
Large lentils	39.5	[24]
Chickpeas	61.9	[24]
<b>Fresh fruits</b>		
Mandarin	1.18	[25]
Pomegranate	10.8	[25]

## 2. Biological Effects

### 2.1. Maslinic Acid and Cancer

The antitumor activity of maslinic acid has become remarkable in recent years, as evidenced by the higher number of studies that address this issue, compared to those about other biological effects. The vast majority of published references correspond to *in vitro* experiments that show the anti-proliferative and/or pro-apoptotic effect of maslinic acid, together with plausible mechanisms of action that involve different signaling pathways. Colon cancer cell lines have been extensively used with this aim, but there is no shortage of studies that prove the above-mentioned effects in a wide range of cell lines from other origins. Moreover, this antitumor effect has also been assessed in several animal models, with positive results that reinforce its potential as anticarcinogenic agent.

#### 2.1.1. Maslinic Acid Exerts an Anti-Proliferative Activity through Arresting Cell Cycle and Activates Both the Intrinsic and the Extrinsic Apoptotic Pathways *in Vitro*

The study conducted by Juan *et al.* [26] demonstrated for the first time the potent anti-proliferative activity of maslinic in the human colorectal adenocarcinoma cell line HT-29. The triterpene did not show non-specific cytotoxicity up to 250  $\mu\text{M}$ , but exerted a dose-dependent anti-proliferative activity with  $\text{IC}_{50}$  of 101.2  $\mu\text{M}$  at 72 h of exposure [27]. Similar results were found by Reyes *et al.* [28] in both the colon cancer cell line HT-29 and Caco-2, in which incubation with the triterpene for 72 h resulted in inhibition of cell growth with  $\text{IC}_{50}$  of 61  $\mu\text{M}$  and 85  $\mu\text{M}$ , respectively. Further experiments by the same authors revealed that maslinic acid exerted its anti-proliferative activity by arresting cell cycle, since the cell population in the G0/G1 phases was significantly increased, while that in the S phase was reduced [28]. Remarkably, in both studies the effect of the compound on cell proliferation coincided with apoptotic cell death.

Apoptosis, also called programmed cell death, refers to a cascade of biochemical events that lead to the disintegration of the cell into fragments, which are further removed by phagocytic cells without eliciting an inflammatory response. This process might occur through death receptors, the so-called extrinsic pathway, or by means of an intrinsic pathway, in which mitochondria play a role. Both routes converge at the level of caspase-3, which is one of the effector caspases [29]. Interestingly, maslinic acid has been found to affect both pathways at different levels.

In the study of Juan *et al.* [27], the activation of caspase-3 was more than 60-fold at 24 h of exposure to 250  $\mu\text{M}$  of the triterpene, compared to vehicle-treated cells. In order to know whether the activation of caspase-3 resulted from the extrinsic or the intrinsic pathway, the production of superoxide anions was evaluated, since it is one of the possible inductors of the latter [30]. Indeed, higher levels of  $\text{O}_2^-$  were found in cells incubated with maslinic acid (150  $\mu\text{M}$ ) for 4 h, compared to controls. The apoptotic process was further confirmed by the occurrence of plasma membrane disintegration and nuclear fragmentation [27]. Similarly, Reyes *et al.* [28] also reported that the apoptotic process observed in both HT-29 and Caco-2 cell lines occurred through activation of caspase-3, as evidenced by the observation of morphological changes, such as cell shrinkage or chromatin condensation.

Attention was then drawn to the molecular events underlying the induction of the mitochondrial apoptotic pathway. This organelle is a reservoir of several pro-apoptotic proteins that upon the proper stimulus are released to the cytosol, where the interaction with other elements finally triggers caspase-3 activation. An important set of regulators of this pathway is the Bcl-2 family, which includes both anti- and pro-apoptotic members [29].

Experiments performed by Reyes-Zurita *et al.* [31] with HT-29 cells showed that maslinic acid concomitantly activated the expression of Bax (pro-apoptotic protein) and inhibited the expression of Bcl-2 (anti-apoptotic protein), resulting in mitochondrial disruption and cytochrome-c release to the cytosol. It is known that once in the cytosol cytochrome-c binds to Apaf-1, which triggers the sequential activation of caspase-9 and caspase-3 [32]. Although in this study the formation of the complex was not directly assayed, a strong time- and dose-dependent cleavage of both caspases was observed [31].

More recently, the same authors postulated that the effect of maslinic acid on Bcl-2 family proteins could be mediated by the kinase JNK, since its expression was found increased in HT-29 cells after a 12 h treatment with the triterpene [33]. Actually, some of the effects of JNK had been previously described. Tsuruta *et al.* [34] found that JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation (inactivation) of a cytoplasmic anchor of Bax. Another consequence of JNK activation is the cleavage of Bid (pro-apoptotic protein), which results in translocation to mitochondria and Smac/DIABLO release to the cytosol [35]. This protein induces apoptosis through neutralizing inhibitors of apoptosis (IAPs) [36]. Apart from JNK activation, maslinic acid also enhanced the expression of p53, which is a well-known tumor-suppressor transcription factor that regulates the expression of genes involved in apoptosis, such as those coding for the above-mentioned Bcl-2 and Bax proteins [37].

In contrast with the intrinsic pathway, the extrinsic route is initiated by the binding of a ligand with a receptor of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily. This results in the assembly of several elements, which constitute the so-called complex I [38]. Next, two possible ways trigger the

regulation of apoptosis with opposite outcomes. On one hand, complex I can activate the kinase IKK, responsible of the phosphorylation of IKB $\alpha$  and its subsequent degradation. IKB $\alpha$  normally recruits NF- $\kappa$ B in the cytosol, but after its degradation the transcription factor is released and translocates to the nucleus [39], where it up-regulates anti-apoptotic genes [40]. On the other hand, some elements of the complex I can be exchanged, including the recruitment of procaspase-8, and this leads to the formation of a secondary complex (complex II) [38]. Activation of procaspase-8 results in the cleavage of downstream effector caspases, such as caspase-3, thus propagating the apoptotic signal [41].

The role of maslinic acid in the death-receptor pathway was first demonstrated by Li *et al.* [42] using the pancreatic cancer cells Panc-28. The compound exerted a synergistic effect together with TNF- $\alpha$  on both inhibition of cell proliferation (maslinic acid at 10  $\mu$ M) and induction of cell death (25  $\mu$ M), being the latter more than 55% higher, compared to control. The determination of activated caspase-3 in the cells confirmed the occurrence of apoptosis. Further experiments showed that maslinic acid affected the NF- $\kappa$ B pathway by inhibiting IKB $\alpha$  phosphorylation, thus preventing both NF- $\kappa$ B translocation to nucleus and its DNA binding activity.

The inhibitory effect of maslinic acid on NF- $\kappa$ B DNA-binding activity was also proved in the Raji B lymphoma cell line [43]. In this study, the impaired function of NF- $\kappa$ B was used to explain the dose-dependent reduction of COX-2 expression. COX-2 is well-known for its role in the inflammatory process and has been found overexpressed in a wide range of premalignant and malignant tissues [44].

The NF- $\kappa$ B transcriptional activity can be modulated through phosphorylation by various members of the mitogen-activated protein kinase family (MAPK), including JNK and p38 [45]. Wu *et al.* [46] described for the first time that maslinic acid also interacts with the p38 cascade so that ultimately triggers a pro-apoptotic effect. The experiments were performed in two cell lines of human salivary gland adenoid cystic carcinoma, ACC-2 and ACC-M, corresponding to low and high metastasis, respectively. The anti-proliferative activity after 24 h of incubation (IC<sub>50</sub> of 43.6 and 45.8  $\mu$ M, respectively) was attributed to an apoptotic process, as evidenced by the observation of both apoptotic bodies and microstructural changes, such as chromosomal DNA condensation and loss of microvilli. Cells exposed to the triterpene showed activated caspase-3, and this occurred as a consequence of p38 MAPK phosphorylation, which in turn was the result of an increase in the concentration of intracellular Ca<sup>2+</sup>. The mechanism by which maslinic acid provokes intracellular Ca<sup>2+</sup> overload remains to be investigated. On the contrary, the implication of p38 MAPK in maslinic acid-induced apoptosis is consistent with the results obtained in two cell lines of human urinary bladder carcinoma (T24 and 253J) [47]. Incubation with the triterpene dose- and time-dependently increased p38 phosphorylation, and this was correlated with reduced cell survival (IC<sub>50</sub> of 33.0 and 71.8  $\mu$ M in each cell line, respectively).

The latest assessment of the anti-proliferative activity of maslinic acid *in vitro* has been performed in the soft tissue sarcoma cell lines SW982 (human synovial sarcoma) and SK-UT-1 (leiomyosarcoma). IC<sub>50</sub> values were of 45.3 and 59.1  $\mu$ M, after incubating the cells with the triterpene for 24 h [48]. However, the most remarkable contribution of this study is the fact that maslinic acid is proposed as an adjuvant of the established anticancer drug doxorubicin, which constitutes a novel therapeutic approach for the treatment of cancer diseases. Concretely, cells treated simultaneously with both compounds showed higher sensitivity to doxorubicin as a consequence of an increased intracellular accumulation of the drug. Since doxorubicin is a well-known substrate of the efflux

proteins P-gp and MRP1, a plausible mechanism behind the intracellular accumulation of the drug when co-incubated with maslinic acid could be that the triterpene inhibited these transporters. A kinetic study revealed that the parameters  $V_{max}$  and  $K_m$  (obtained by the Michaelis-Menten equation) of P-gp were not affected by maslinic acid, while those of MRP1 were dose-dependently lowered, thus indicating that maslinic behaved as a non-competitive inhibitor of MRP1 [48]. Table 2 summarizes the  $IC_{50}$  values of the anti-proliferative activity of maslinic acid found in different cell lines.

**Table 2.** *In vitro* anti-proliferative effect of maslinic acid.

Origin	Cell Line	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	References
Human colorectal adenocarcinoma	HT-29	101.2	[27]
	HT-29	61	[28]
	Caco-2	85	[28]
	Caco-2	15.4	[49]
Human hepatocellular carcinoma	HepG2	69.1	[49]
Human breast adenocarcinoma	MCF-7	136.0	[49]
Human salivary gland adenoid cystic carcinoma	ACC-2 (low metastasis)	43.7	[46]
	ACC-M (high metastasis)	45.8	[46]
Human transitional cell urinary bladder carcinoma	T24	33.0	[47]
	253J	71.8	[47]
	TCCSUP	28.0	[47]
Human transitional cell urinary bladder papilloma	RT4	42.7	[47]
Human synovial sarcoma	SW 982	45.3	[48]
Human uterus leiomyosarcoma	SK-UT-1	59.1	[48]

### 2.1.2. Maslinic Acid Targets Other Cancer-Related Signaling Pathways

Besides the abnormal cell proliferation occurring in tumor growth, angiogenesis emerges in response to the hypoxic environment within the tumor and constitutes another therapeutic target for cancer diseases. The hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) is one of the pivotal regulators of angiogenesis in response to oxygen deficiency and has been found overexpressed in many human cancers [50]. This factor induces the expression of pro-angiogenic molecules, such as the vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors [51], among others. The new blood vessels might be used by some cells detached from the primary tumor to reach systemic circulation, thus they would be distributed throughout the organism and are likely to ultimately colonize distant tissues. This process requires the action of proteins that degrade the extracellular matrix, such as matrix metalloproteinases (MMP) and urokinase-type plasminogen activator (uPA), which are secreted as inactive forms by either tumor or stroma cells [52,53]. Concretely, the expression of MMP-2, MMP-9 and uPA may be induced by the above-mentioned HIF-1 $\alpha$  [51].

Park *et al.* [54] conducted an exhaustive study about the effect of maslinic acid on the metastatic capacity of the human prostate cancer cell DU145. Treatment with the triterpene resulted in a decrease of both basal and EGF-induced migration of cells in a dose-dependent manner (10–25  $\mu$ M). This effect was correlated with both MMP and uPA systems; firstly, the triterpene reduced both the secretion of pro-MMP-2 and pro-MMP-9, and also MMP-9 mRNA levels. Secondly, a diminished secretion of pro- and active-uPA was observed, together with decreased uPA activity and mRNA levels, and reduced



uPA receptor (uPAR) protein levels. Since MMP and uPA systems are regulated by HIF-1 $\alpha$ , it was further assessed whether the effects of maslinic acid observed on the proteases took place through the alteration of HIF-1 $\alpha$  levels. It was demonstrated that under hypoxic conditions the triterpene not only counteracted the increased expression of HIF-1 $\alpha$  but also inhibited its translocation to the nucleus and decreased its half-life from 11.81 min to 4.96 min [54].

Similar results were obtained in three human liver cancer cell lines (Hep3B, Huh7 and HA227) [22]. In this study, however, the effects of maslinic acid were attributed to the antioxidant effect of the triterpene, since reduced levels of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) were observed in cells treated with maslinic acid. It had been previously reported that these molecules are natural enhancers of the expression of both HIF-1 $\alpha$  and VEGF in cancer cells [55].

### 2.1.3. The Antitumor Activity of Maslinic Acid also Occurs *in Vivo*

Only a few studies up to now have assessed the antitumor activity of maslinic acid in animal models of cancer disorders, compared to the extensive number of references about its *in vitro* effects and their mechanisms. However, the positive outcomes achieved in all them are encouraging and stimulate further research in this field.

The first *in vivo* approach to the antitumor activity of maslinic acid was performed with athymic nu/nu mice in which xenograft pancreatic cells were implanted [42]. The subcutaneous administration of 10 and 50 mg/kg of the triterpene significantly decreased in a dose-dependent manner both the volume and the weight of the tumors, which in turn showed an increased number of apoptotic cells (from 8% in the control group to 21% and 38% in 10 mg/kg and 50 mg/kg groups, respectively) and a reduced expression of two NF- $\kappa$ B-regulated anti-apoptotic genes, Survivin and Bcl-xl.

More recently, Sánchez-Tena *et al.* [56] assessed the effect of a maslinic acid-enriched diet (100 mg/kg) in Apc<sup>Min/+</sup> mice, a common animal model of spontaneous intestinal polyposis. Results showed that, after a 6-week treatment period, maslinic acid inhibited the formation of polyps in the small intestine by 45%. Microarray analyses of gene expression profiles suggested that the compound inhibited cell-survival signaling and inflammation pathways.

Finally, bladder cancer has also been targeted by maslinic acid, after implanting T24 and 253J cells in nude mice. Both the size and the weight of the tumors were dose-dependently and significantly reduced in the animals treated with intraperitoneal injections of 20 mg/kg of the triterpene every other day over 35 days [47].

In summary, there is strong evidence that maslinic acid targets a variety of signaling pathways that finally trigger an anticarcinogenic effect, both *in vitro* and *in vivo*. Consequently, maslinic acid is emerging as a potential agent for the treatment of cancer disorders, either alone or in combination with other drugs.

## 2.2. Maslinic Acid and Diabetes

The role of maslinic acid in glucose metabolism has also been extensively studied. Wen *et al.* [57] provided the first evidence of the inhibitory effect of the triterpene on glycogen phosphorylases (GP), which catalyze the first step of glycogen breakdown. In a first *in vitro* assay using GP $\alpha$  (activated form of the enzyme) isolated from rat liver, maslinic acid inhibited the enzyme with an IC<sub>50</sub> of 99  $\mu$ M, being

6-fold more potent than caffeine, an established GP inhibitor. Based on this finding, the hypoglycemic activity of the triterpene was evaluated *in vivo*, using a mouse model of diabetes induced by adrenalin, which is known to indirectly stimulate glycogenolysis and thus increase glucose blood concentration. After the oral administration of maslinic acid (100 mg/kg) for 7 days, fasted plasma glucose appeared to be up to 46% lower, compared to animals that had received only the vehicle. Further work of the same authors went into detail about the mechanism of inhibition of maslinic acid on GP. The crystal structure of the complex GPb (inactivated form of the enzyme)-maslinic acid was determined, which revealed that the triterpene binds at the allosteric activator site, where the physiological activator AMP binds [58].

The *in vivo* antidiabetic effect of maslinic acid has been also proved in KK- $A^y$  mice [59], an animal model for obesity and Type II non-insulin-dependent diabetes. Single oral administrations of the triterpene at doses of 10 and 30 mg/kg significantly diminished plasma glucose at 2 and 4 h after administration, and at the highest dose the effect was sustained up to 7 h. Similar results were obtained when maslinic acid was given daily for 2 weeks at the same doses, being the reduction in both cases of approximately 30%, with respect to control animals. Furthermore, after the repeated oral administration of 10 and 30 mg/kg of the triterpene, a dose-dependent reduction of plasma insulin levels was observed, as well as a decrease of blood glucose concentrations in the insulin tolerance test, *i.e.*, after the subcutaneous injection of insulin. The latter effect might be attributed to the normalization of plasma adiponectin levels, which was observed in groups treated with both 10 and 30 mg/kg doses [59].

Another animal model commonly used in the study of diabetes is the streptozotocin (STZ)-induced hyperglycemic rats. Khathi *et al.* [60] assessed the effect of maslinic acid (80 mg/kg, *p.o.*) on postprandial blood glucose in this model, and observed that the co-administration of the triterpene with either sucrose or starch significantly reduced the levels of glucose in plasma up until 120 min, in a similar way to that of acarbose, the positive control. Further research was carried out in order to elucidate the mechanism by which maslinic acid exerted the hypoglycemic effect. On one hand, treatment with the triterpene reversed the higher expression of SGLT1 and GLUT2 found in diabetic animals compared to controls. These transporters are implicated in the intestinal absorption of glucose, thus their downregulation, which was similar to that produced by the standard drugs insulin and metformin, contributed to diminishing plasma glucose. Similarly, the expression of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase, which are carbohydrates hydrolyzing enzymes, was attenuated in the small intestine of STZ-induced diabetic rats [60].

The lowering effect of maslinic acid on blood glucose of STZ-induced diabetic rats was consistent with that observed in a previous study [61], in which the triterpene was administered orally at a dose of 50 mg/kg for 28 days and the reduction of plasma glucose reached 66% at the end of the period. These results were obtained as part of a study about the beneficial effect of maslinic acid on cerebral ischemic injury, which will be discussed later.

Although the antidiabetic effect of maslinic acid has been extensively proved, little is known about the underlying mechanism of action. Liu *et al.* [62] confirmed the inhibitory activity of the triterpene on GP $\alpha$  ( $IC_{50}$  of 6.9  $\mu$ M) using cell cultures of the hepatic cell line HepG2. More remarkably, the authors also hypothesized that maslinic acid targets the insulin signaling pathway [63], and found that incubation with the compound resulted in increased insulin receptor  $\beta$  (IR $\beta$ ) phosphorylation [62]. Downstream events of IR $\beta$  activation include Akt phosphorylation, which in turn phosphorylates and

inactivates glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). GSK3 $\beta$  is a central enzyme in the regulation of glucose metabolism, since one of its targets is glycogen synthase. The lack of GSK3 $\beta$  activity allows glycogen synthase to be functional, thus resulting in glycogen build-up. Both Akt phosphorylation and GSK3 $\beta$  were increased in HepG2 cells in response to maslinic acid treatment, and the higher amount of glycogen content correlated with these findings. Interestingly, when maslinic acid was given orally to mice fed a high-fat diet, blood glucose concentration was markedly diminished at both doses (50 and 100 mg/kg). Moreover, the highest dose improved hyperinsulinemia and adiposity, and also increased hepatic glycogen [62].

All together, the results suggest that maslinic acid is a natural antidiabetic compound, which could be helpful to maintain the levels of blood glucose within the physiological range and thus contribute to the pharmacological treatment of the disease.

### 2.3. Maslinic Acid as Antioxidant and Anti-Inflammatory

The antioxidant effect of maslinic acid was first evaluated by Montilla *et al.* [64] in a model of oxidative status induced by CCl<sub>4</sub>, which induces lipid peroxidation. Pre-treatment of the rats once daily for 3 days with the triterpene at doses of 50 and 100 mg/kg reduced by approximately 18% plasma levels of endogenous lipid peroxides, at both doses, and by 6.5% and 19%, respectively, the susceptibility of plasma to lipid peroxidation [64]. Similarly, the triterpene isolated from the flowers of *Punica granatum* prevented the CuSO<sub>4</sub>-induced oxidation of rabbit plasma LDL, monitored by the formation of dienes, by 33.8% [65]. More recently, Allouche *et al.* [66] conducted an exhaustive study about the antioxidant properties of several pentacyclic triterpenic diols and acids on LDL particles isolated from human plasma. Maslinic acid not only retarded the initiation and decreased the rate of CuSO<sub>4</sub>-induced LDL oxidation, but also showed peroxyl radical scavenging activity and a slight metal (copper) chelating effect.

Further research has been done in macrophages, which play a role in the defensive system of the organism in response to activation by a pathogen [67]. Cells were isolated from murine peritoneum and activated with lipopolysaccharide (LPS), a compound that gives rise to a potent inflammatory response mediated by the production of cytokines, such as TNF- $\alpha$ , and also by reactive nitrogen and oxygen species, among others. In this study, the effect of the triterpene was tested on the synthesis of NO, superoxide and hydrogen peroxide. Although maslinic acid did not exert any direct inhibitory effects on the formation of the first two species, the compound did reduce the generation of hydrogen peroxide (IC<sub>50</sub> of 46.3  $\mu$ M), in a way that was similar to that of catalase. In addition, the release of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  was significantly reduced after treatment with maslinic acid at concentrations of 50 and 100  $\mu$ M [67].

The anti-inflammatory activity of maslinic acid has been also proved in primary cortical astrocytes [68], which could be translated to a neuroprotective effect if further confirmed *in vivo*. Cells were cultured with the triterpene (0.1, 1, 10  $\mu$ M) for 24 h before being exposed to LPS. The focus here was the TNF- $\alpha$  signaling pathway, which is in part mediated by NF- $\kappa$ B. As previously described, this transcription factor is found in the cytosol, retained by I $\kappa$ B $\alpha$ . Under stimulation, I $\kappa$ B $\alpha$  is phosphorylated and then the p65 subunit of the transcription factor is released, which allows its migration to the nucleus [39]. Maslinic acid not only suppressed the expression of TNF- $\alpha$ , but also hampered p65 translocation to the

nucleus, which was correlated with a lower phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$ . Additionally, the triterpene did inhibit the LPS-induced formation of NO, as well as mRNA and protein levels of iNOS and COX-2 [68].

Although several studies support the antioxidant activity of maslinic acid in terms of preventing LDL oxidation, the underlying mechanism remains to be clarified. In contrast, fewer assessments have been performed on the anti-inflammatory potential of the triterpene, but it seems to be driven by alterations in the TNF- $\alpha$  signaling pathway resulting in altered gene expression of enzymes involved in the inflammatory process.

#### 2.4. Maslinic Acid and Cardioprotection

To date, the antitumor, antidiabetic and antioxidant effects of maslinic acid have focused the greatest attention, but other promising activities have been attributed to the triterpene, which contribute to raise the interest for this potential nutraceutical.

The protective effect of maslinic acid against cardiovascular diseases has been studied using different approaches, which include the assessment of the triterpene in controlling risk factors such as hypertension or hyperlipidemia.

On one hand, experiments with aortic rings isolated from spontaneously hypertensive rats showed that maslinic acid exerted a concentration-dependent relaxation (IC<sub>50</sub> of 14.1  $\mu$ M), after precontraction with phenylephrine [69]. The effect was endothelium-dependent, since the removal of the endothelium attenuated the relaxation. In order to elucidate the underlying mechanism, intact (with endothelium) aortic rings were pre-incubated with NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a NO synthase inhibitor. This resulted in a diminished relaxation in intact aortic rings, indicating that NO was involved in maslinic acid-induced vasodilation.

On the other hand, in rats fed a high-cholesterol diet for 30 days, the oral administration of maslinic acid (100 mg/kg) for the last two weeks resulted in a hypolipidemic effect, as evidenced by a reduction of more than 70% in serum triglycerides, total cholesterol and LDL-cholesterol [70]. The triterpene also restored the levels of the hepatic marker enzymes lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). Similarly, both the glycogen content and the morphological alterations observed in hepatocytes were reversed in maslinic acid-treated animals, compared to controls.

The cardioprotective effect of maslinic acid has also been tested in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats [71]. Animals that had been pre-treated with maslinic acid (15 mg/kg) for 7 days showed an improved serum lipid profile with significantly decreased levels of total cholesterol, triglycerides, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol and increased HDL-cholesterol. The activity of the cardiac marker enzymes creatine kinase (CK), ALT, AST and  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT) significantly decreased. Furthermore, the oxidative status of the animals was evaluated by measuring malondialdehyde (MDA), an indicator of lipid peroxidation, and paraoxonase (PON), an atheroprotective enzyme found in HDL particles [72]. MDA levels were significantly reduced, while the activity of PON increased remarkably in rats that had received maslinic acid, compared to non-treated animals [71].

In summary, maslinic acid, as a bioactive compound present in a wide variety of natural edible sources, may contribute to the beneficial effects ascribed to the Mediterranean diet on the prevention of cardiovascular diseases [73].

### 2.5. Maslinic Acid and Neuroprotection

A series of exhaustive studies have demonstrated that maslinic acid may confer neuroprotection in some pathological situations. In a first experiment with primary cultures of rat cortical neurons, cells were incubated with different concentrations of the triterpene (0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ) and subjected to 1 h of oxygen-glucose deprivation followed by reoxygenation (24 h). Maslinic acid dose-dependently attenuated neuronal damage, which was evaluated through observation of morphological changes, release of lactate dehydrogenase (LDH) and neuronal viability [74], and this effect resulted from reduced activity of both caspase-9 and caspase-3. Upstream of caspases, high levels of NO might trigger apoptotic cell death [75]. This gaseous molecule is synthesized in great amounts by the inducible nitric oxide synthase (iNOS) in response to hypoxia [76], thus inhibition of this enzyme could be the mechanism underlying the protective effect of maslinic acid in oxygen-deprived cortical neurons. Qian *et al.* [74] observed that when challenged neurons were exposed to the triterpene (10  $\mu\text{M}$ ), the amount of NO in the culture medium was rescued to levels close to those found in normoxic conditions, which was correlated with reduced iNOS protein and mRNA levels.

In another study from the same authors, the neuroprotective effect of maslinic acid was assessed in front of glutamate-induced toxicity. Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the central nervous system, but excessive stimulation is associated with neuronal damage [77]. The removal of glutamate from the synaptic cleft takes place through the high-affinity transporters GLAST and GLT-1 located in astrocytes [78], thus ensuring the end of stimulation. In primary cultures of cortical neurons exposed to glutamate, maslinic acid did not exert any direct beneficial effects, since LDH release was comparable to that of vehicle-treated cells at all tested concentrations of maslinic acid (0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ). However, a protective effect was indeed observed when neurons were cultured with conditioned medium obtained from astrocytes that had been incubated with maslinic acid (24 h) [79]. Further experiments evidenced that the triterpene dose-dependently increased the clearance of extracellular glutamate in cultures of astrocytes, and this was attributed to enhanced expression of both GLAST and GLT-1 after exposure to maslinic acid (10  $\mu\text{M}$ ). In a last assessment with co-cultures of astrocytes and neurons, maslinic acid significantly reversed the effects of glutamate in terms of LDH release, extracellular glutamate levels and neuron survival and morphology [79].

At this point it is convenient to recall the anti-inflammatory activity of maslinic acid in primary astrocytes, which has been described in a previous section [68]. All together, the results obtained from *in vitro* studies with primary cultures of neurons and astrocytes strongly support the hypothesis that maslinic acid exerts beneficial effects in the central nervous system, thus *in vivo* studies are the next step towards considering maslinic acid a neuroprotective agent.

Guan *et al.* [61] tested whether maslinic acid prevented brain damage after a transient ischemic episode in animals. Since hyperglycemia is a risk factor for stroke [80], streptozotocin-induced diabetic rats were given the triterpene orally at doses of 5 and 50 mg/kg for 14 days. Then, a transient middle cerebral artery occlusion was performed and the consequences of the infarction were evaluated.

At both low and high doses, the triterpene decreased the infarct size in a range between 63.7% and 75.4%, depending on the dose and the time of reperfusion after the intervention (24 or 72 h). Moreover, maslinic acid treatment compensated the neurological deficits induced by the infarction, as showed by higher neurological scores recorded from animals that had received the triterpene [61].

To conclude, the recent interest for maslinic acid as a neuroprotective agent is supported not only by exhaustive *in vitro* studies on its mechanism of action but also by an *in vivo* assessment in infarcted diabetic rats. If proved in other species and pathological situations, the triterpene may be considered an adjuvant to lower the risk of occurrence of certain cerebral incidents.

## 2.6. Maslinic Acid as Antiparasitic

Historically, one of the first remarkable reports that focused the attention on the biological activities of maslinic acid was published by Xu *et al.* [17] and described the anti-HIV properties of several triterpenic acids isolated from the methanolic extract of *Geum japonicum*. Although the study did not provide mechanistic details of the inhibitory effect on HIV-1 protease, it is clearly stated that maslinic acid was the most potent compound [17]. More recently, the antibacterial activity of this triterpene was tested against different bacteria after its isolation from the methanolic extract of the leaves of *Symplocos lancifolia*. The lowest minimal inhibitory concentrations (MIC) of maslinic acid were found for *Enterococcus faecalis* (33.8  $\mu\text{M}$ ) and *Staphylococcus aureus* (135.4  $\mu\text{M}$ ) [81]. Although neither the antiviral nor the antibacterial activities of maslinic acid have been further studied exhaustively, the protective effect of the triterpene against parasitic infections has arisen much interest in recent years.

De Pablos *et al.* [82] observed that maslinic acid blocked the entrance of *Toxoplasma gondii* into Vero cells in a dose-dependent manner, with  $\text{IC}_{50}$  of 8  $\mu\text{M}$  at 48 h of treatment. The underlying mechanism seemed to be the inhibitory activity of the triterpene against proteases secreted by the parasite, which are essential for the proteolytic processing of other proteins that participate in the invasion of host cells. Concretely, the gliding motility was suppressed by up to 100% by maslinic acid (50  $\mu\text{M}$ ). Moreover, the triterpene induced morphological alterations in the endomembrane systems of the parasite, such as a greater amount of apparently empty spaces that authors attribute to a possible collapse of the Golgi apparatus. Disruptions in external and nuclear membranes were also observed and attributed to a general blockage of protein turnover, which would hinder the functionality of those proteins necessary for the structural maintenance of the membranes. The same group evidenced the anti-parasitic effect of maslinic acid in *Gallus domesticus* chicks infected with *Eimeria tenella* [83]. The animals were fed a maslinic-acid supplemented diet (90 ppm) for 21 days, and this treatment resulted in a reduced release of oocysts in the faeces by 80.1%, being more effective than the positive control with sodium salinomycin (60 ppm). Histological evaluation of the caeca revealed that the characteristic lesions of this coccidiosis were less evident in the animals that had received maslinic acid. Furthermore, the body weight gain was significantly higher in treated animals compared not only to the positive control but also to the uninfected group, indicating that besides the anticoccidial activity, the triterpene enhanced weight gain [83].

Maslinic acid has also been found effective against different species of the genus *Plasmodium*, responsible of causing malaria. *In vitro* experiments using erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* demonstrated that maslinic acid (0.1–200  $\mu\text{M}$ ) inhibited the growth of the parasite in a

dose-dependent manner [84]. At a concentration of 30  $\mu\text{M}$  (close to the  $\text{IC}_{50}$ ), the triterpene reduced parasitaemia to 4% (compared to 8% in untreated red blood cells) and slowed down the cell cycle, since only the infective (schizonts) and immature (new rings) forms, but not the mature forms (trophozoites), were observed in the erythrocytes. However, the removal of maslinic acid from the medium permitted the infection to resume, meaning that the triterpene acts as a parasitostatic agent [84]. This effect was further confirmed *in vivo* with ICR mice infected with the lethal strain of *Plasmodium yoelii* [85]. The intraperitoneal injection of 40 mg/kg for 4 days increased the survival rate of the animals to 80%, compared to 20% found in animals without any experimental intervention, and this was associated with an arrest of the maturation of the parasite in the erythrocytes. In addition, the animals that survived the primary infection were rechallenged with an identical second infection 40 days later. Parasitaemia was monitored for the following 30 days but no parasites were detected, indicating that mice were completely protected against the parasite [85]. Further research on the mechanism of action underlying the antimalarial activity of maslinic acid showed that the compound hampers the maturation of the parasite inside the erythrocytes by inhibiting different proteins [86].

To sum up, several lines of evidence point to maslinic acid as antiparasitic and/or parasitostatic agent. Further research is needed in order to confirm its efficacy in target species, which would allow the use of maslinic acid either alone or in combination with other therapeutic strategies for the treatment of parasitoses.

### 2.7. Maslinic Acid and Growth

The growth-stimulating activity of maslinic acid has been studied in rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*) [87,88], in order to determine whether it can be used as a feed additive in pond aquaculture to increase production rates. In both reports, the animals were fed a maslinic acid-enriched diet (1, 5, 25 and 250 mg/kg diet) twice daily for 225 days. At the end of the period, trouts that had received the highest dose of the triterpene reached a body weight that was almost 30% higher compared to the group fed the standard diet. While the first study focused on the consequences of maslinic acid consumption on the liver, the second assessed the effects on white muscle. Both of them found similar results in all the variables analyzed. The weight of the liver and the white muscle from animals that ingested the highest amount of the triterpene was 52.1% and 39.8% higher, respectively, compared to the corresponding control groups. Protein, DNA and RNA levels were evaluated in order to get some insight into the nature of the increased weight. Total DNA, which is indicative of hyperplasia, was remarkably higher in liver and white muscle, as well as RNA content. These findings were correlated with a stimulation of the protein-synthesis efficiency in both cases. Observation of the hepatic structure under the light and electron microscopes revealed a larger degree of cell packaging in the parenchyma of livers from animals that were fed the diet containing 250 mg/kg of maslinic acid, together with a major proportion of rough endoplasmic reticulum, greater number of mitochondria and considerable quantities of peripheral glycogen granules [87].

The latest contribution in this field aimed at identifying the differences in liver protein profile between fish fed a maslinic acid-supplemented diet and fish fed a standard diet [89]. The experimental design was similar to that followed in the above-mentioned studies, except for the animal species, which was the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). The diet contained 100 mg/kg of the triterpene and

was supplied over 210 days. The proteomic analysis of the liver revealed that the expression of 19 proteins was altered, being either up- or down-regulated. These included proteins involved in a wide range of metabolic pathways, such as glucose, sterol and amino acid metabolism, protein synthesis and folding, oxidative stress, detoxification and xenobiotic metabolism, immune system and cell proliferation [89]. Beyond the effects of the triterpene on the liver protein profile, this study provides evidence of the validity of the method to characterize the differential expression of liver proteins after a nutritional intervention.

In conclusion, maslinic acid appears to be a promising compound to stimulate growth by means of affecting protein synthesis. It remains to be investigated whether this effect also occurs in other species, being those subjected to intensive animal farming of particular interest. If proved, maslinic acid may be considered a natural growth promoter and thus constitute another alternative to the use of hormones or antibiotics to increase production rates.

### 2.8. Other Biological Activities

To date, the previously described health-enhancing properties of maslinic acid have focused the major attention, as evidenced by the fact that each of them has been addressed by several studies. However, maslinic acid has also been attributed a variety of other biological effects, which include the inhibition of elastase [90] and tyrosinase [91] *in vitro*, the suppression of osteoclastogenesis in cell cultures and the prevention of ovariectomy-induced bone loss in mice [92], antinociceptive and antiallodynic effects in different pain models in mice [93], and the ability to alter the structural properties of biological membranes [94].

## 3. Conclusion and Future Prospects

Maslinic acid is a natural pentacyclic triterpene present in a variety of plant species, many of them being common ingredients of plant-based dietary patterns, such as the Mediterranean diet. In recent years, a number of studies assessing its biological effects have raised interest in this compound. These include not only health-enhancing properties, such as cardioprotective or neuroprotective, but also a therapeutic potential that may help in the treatment of several disorders, such as cancer, diabetes or parasitoses. However, the amount of maslinic acid in natural edible sources is low, and data about its pharmacokinetics, which we are currently assessing in our laboratory, show that the triterpene has a poor oral bioavailability. From this it would appear that dietary maslinic acid is not sufficient to reach effective concentrations in target organs, thus the compound should be supplied in pure form, *i.e.* as a nutraceutical. Nevertheless, maslinic acid is in the spotlight of research on this field. Further studies will surely provide new mechanisms of action to explain the effects already described or even widen the spectrum of biological activities of this pentacyclic triterpene.

## Acknowledgments

This work was supported by grants AGL2009-12866 and AGL2013-41188-R from Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, and grants 2009SGR471 and 2014SGR1221 from Generalitat de



Catalunya, Spain. G.L.M. was a recipient of a fellowship Ajuts de Personal Investigador en Formació de la Universitat de Barcelona (APIF-UB) and M.S.G. of a fellowship from project 2009SGR471.

### Author Contributions

JMP and GLM designed the content of the review; JMP, MEJ, GLM and MSG compiled the data; JMP and GLM wrote the manuscript; JMP, MEJ, GLM and MSG revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

1. Sánchez-González, M.; Lozano-Mena, G.; Juan, M.E.; García-Granados, A.; Planas, J.M. Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 339–346.
2. Bächler, L. *Chemische Untersuchungen über die Früchte von Crataegus oxyacantha* L. (*Monographie der Mehlbeeren*); Universität Basel: Basel, Switzerland, 1927.
3. Tschesche, R.; Fugmann, R. Crataegolsäure, ein neues triterpenoid aus *Crataegus oxyacantha*. Ein beitrag zur konstitution der  $\alpha$ -amyrine. *Chem. Ber.* **1951**, *84*, 810–826.
4. Tschesche, R.; Heesch, A.; Fugmann, R. Über triterpenoide, III. Mittelteil.: Zur kenntnis der crataegolsäure. *Chem. Ber.* **1953**, *86*, 626–629.
5. Caglioti, L.; Cainelli, G.; Minutilli, F. Constitution of maslinic acid. *Chim. Ind.* **1961**, *43*, 278.
6. Caputo, R.; Mangoni, L.; Monaco, P.; Previtiera, L. Triterpenes in husks of *Olea europaea*. *Phytochemistry* **1974**, *13*, 1551–1552.
7. Vioque, A.; Morris, L. Minor components of olive oils. I. Triterpenoid acids in an acetone-extracted orujo oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1961**, *38*, 458–488.
8. Bianchi, G.; Pozzi, N.; Vlahov, G. Pentacyclic triterpene acids in olives. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 205–207.
9. Xu, R.; Fazio, G.C.; Matsuda, S.P.T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 261–291.
10. Tschesche, R.; Poppel, G.; Über Triterpene, V. Zur Kenntnis der crataegolsäure und über zwei neue triterpencarbonsäuren aus *Crataegus oxyacantha* L. *Chem. Ber.* **1959**, *92*, 320–328.
11. Stiti, N.; Triki, S.; Hartmann, M.A. Formation of triterpenoids throughout *Olea europaea* fruit ontogeny. *Lipids* **2007**, *42*, 55–67.
12. 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.
13. 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.

14. Lu, H.; Xi, C.; Chen, J.; Li, W. Determination of triterpenoid acids in leaves of *Eriobotrya japonica* collected at in different seasons. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2009**, *34*, 2353–2355.
15. Banno, N.; Akihisa, T.; Tokuda, H.; Yasukawa, K.; Taguchi, Y.; Akazawa, H.; Ukiya, M.; Kimura, Y.; Suzuki, T.; Nishino, H. Anti-inflammatory and antitumor-promoting effects of the triterpene acids from the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 1995–1999.
16. Kim, D.H.; Han, K.M.; Chung, I.S.; Kim, D.K.; Kim, S.H.; Kwon, B.M.; Jeong, T.S.; Park, M.H., Ahn, E.M.; Baek, N.I. Triterpenoids from the flower of *Campsis grandiflora* K. Schum. as human acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase inhibitors. *Arch. Pharm. Res.* **2005**, *28*, 550–556.
17. 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.
18. Yoshida, T.; Okuda, T.; Memon, M.U.; Shingu, T. Tannins of rosaceous medicinal plants. Part 2. Gemins A, B, and C, new dimeric ellagitannins from *Geum japonicum*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1985**, *1*, 315–321.
19. Zou, Z.M.; Cong, P.Z. Studies on the chemical constituents from roots of *Agastache rugosa*. *Yao Xue Xue Bao* **1991**, *26*, 906–910.
20. Shin, S.; Kang, C.A. Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. *Lett. Appl. Microbiol.* **2003**, *36*, 111–115.
21. Romero, C.; García, A.; Medina, E.; Ruiz-Méndez, M.V.; de Castro, A.; Brenes, M. Triterpenic acids in table olives. *Food Chem.* **2010**, *118*, 670–674.
22. Lin, C.C.; Huang, C.Y.; Mong, M.C.; Chan, C.Y.; Yin, M.C. Antiangiogenic potential of three triterpenic acids in human liver cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 755–762.
23. 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.
24. Kalogeropoulos, N.; Chiou, A.; Ioannou, M.; Karathanos, V.T.; Hassapidou, M.; Andrikopoulos, N.K. 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.
25. Li, G.L.; You, J.M.; Song, C.H.; Xia, L.; Zheng, J.; Suo, Y.R. 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.
26. Juan, M.E.; Wenzel, U.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Planas, J.M.; Daniel, H. Maslinic acid, a natural compound from olives, induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cell line. In Proceedings of the Experimental Biology 2005 Meeting, 35th International Congress of Physiological Sciences, San Diego, CA, USA, 31 March–6 April 2005.
27. Juan, M.E.; Planas, J.M.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Daniel, H.; Wenzel, U. Anti-proliferative 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.
28. Reyes, F.J.; Centelles, J.J.; Lupiáñez, J.A.; Cascante, M. (2 $\alpha$ ,3 $\beta$ )-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*, 6302–6310.
29. Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **2000**, *407*, 770–776.

30. Ott, M.; Gogvadze, V.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **2007**, *12*, 913–922.
31. Reyes-Zurita, F.J.; Rufino-Palomares, E.E.; Lupiáñez, J.A.; 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.
32. Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S.M.; Ahmad, M.; Alnemri, E.S.; Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **1997**, *91*, 479–489.
33. Reyes-Zurita, F.J.; Pachón-Peña, G.; Lizárraga, D.; Rufino-Palomares, E.E.; Cascante, M.; Lupiáñez, J.A. The natural triterpene maslinic acid induces apoptosis in HT29 colon cancer cells by a JNK-p53-dependent mechanism. *BMC Cancer* **2011**, *154*:1–154:13.
34. Tsuruta, F.; Sunayama, J.; Mori, Y.; Hattori, S.; Shimizu, S.; Tsujimoto, Y.; Yoshioka, K.; Masuyama, N.; Gotoh, Y. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J.* **2004**, *23*, 1889–1899.
35. Deng, Y.; Ren, X.; Yang, L.; Lin, Y.; Wu, X. A JNK-dependent pathway is required for TNF $\alpha$ -induced apoptosis. *Cell* **2003**, *115*, 61–70.
36. Wilkinson, J.C.; Wilkinson, A.S.; Scott, F.L.; Csomos, R.A.; Salvesen, G.S.; Duckett, C.S. Neutralization of Smac/Diablo by inhibitors of apoptosis (IAPs). A caspase-independent mechanism for apoptotic inhibition. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 51082–51090.
37. Miyashita, T.; Krajewski, S.; Krajewska, M.; Wang, H.G.; Lin, H.K.; Liebermann, D.A.; Hoffman, B.; Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* **1994**, *9*, 1799–1805.
38. Micheau, O.; Tschopp, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **2003**, *114*, 181–190.
39. Napetschnig, J.; Wu, H. Molecular basis of NF- $\kappa$ B signaling. *Annu. Rev. Biophys.* **2013**, *42*, 443–468.
40. Karin M. Nuclear factor- $\kappa$ B in cancer development and progression. *Nature* **2006**, *441*, 431–436.
41. Stennicke, H.R.; Jürgensmeier, J.M.; Shin, H.; Deveraux, Q.; Wolf, B.B.; Yang, X.; Zhou, Q.; Ellerby, H.M.; Ellerby, L.M.; Bredesen, D.; *et al.* Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 27084–27090.
42. Li, C.; Yang, Z.; Zhai, C.; Qiu, W.; Li, D.; Yi, Z.; Wang, L.; Tang, J.; Qian, M.; Luo, J.; *et al.* Maslinic acid potentiates the anti-tumor activity of tumor necrosis factor  $\alpha$  by inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Mol. Cancer* **2010**, *73*:1–73:13.
43. Hsum, Y.W.; Yew, W.T.; Hong, P.L.; Soo, K.K.; Hoon, L.S.; Chieng, Y.C.; Mooi, L.Y. Cancer chemopreventive activity of maslinic acid: Suppression of COX-2 expression and inhibition of NF- $\kappa$ B and AP-1 activation in Raji cells. *Planta Med.* **2011**, *77*, 152–157.
44. Dannenberg, A.J.; Subbaramaiah, K. Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: Rationale and promise. *Cancer Cell* **2003**, *4*, 431–436.
45. Schulze-Osthoff, K.; Ferrari, D.; Riehemann, K.; Wesselborg, S. Regulation of NF-kappa B activation by MAP kinase cascades. *Immunobiology* **1997**, *198*, 35–49.
46. Wu, D.M.; Zhao, D.; Li, D.Z.; Xu, D.Y.; Chu, W.F.; Wang, X.F. Maslinic acid induces apoptosis in salivary gland adenoid cystic carcinoma cells by Ca<sup>2+</sup>-evoked p38 signaling pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2011**, *383*, 321–330.

47. 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.* **2014**, *392*, 281–287.
48. Villar, V.H.; Vögler, O.; Barceló, F.; Gómez-Florit, M.; Martínez-Serra, J.; Obrador-Hevia, A.; Martín-Broto, J.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Alemany, R. Oleanolic and maslinic acid sensitize soft tissue sarcoma cells to doxorubicin by inhibiting the multidrug resistance protein MRP-1, but not P-glycoprotein. *J. Nutr. Biochem.* **2014**, *25*, 429–438.
49. He, X.; Liu, R.H. Triterpenoids isolated from apple peels have potent anti-proliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4366–4370.
50. Zhong, H.; de Marzo, A.M.; Laughner, E.; Lim, M.; Hilton, D.A.; Zagzag, D.; Buechler, P.; Isaacs, W.B.; Semenza, G.L.; Simons, J.W. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 5830–5835.
51. Rankin, E.B.; Giaccia, A.J. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 678–685.
52. Bourboulia, D.; Stetler-Stevenson, W.G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin. Cancer Biol.* **2010**, *20*, 161–168.
53. Mekkawy, A.H.; Morris, D.L.; Pourgholami, M.H. Urokinase plasminogen activator system as a potential target for cancer therapy. *Future Oncol.* **2009**, *5*, 1487–1499.
54. Park, S.Y.; Nho, C.W.; Kwon, D.Y.; Kang, Y.H.; Lee, K.W.; Park, J.H. Maslinic acid inhibits the metastatic capacity of DU145 human prostate cancer cells: Possible mediation via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  signalling. *Br. J. Nutr.* **2013**, *109*, 210–222.
55. Pialoux, V.; Mounier, R.; Brown, A.D.; Steinback, C.D.; Rawling, J.M.; Poulin, M.J. Relationship between oxidative stress and HIF-1 $\alpha$  mRNA during sustained hypoxia in humans. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46*, 321–326.
56. Sánchez-Tena, S.; Reyes-Zurita, F.J.; Díaz-Moralli, S.; Vinardell, M.P.; Reed, M.; García-García, F.; Dopazo, J.; Lupiáñez, J.A.; Günther, U.; Cascante, M. Maslinic acid-enriched diet decreases intestinal tumorigenesis in Apc<sup>Min/+</sup> mice through transcriptomic and metabolomic reprogramming. *PLoS One.* **2013**, *8*, e59392.
57. 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*, 4944–4948.
58. Wen, X.; Sun, H.; Liu, J.; Cheng, K.; Zhang, P.; Zhang, L.; Hao, J.; Zhang, L.; Ni, P.; Zographos, S.E.; *et al.* Naturally occurring pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase: Synthesis, structure-activity relationships, and X-ray crystallographic studies. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3540–3554.
59. Liu, J.; Sun, H.; Duan, W.; Mu, D.; Zhang, L. Maslinic acid reduces blood glucose in KK-A<sup>y</sup> mice. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 2075–2078.
60. Khathi, A.; Serumula, M.R.; Myburg, R.B.; van Heerden, F.R.; Musabayane, C.T. Effects of *Syzygium aromaticum*-derived triterpenes on postprandial blood glucose in streptozotocin-induced diabetic rats following carbohydrate challenge. *PLoS One* **2013**, *8*, e81632.

61. 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*, 1829–1839.
62. Liu, J.; Wang, X.; Chen, Y.P.; Mao, L.F.; Shang, J.; Sun, H.B.; Zhang, L.Y. Maslinic acid modulates glycogen metabolism by enhancing the insulin signaling pathway and inhibiting glycogen phosphorylase. *Chin. J. Nat. Med.* **2014**, *12*, 259–265.
63. Saltiel, A.R.; Kahn, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **2001**, *414*, 799–806.
64. Montilla, M.P.; Agil, A.; Navarro, M.C.; Jiménez, M.I.; García-Granados, A.; Parra, A.; Cabo, M.M. Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Med.* **2003**, *69*, 472–474.
65. Wang, R.; Wang, W.; Wang, L.; Liu, R.; Ding, Y.; Du, L. Constituents of the flowers of *Punica granatum*. *Fitoterapia* **2006**, *77*, 534–537.
66. Allouche, Y.; Beltrán, G.; Gaforio, J.J.; Uceda, M.; Mesa, M.D. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 2885–2890.
67. Márquez-Martín, A.; de la Puerta, R.; Fernández-Arche, A.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Yaqoob P. Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. *Cytokine* **2006**, *36*, 211–217.
68. 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*, 169–174.
69. 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.
70. Liu, J.; Sun, H.; Wang, X.; Mu, D.; Liao, H.; Zhang, L. Effects of oleanolic acid and maslinic acid on hyperlipidemia. *Drug Dev. Res.* **2007**, *68*, 261–266.
71. Hussain Shaik, A.; Rasool, S.N.; Abdul Kareem, M.; Krushna, G.S.; Akhtar, P.M.; Devi, K.L. Maslinic acid protects against isoproterenol-induced cardiotoxicity in albino Wistar rats. *J. Med. Food* **2012**, *15*, 741–746.
72. Mackness, M.; Mackness, B. Targeting paraoxonase-1 in atherosclerosis. *Expert Opin. Ther. Targets* **2013**, *17*, 829–837.
73. Ros, E.; Martínez-González, M.A.; Estruch, R.; Salas-Salvadó, J.; Fitó, M.; Martínez, J.A.; Corella, D. Mediterranean diet and cardiovascular health: Teachings of the PREDIMED Study. In Proceedings of the IUNS 20th Congress of Nutrition, Granada, Spain, 15–20 September 2013; pp. 330S–336S.
74. 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.* **2011**, *670*, 148–153.
75. Moncada, S.; Erusalimsky, J.D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 214–220.

76. Moro, M.A.; de Alba, J.; Leza, J.C.; Lorenzo, P.; Fernández, A.P.; Bentura, M.L.; Boscá, L.; Rodrigo, J.; Lizasoain, I. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur. J. Neurosci.* **1998**, *10*, 445–456.
77. Lau, A.; Tymianski, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch.* **2010**, *460*, 525–542.
78. Kanai, Y.; Hediger, M.A. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: Molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflügers Archiv* **2004**, *447*, 469–479.
79. 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.* **2011**, *651*, 59–65.
80. Kagansky, N.; Levy, S.; Knobler, H. The role of hyperglycemia in acute stroke. *Arch. Neurol.* **2001**, *58*, 1209–1212.
81. Acebey-Castellón, I.L.; Voutquenne-Nazabadioko, L.; Mai, D.T.H.; Roseau, N.; Bouthagane, N.; Muhammad, D.; le Debar, M.E.; Gangloff, S.C.; Litaudon, M.; Sevenet, T.; *et al.* Triterpenoid saponins from *Symplocos lancifolia*. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 163–168.
82. De Pablos, L.M.; González, G.; Rodrigues, R.; García-Granados, A.; Parra, A.; Osuna, A. Action of a pentacyclic triterpenoid, maslinic acid, against *Toxoplasma gondii*. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 831–834.
83. De Pablos, L.M.; dos Santos, M.F.; Montero, E.; García-Granados, A.; Parra, A.; Osuna, A. Anticoccidial activity of maslinic acid against infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Parasitol. Res.* **2010**, *107*, 601–604.
84. Moneriz, C.; Marín-García, P.; García-Granados, A.; Bautista, J.M.; Diez, A.; Puyet, A. Parasitostatic effect of maslinic acid. I. Growth arrest of *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic stages. *Malar. J.* **2011**, *82*:1–82:10.
85. Moneriz, C.; Marín-García, P.; Bautista, J.M.; Diez, A.; Puyet, A. Parasitostatic effect of maslinic acid. II. Survival increase and immune protection in lethal *Plasmodium yoelii*-infected mice. *Malar. J.* **2011**, *103*:1–103:9.
86. Moneriz, C.; Mestres, J.; Bautista, J.M.; Diez, A.; Puyet, A. Multi-targeted activity of maslinic acid as an antimalarial natural compound. *FEBS J.* **2011**, *278*, 2951–2961.
87. Fernández-Navarro, M.; Peragón, J.; Esteban, F.J.; de la Higuera, M.; Lupiáñez, J.A. Maslinic acid as a feed additive to stimulate growth and hepatic protein-turnover rates in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. C* **2006**, *144*, 130–140.
88. Fernández-Navarro, M.; Peragón, J.; Amores, V.; de la Higuera, M.; Lupiáñez, J.A. 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.
89. Rufino-Palomares, E.; Reyes-Zurita, F.J.; Fuentes-Almagro, C.A.; de la Higuera, M.; Lupiáñez, J.A.; 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*, 3312–3325.
90. Sultana, N.; Lee, N.H. Antielastase and free radical scavenging activities of compounds from the stems of *Cornus kousa*. *Phytother Res.* **2007**, *21*, 1171–1176.

91. Ullah, F.; Hussain, H.; Hussain, J.; Bukhari, I.A.; Khan, M.T.; Choudhary, M.I.; Gilani, A.H.; Ahmad, V.U. Tyrosinase inhibitory pentacyclic triterpenes and analgesic and spasmolytic activities of methanol extracts of *Rhododendron collettianum*. *Phytother Res.* **2007**, *21*, 1076–1081.
92. Li, C.; Yang, Z.; Li, Z.; Ma, Y.; Zhang, L.; Zheng, C.; Qiu W.; Wu, X.; Wang, X.; Li, H.; *et al.* Maslinic acid suppresses osteoclastogenesis and prevents ovariectomy-induced bone loss by regulating RANKL-mediated NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways. *J. Bone Miner. Res.* **2011**, *26*, 644–656.
93. Nieto, F.R.; Cobos, E.J.; Entrena, J.M.; Parra, A.; García-Granados, A.; Baeyens, J.M. Antiallodynic and analgesic effects of maslinic acid, a pentacyclic triterpenoid from *Olea europaea*. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 737–740.
94. Prades, J.; Vögler, O.; Alemany, R.; Gómez-Florit, M.; Funari, S.S.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Barceló, F. Plant pentacyclic triterpenic acids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 752–760.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

## **ANNEX II**

**Articles relacionats amb la tesi**





## Articles relacionats amb la tesi:

Sánchez-González, M.; **Lozano-Mena, G.**; Juan, M.E.; 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, 141:4375–4381.

Sánchez-González, M.; Colom, H.; **Lozano-Mena, G.**; Juan, M.E.; Planas, JM. Population pharmacokinetics of maslinic acid, a triterpene from olives, after intravenous and oral administration in rats. *Mol Nutr Food Res.* 2014, 58:1970–1979.

Sánchez-González, M.; **Lozano-Mena, G.**; Parra, A.; Juan, M.E.; Planas, J.M. Identification in rat plasma and urine by LTQ-Orbitrap mass spectrometry of the metabolites of maslinic acid, a triterpene from olives. *J Agric Food Chem.* 2015, doi: 10.1021/jf505379g





## Analytical Methods

Liquid chromatography–mass spectrometry determination in plasma of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L.Marta Sánchez-González<sup>a</sup>, Glòria Lozano-Mena<sup>a</sup>, M. Emília Juan<sup>a,\*</sup>, Andrés García-Granados<sup>b</sup>, Joana M. Planas<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> 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<sup>b</sup> 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

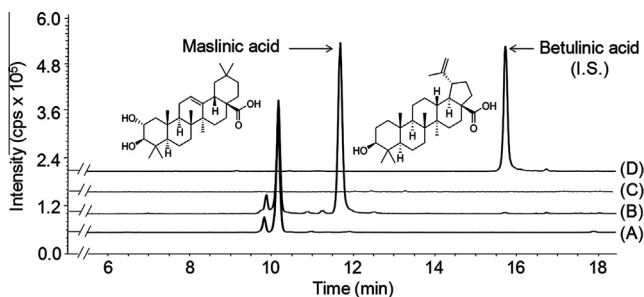
Maslinic acid ([ $2\alpha,3\beta$ ]-2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, Fig. 1) is the main pentacyclic triterpene found in the leaves and fruits of *Olea europaea* L. (Romero et al., 2010; Sánchez-Avila, Priego-Capote, Ruiz-Jiménez, & de Castro, 2009) where it acts as insect antifeedant and antimicrobial 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  $287.1 \pm 66.6$  to  $1318.4 \pm 401.0$  mg/kg in commercial olives (Romero et al., 2010) and from  $64.2 \pm 8.1$  to  $193.9 \pm 14.0$  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](mailto:marta_sanchez@ub.edu) (M. Sánchez-González), [gloria.lozano@ub.edu](mailto:gloria.lozano@ub.edu) (G. Lozano-Mena), [mejua@ub.edu](mailto:mejua@ub.edu) (M.E. Juan), [agarcia@ugr.es](mailto:agarcia@ugr.es) (A. García-Granados), [jmplanas@ub.edu](mailto: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  $\mu$ M of maslinic acid (B) and 2.5  $\mu$ 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 $\beta$ -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)- $\beta$ -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 $\Omega$ ) (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  $22 \pm 2$  °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, Merial 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L of blank plasma were spiked with 10  $\mu$ 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  $\mu$ 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-K<sub>2</sub> tubes and plasma was separated by centrifugation at 1500 $\times$ g for 15 min at 4 °C. A 200  $\mu$ L aliquot of rat plasma or calibration standard was added with 10  $\mu$ L of I.S. working solution (50  $\mu$ 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  $\mu$ 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]<sup>–</sup> 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<sub>M</sub>*) to the theoretical concentration (*Con<sub>T</sub>*) 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-K<sub>2</sub> 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 (%) <sup>a</sup>	Recovery (%) <sup>b</sup>	Process efficiency (%) <sup>c</sup>
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)

<sup>a</sup> 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.

<sup>b</sup> 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.

<sup>c</sup> 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  $\mu\text{M}$ , 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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The concentration with a signal-to-noise ratio of 10 was  $5.03 \pm 0.13$  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

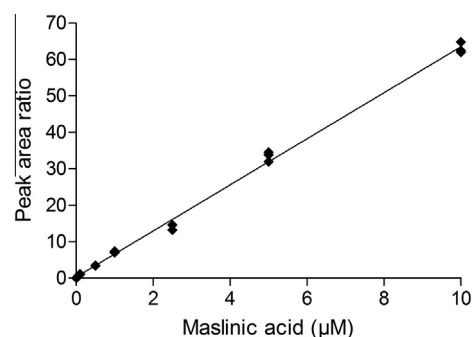


Fig. 2. Representative calibration curve of maslinic acid in rat plasma. Individual values were represented. Regression line was calculated by the least squares method, and the equation and correlation coefficient ( $r$ ) was  $y = 6.32x + 0.30$ ;  $r = 0.9986$ .

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 ( $\mu\text{M}$ )	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)

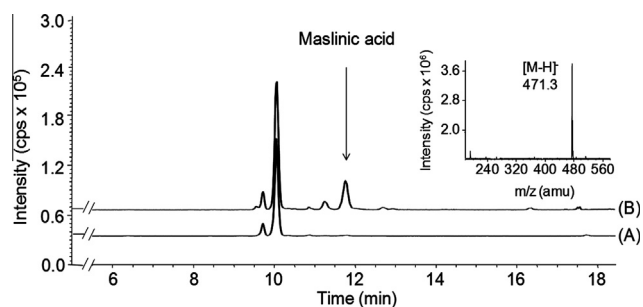


calibration standard at the retention time of maslinic acid and I.S. respectively. These results indicate that the needle wash procedure after the injection of the sample that consisted of 9 washings at the end of the run with acetonitrile:water (90:10) was sufficient to remove potential residues of 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.

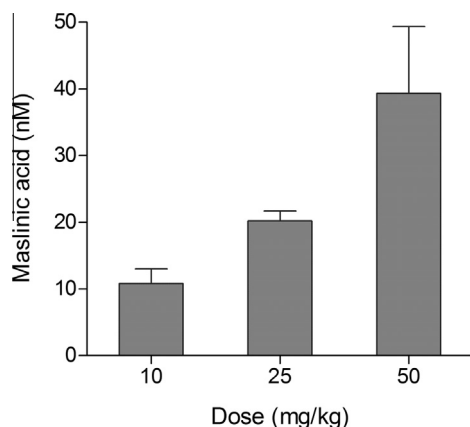
### 3.4. Verification of the method

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  $10.8 \pm 2.2$  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<sup>y</sup> 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 $\alpha$  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.



## RESEARCH ARTICLE

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

Marta Sánchez-González<sup>1</sup>, Helena Colom<sup>2</sup>, Glòria Lozano-Mena<sup>1</sup>, M. Emília Juan<sup>1</sup> and Joana M. Planas<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> 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 ( $[(2\alpha,3\beta)-2,3\text{-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid}]$ ; 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.

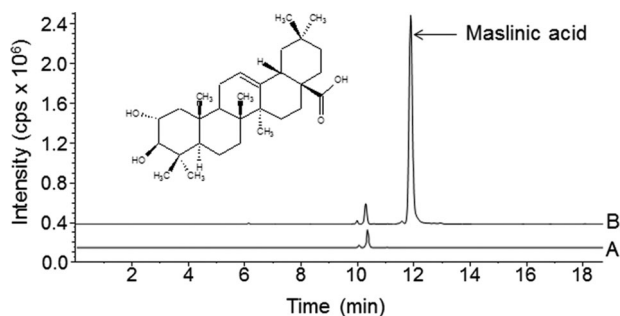
To gain a better insight into the in vivo pharmacological properties of maslinic acid, it is important to have a comprehensive understanding of its oral bioavailability. Hence, it is necessary to know if the oral intake of maslinic acid yields adequate plasma concentrations to achieve in vivo the beneficial 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 $\beta$ -3-hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid), was purchased from Extrasynthèse (Genay, France). Sodium chloride, sodium carboxymethylcellulose, and (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -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 $\Omega$ ) (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  $278 \pm 1$  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)- $\beta$ -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)- $\beta$ -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-K<sub>2</sub> 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 ( $V_{d_{area}}$ ), 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  $\chi^2$  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  $\eta$  and  $\varepsilon$  parameters in the final population PK model [29].

## 3 Results

### 3.1 HPLC-MS method

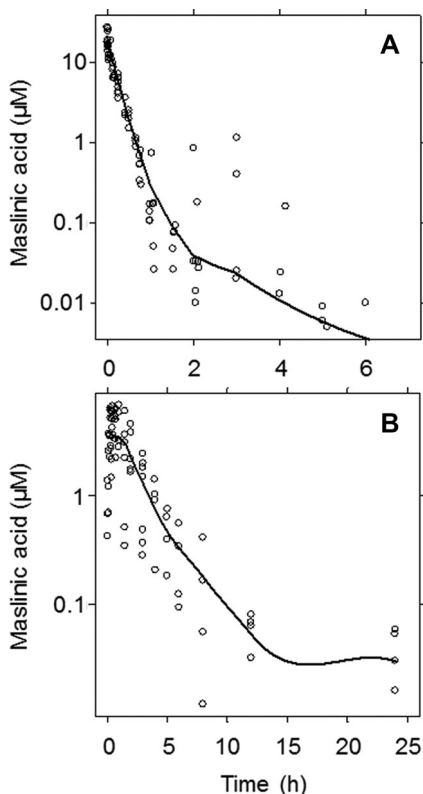
For method validation, blank plasma spiked with maslinic acid was used. The recovery of the triterpene was calculated as the ratio between the mean peak area of extracted calibration standard samples and the mean peak area of the blank plasma samples spiked with maslinic acid after extraction. Eight different calibration standards in the range 0.05–10  $\mu\text{M}$  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  $5.03 \pm 0.13$  nM with a precision of 6.22%. The linearity was assayed within the concentration range of 0.010–30  $\mu\text{M}$ , 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  $\mu\text{M}$  with a correlation coefficient up to

0.99, losing the linear tendency at 30  $\mu\text{M}$ . The intraday and interday precisions of the method were below 5.46 and 8.38%, respectively, in all the concentrations evaluated (0.05–20  $\mu\text{M}$ ). 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 <sup>a)</sup>	Noncompartmental analysis <sup>b)</sup>	Compartmental analysis <sup>c)</sup>
Intravenous route		
$C_0$ ( $\mu\text{M}$ )	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
$\text{Vd}_{\text{area}}$ (L/kg)	1.14	5.90
$\text{Vss}$ (L/kg)	0.892	1.024
$V_i$ or $V_c$ (L/kg)	0.064	0.120
CL (L/h/kg)	0.418	0.455
MRT (h)	2.13	2.26
Oral route		
$C_{\text{max}}$ ( $\mu\text{M}$ )	5.36	4.03
$T_{\text{max}}$ (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;  $\text{Vd}_{\text{area}}$ , volume of distribution associated with the terminal phase;  $\text{Vss}$ , volume of distribution at steady state;  $V_i$ , initial volume of distribution (noncompartmental analysis);  $V_c$ , volume of distribution from central compartment (compartmental analysis); CL, total plasma clearance; MRT, mean residence time;  $C_{\text{max}}$ , peak plasma concentration after oral dosing;  $T_{\text{max}}$ , 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%.

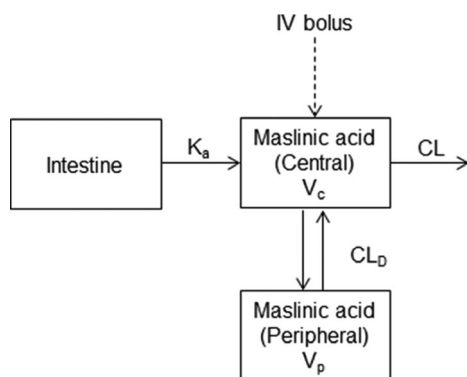
### 3.3 PK data analysis

#### 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  $V_i$  was 0.064 L/kg. The  $\text{Vss}$  as well as the  $\text{Vd}_{\text{area}}$  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  $\mu\text{M}$ ) 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  $\eta_{CL}$  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 <sup>a)</sup>	Estimate ( <i>RSE%</i> ) <sup>b)</sup> (70 kg)
<b>Structural model:</b>	
$CL = \Theta_{CL} (WGT/70)^{0.75} \times e^{\eta_{CL}}$	$V_p = \Theta_{V_p} (WGT/70)$
$V_c = \Theta_{V_c} (WGT/70)$	$K_a = \Theta_{K_a}$
$CL_D = \Theta_{CL_D} (WGT/70)^{0.75}$	$F = \Theta_F$
<b>Proportional residual error model:</b>	
$Y = IPRED + IPRED \times \varepsilon_1$	
<b>Pharmacokinetic parameters</b>	
$CL^{c)}$ (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)
<b>Inter-animal variability</b>	
I $AVCL^{d)}$ (%)	38.86 (39.27)
<b>Residual error</b>	
Proportional <sup>d)</sup> (%)	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.

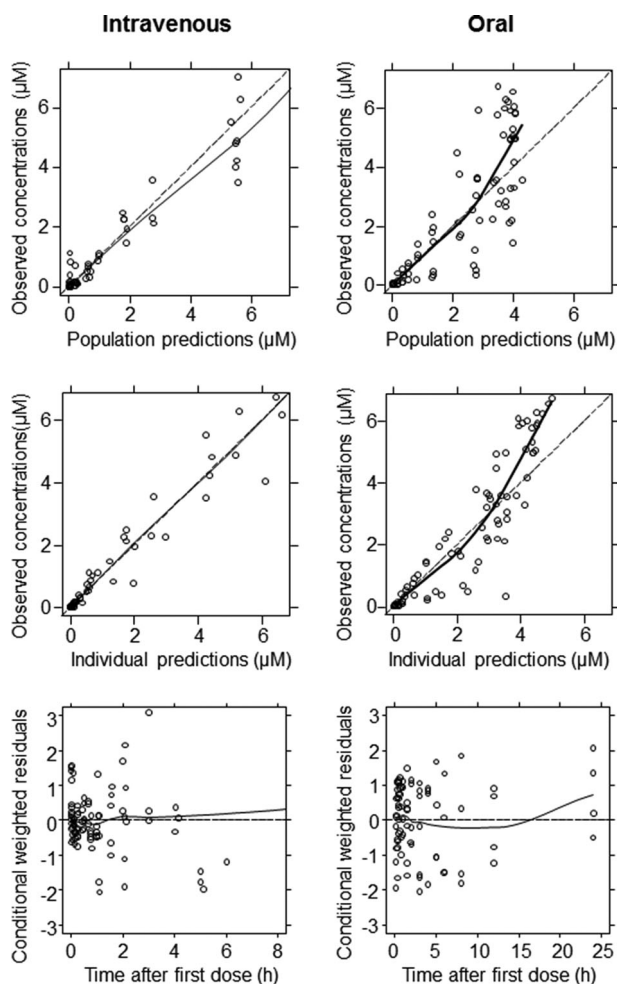
d) IAV and residual error are given as coefficients of variation (%).

tion could be performed based on individual predictions. In addition, the  $\varepsilon$ -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

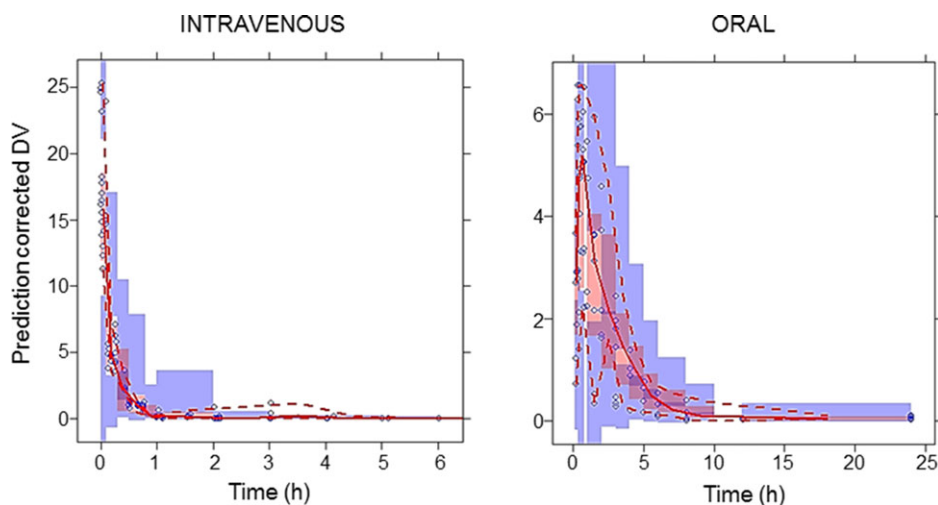
In the current study we have developed a population PK model with integrated allometry after i.v. and p.o. administrations of maslinic acid in rats. Up to now, no information has been reported regarding the PKs of this compound, although the oral bioavailability of similar pentacyclic triterpenes such 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.

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.



**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.

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<sup>-1</sup>, 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 ( $\alpha$ ) and the terminal phase rate constant ( $\beta$ ) were 4.69 and 0.0693 h<sup>-1</sup>, respectively. Because  $\alpha$  was 67.6 times higher than  $\beta$ , 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  $\mu\text{M}$ ) 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

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Liu, J., Sun, H., Duan, W., Mu, D. et al., Maslinic acid reduces blood glucose in KK-A<sup>y</sup> mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2007, *30*, 2075–2078.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 $\alpha$  signaling. *Br. J. Nutr.* 2013, *109*, 210–222.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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

Marta Sánchez-González, Gloria Lozano-Mena, Andrés Parra, M. Emilia Juan, and Joana M. Planas

*J. Agric. Food Chem.*, **Just Accepted Manuscript** • DOI: 10.1021/jf505379g • Publication Date (Web): 09 Jan 2015

Downloaded from <http://pubs.acs.org> on January 13, 2015

### Just Accepted

“Just Accepted” manuscripts have been peer-reviewed and accepted for publication. They are posted online prior to technical editing, formatting for publication and author proofing. The American Chemical Society provides “Just Accepted” as a free service to the research community to expedite the dissemination of scientific material as soon as possible after acceptance. “Just Accepted” manuscripts appear in full in PDF format accompanied by an HTML abstract. “Just Accepted” manuscripts have been fully peer reviewed, but should not be considered the official version of record. They are accessible to all readers and citable by the Digital Object Identifier (DOI®). “Just Accepted” is an optional service offered to authors. Therefore, the “Just Accepted” Web site may not include all articles that will be published in the journal. After a manuscript is technically edited and formatted, it will be removed from the “Just Accepted” Web site and published as an ASAP article. Note that technical editing may introduce minor changes to the manuscript text and/or graphics which could affect content, and all legal disclaimers and ethical guidelines that apply to the journal pertain. ACS cannot be held responsible for errors or consequences arising from the use of information contained in these “Just Accepted” manuscripts.



ACS Publications  
High quality. High impact.

Journal of Agricultural and Food Chemistry is published by the American Chemical Society, 1155 Sixteenth Street N.W., Washington, DC 20036  
Published by American Chemical Society. Copyright © American Chemical Society.  
However, no copyright claim is made to original U.S. Government works, or works produced by employees of any Commonwealth realm Crown government in the course of their duties.

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

Marta Sánchez-González<sup>1</sup>, Glòria Lozano-Mena<sup>1</sup>, Andrés Parra<sup>2</sup>, M. Emília Juan<sup>1\*</sup> and Joana M. Planas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departament de Fisiologia and Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona (UB), Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Spain

\* **Corresponding author:** Tel: +34934024505  
Fax: +34934035901  
E-mail: [jmplanas@ub.edu](mailto:jmplanas@ub.edu) (J.M. Planas)  
E-mail: [mejuaan@ub.edu](mailto:mejuaan@ub.edu) (M.E. Juan)

## ABSTRACT

Maslinic acid is a natural pentacyclic triterpenoid widely distributed in edible and medicinal plants with health-promoting activities. The identification and quantification of its metabolites is a requirement for a better understanding of the biological effects of this triterpene. Therefore, maslinic acid was orally administered to Sprague-Dawley rats at a dose of 50 mg/kg body weight. Blood and urine were withdrawn at 45 min. Samples were extracted with ethyl acetate prior to LC-APCI-LTQ-ORBITRAP analysis. Screening of plasma yielded four monohydroxylated derivatives (M1-M4), one monohydroxylated and dehydrogenated metabolite (M5), and two dihydroxylated and dehydrogenated compounds (M6 and M7). In urine, M1, M4, M5 and M6 were detected. Quantification by LC-APCI-MS revealed maslinic acid as the prevalent compound both in plasma (81.8%) and urine (73.9%), which indicates that metabolism is low and mainly attributable to phase I reactions.

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

## INTRODUCTION

Metabolite identification and quantitation play an important role in the investigation of bioactive food components. Metabolism affects not only their bioavailability, by influencing the distribution and the rate or the route of excretion, but also the evaluation of their actions, given that metabolites could either contribute to the biological activities or have toxicological effects independent of the parent compound.<sup>1</sup> In addition, the identification of metabolites is important for their potential application as biomarkers of intake in dietary intervention studies.<sup>2</sup> One of the natural molecules being assessed as a future nutraceutical is maslinic acid ([2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ]-2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid) a biologically active pentacyclic triterpene that has been isolated from different vegetal species, including edible and medicinal plants.<sup>3,4</sup> This compound is especially prevalent in the leaves and fruits of *Olea europaea* L. and has recently been found in different fresh vegetables,<sup>5</sup> legumes<sup>6</sup> and fruits.<sup>7</sup> Maslinic acid has attracted much interest due to its proven toxicological safety<sup>8</sup> and its multiple biological activities, such as antitumoral, antidiabetic, cardioprotective and neuroprotective.<sup>9</sup> Recently, the pharmacokinetics of this compound has been assessed through a population approach that indicated that maslinic acid had a fairly rapid absorption with a maximal concentration of 4.03  $\mu$ M at 30 min after the oral administration of 50 mg/kg body weight and bioavailability of 5.13%,<sup>10</sup> but the information about its metabolism remains unknown.

Therefore, the present study aims to investigate the metabolites of maslinic acid in rat plasma and urine by LTQ-ORBITRAP mass spectrometry, since the robust, accurate mass data that this high-resolution mass spectrometer provides, allows its unambiguous identification. Furthermore, maslinic acid and its metabolites were quantified by LC-APCI-MS in order to obtain a thorough understanding of the biotransformation underwent by this bioactive compound. The knowledge of the circulating derivatives of maslinic acid is relevant not only for providing information about the metabolic fate of this pentacyclic triterpene applicable to its future use as nutraceutical, but

also of putative biomarkers of table olives and olive oil consumption.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals and Reagents

Maslinic acid was derived from olive pomace by the patented method of García-Granados.<sup>11</sup> Extrasynthèse (Genay, France) supplied betulinic acid (3 $\beta$ -3-hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid), which was used as the internal standard (I.S.). Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) provided (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin and sodium carboxymethylcellulose. Acetonitrile was purchased from Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Spain) and ethyl acetate and methanol were from J.T. Baker (Deventer, Netherlands). All of them were HPLC grade solvents. Other chemicals and solvents were analytical grade reagents supplied by Sigma-Aldrich. Ultra-pure water (18 m $\Omega$ , Milli-Q water, Millipore, Milan, Italy) was used in all the experiments.

### Animals

Adult male Sprague-Dawley rats of 250 - 300 g were maintained in cages (n = 2/cage) at the Animal House Facility of the Facultat de Farmàcia of the Universitat de Barcelona. Animals were kept in an environmentally controlled room with stable humidity (50  $\pm$  10%) and temperature (22  $\pm$  2  $^{\circ}$ C) and a 12 h light:dark cycle. A commercial diet (2014 Teklad Global 14%, Harlan, Barcelona, Spain) and water were supplied *ad libitum*. Rats were fasted overnight and anesthetized by intraperitoneal injection of 90 mg/kg ketamine (Imalgene 1000, Merial Laboratorios S.A., Barcelona, Spain) and 10 mg/kg xylazine (Rompun 2%, Química Farmacéutica Bayer S.A., Barcelona, Spain). All animal manipulations accomplished the requirements set by the European Community guidelines for the care and management of laboratory animals. In addition, the experiments were conducted in the morning to lessen the effects of circadian rhythms. The research protocol (ref. 164/10) was approved by



the Ethic Committee of Animal Experimentation of the Universitat de Barcelona.

### **Dose Administration and Sample Collection**

Maslinic acid was administered to overnight fasted rats at a dose of 50 mg/kg body weight by single oral gavage. The pentacyclic triterpene was dissolved into an aqueous solution of (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin (40%, w/v) and sodium carboxymethylcellulose (0.5%) as previously described.<sup>12</sup> After oral administration, blood was withdrawn from the saphenous vein<sup>13</sup> at 45 min and placed in tubes containing EDTA-K<sub>2</sub> (Microvette CB300, Sarstedt, Granollers, Spain) to avoid coagulation. Samples were maintained on ice until centrifugation at 1500 $\times$ g (Centrifuge Megafuge 1.0R, Heraeus, Boadilla, Spain) for 15 min at 4 °C. Plasma was subsequently separated and stored at -20 °C until analysis. At 45 min post-administration, urine samples were directly collected from the urinary bladder of previously anesthetized animals and frozen at -20 °C until processing.

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

Plasma and urine were thawed before analysis and urine was centrifuged at 25000 $\times$ g for 30 min at 2 °C (Centrifuge 5417R, Eppendorf Ibérica S.L.) in order to obtain a clear supernatant. 200  $\mu$ L of either plasma or urine were spiked with 10  $\mu$ L of betulinic acid 50  $\mu$ M (I.S., dissolved in methanol-water 80:20, v/v) before being extracted with 2 mL of ethyl acetate. Each sample was strongly stirred in a vortex-mixer for 3 min and then centrifuged at 1500 $\times$ g for 15 min at 4 °C (Centrifuge Megafuge 1.0R, Heraeus). The ethyl acetate layer was carefully removed, placed in a clean conical tube and a second extraction of the residue was done. The organic supernatants were gathered together and evaporated to dryness in a vacuum concentrator (Concentrator 5301, Eppendorf Ibérica S.L., San Sebastián de los Reyes, Spain) at 45 °C. The dry residue was dissolved by adding 100  $\mu$ L of methanol-water (80:20, v/v) followed by vigorous shaking in a vortex-mixer for 5 min. Samples were

immediately sonicated for 1 min and centrifuged at 25000 $\times$ g for 15 min at 4 °C (Centrifuge 5417R, Eppendorf Ibérica S.L.). Finally, an amber vial was employed to place the clean supernatant before the analysis.

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

Samples were analyzed using an Accela liquid chromatograph (Thermo Scientific, Hemel, Hempstead, UK) equipped with a thermostated autosampler and a quaternary pump, and coupled to an LTQ-ORBITRAP Velos mass spectrometer (Thermo Scientific). The equipment was available at the Centres Científics i Tecnològics of the Universitat de Barcelona. Chromatographic separations were carried out on a Luna C18 column (150 x 2.0 mm, 5  $\mu$ m) kept at 40 °C and protected with a security guard cartridge of the same packing material (Phenomenex, Micron Analítica S.A., Madrid, Spain). Gradient elution was performed with water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) at a constant flow rate of 0.8 mL/min. The volume of injection was 10  $\mu$ L. Separation was carried out within 19 min under the following conditions: 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. An additional period of 8 min was needed for re-equilibration of the column before the ensuing injection.

Mass spectrometric analysis was conducted using an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source in the negative ion mode. Mass calibration was performed daily according to the manufacturer's guidelines. The LTQ-ORBITRAP was tuned to the optimal conditions for maslinic acid. Therefore, a 100  $\mu$ M standard solution was delivered by the LTQ syringe pump at a constant flow rate of 10 mL/min in the presence of LC mobile phase under isocratic conditions of 25% A and 75% B. Operation parameters were set as follows: vaporizer temperature, 450 °C; sheath gas, 50 arbitrary units (au); auxiliary gas flow, 5 au; sweep gas, 0 au; discharge current, 5  $\mu$ A; S-Lens RF level, 70% and capillary gas 300 °C. The data was acquired using Fourier transform full

scan with resolving power of either 60 000 or 100 000 (at  $m/z$  400) and the microscan count fixed to unity. The automatic gain control (AGC) was set at  $1 \times 10^6$ . The mass spectrometric data was collected in a range of  $m/z$  from 100 to 1000.

### MS Data Processing

Mass chromatograms and spectral data were acquired with the Xcalibur software 2.0 (Thermo Scientific). Maslinic acid metabolites were searched both manually with Xcalibur Qual Browser and also employing MetWorks software (version 1.3, Thermo Scientific). Qual Browser was employed for MS data processing and calculation of elementary compositions. The elemental composition was selected according to the accurate masses and the isotopic pattern. Mass accuracy was determined by the deviation of measured and theoretical masses relative to theoretical values, and was expressed in mDa. MetWorks software allowed the identification of metabolites by comparing the samples with controls, either of blank plasma or urine. The most commonly observed biotransformations in phase I and phase II metabolism were searched in order to find putative metabolites of maslinic acid with mass deviation of less than 5 ppm from the predicted values.

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

After the identification of maslinic acid metabolites by LC-APCI-LTQ-ORBITRAP, the compounds were quantified by LC-APCI-MS. The liquid chromatograph (Perkin-Elmer series 200, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) included a quaternary pump and a refrigerated autosampler plate, and was coupled to a single quadrupole mass spectrometer (PE Sciex API 150 EX, AB SCIEX, Spain, SL) with an APCI source at 500 °C in negative ion mode. The LC-MS system was controlled by the 1.4.2 Analyst software supplied by Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). The chromatographic conditions were the ones described for the LC-APCI-LTQ-ORBITRAP

system. For the mass spectrometer, nitrogen was used as both curtain gas (12 au) and nebulizer gas (10 au) with a nebulizing flow of -3 au. The optimum LC-APCI-MS pre-collision cell voltages were -30 V for declustering potential, -100 V for focusing potential and -5 V for entrance potential. The selected ion monitoring (SIM) mode was used for quantification of maslinic acid at  $m/z$  471.3 and betulinic acid (I.S.) at  $m/z$  455.3. The metabolites identified by LC-APCI-LTQ-ORBITRAP were quantified at  $m/z$  487.3 (M1 - M4), 485.3 (M5) and 501.3 (M6 and M7). The dwell time was set at 165 ms. Concentrations of maslinic acid in plasma and urine samples were calculated from the ratio of the peak area of the triterpene to the I.S. interpolated on an external calibration curve. Because of the absence of synthetic standards, it was assumed that LC-APCI-MS response to derivatives is similar to that of maslinic acid, thus both plasma and urine metabolites were quantified using the standard curve of the parent compound. Results were expressed as  $\mu\text{mol}$  per liter ( $\mu\text{M}$ ).

The determination of maslinic acid in plasma and urine was validated for recovery, matrix effect, precision, accuracy, linearity and sensitivity, according to the EMEA Guideline on Bioanalytical Method Validation.<sup>14</sup> Calibration standards were freshly prepared by spiking 190  $\mu\text{L}$  of rat blank plasma or urine with 10  $\mu\text{L}$  of standard solutions of maslinic acid at different concentrations, and were treated as previously indicated for the specimens collected from dosed rats. The post-extraction spiking method proposed by Matuszewski et al.<sup>15</sup> was used to establish the recovery and matrix effect. Briefly, recovery was assessed by comparing the peak areas of calibration standards with the ones obtained from blank plasma or urine spiked with maslinic acid after the extraction. Matrix effect was evaluated by comparing the peak areas obtained from blank plasma or urine spiked with the pentacyclic triterpene after the extraction to those of a solution of methanol 80% spiked with the expected concentration. Recovery and matrix effect were determined at four concentration levels (0.5, 1, 5 and 10  $\mu\text{M}$ ), while precision and accuracy were analyzed at 1, 5 and 10  $\mu\text{M}$ . Linearity was assayed in the range 0.005 - 10  $\mu\text{M}$ , which included 8 concentration levels that covered the expected

amounts in the samples. The limit of detection (LOD) was considered as the minimum concentration of maslinic acid that could be recognized by the detector and produced a signal-to-noise of 3:1. The lowest limit of quantification (LLOQ) was defined as the lowest concentration of the standard curve that could be accurately quantified and with a signal at least 10 times above the noise level.

## RESULTS

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

Maslinic acid ( $C_{30}H_{48}O_4$ ) was unambiguously identified in rat plasma and urine by comparing its retention time (9.22 min) and MS data with the standard reference. In addition, the injection into the high-resolution system LTQ-ORBITRAP gave its accurate mass ( $m/z$  471.3480) with an error of 0.4 mDa. The spectra generated for the pentacyclic triterpene in plasma and urine showed the deprotonated molecule  $[M-H]^-$  without the presence of any fragment (Figure 1 A and Figure 2 A, respectively).

Possible derivatives of maslinic acid were first predicted based on knowledge of metabolism and then searched in full scan chromatograms of rat plasma and urine samples. Afterwards, the formulas of potential metabolites were compared with that of the parent compound to refer metabolic pathways. The high mass accuracy of the LTQ-ORBITRAP analyzer enabled an extraction of individual chromatograms in a narrow interval of  $m/z$  scale ( $\pm 5$  mDa), which is useful for discarding other compounds with similar masses.<sup>16</sup> The initial screening of plasma and urine samples obtained after the oral administration of maslinic acid revealed the formation of derivatives with mass shifts of +16, +14 and +30 Da in comparison with the parent compound. Mass shifts of +32 Da, which corresponded to a double hydroxylation, were searched but were not found in the analyzed plasma and urine samples. On the other hand,

phase II metabolites of maslinic acid were not detected after screening with LC-APCI-LTQ-ORBITRAP and MetWorks software, indicating that this compound undergoes mainly phase I metabolism.

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

#### *M1 - M4 ( $m/z$ 487.3)*

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

On the other hand, in urine samples only metabolites M1 and M4 were detected (Figure 2B). The compound M1 was the most abundant, as was observed in plasma. However, M2 and M3 were not present in any of the samples analyzed, and M4 appeared in urine with low intensities. The

corresponding spectra are shown in Figure 2 B1 and B2.

#### *M5 (m/z 485.3)*

A single peak corresponding to a deprotonated molecule at *m/z* 485.3 was identified as M5. This metabolite had a retention time of 7.75 min and was found both in plasma (Figure 1C) and in urine samples (Figure 2C). The mass increment of 13.9792 Da with respect to maslinic acid (Table 1) together with the molecular formula (C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>5</sub>) calculated by the Formula Predictor software suggested that this biotransformation consists of the incorporation of a hydroxyl group and the loss of two hydrogen atoms. M5 was identified with an error of 0.23 mDa (Table 1) and a correct isotopic distribution pattern (Figure 1 C1 and Figure 2 C1).

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

Two additional compounds (M6 and M7) eluting earlier than the parent compound yielded a deprotonated molecule at *m/z* 501.3. The retention times were 4.24 and 4.65 min for M6 and M7, respectively. Since the molecular formula of both metabolites was C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>6</sub>, as calculated by the Formula Predictor software (Table 1), and the mass shift was +29.9442 Da, this biotransformation was attributed to dihydroxylation and dehydrogenation of maslinic acid. In plasma samples, M7 showed a higher relative abundance than M6 (Figure 1D), whereas in urine only M6 was detected and with very low intensities, indicating small concentrations (Figure 2D).

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

The mass chromatograms from LC-APCI-LTQ-ORBITRAP were consistent with the LC-APCI-MS chromatograms and allowed the identification of all the metabolites taking into account the relative retention times. The method was adequate for the quantification of maslinic acid in plasma samples, as indicated by the results obtained in the

validation. The mean recovery and matrix effect at the four concentration levels assayed were 99.1% and 119.1 %, respectively (Table 2). The intra-day and inter-day precision and accuracy are summarized in Table 3, showing that at all concentrations the results were well below the 15% limit established by the EMEA Guideline on Bioanalytical Method Validation.<sup>14</sup> Calibration curves were linear within the concentration range from 0.005 to 10 μM, and a representative curve is  $y = 2.39x + 0.25$ . Correlation coefficients were above 0.99. The sensitivity was suitable, since the LOD and the LLOQ were 2 and 5 nM, respectively.

Maslinic acid was the main compound in plasma samples withdrawn at 45 min after the oral administration of 50 mg/kg body weight with a concentration of  $4.83 \pm 0.85 \mu\text{M}$  (Figure 3A). The identified metabolites were found in plasma at much lower concentrations than the parent compound. The most abundant derivative was the monohydroxylated and dehydrogenated metabolite M5 (*m/z* 485.3) at  $0.77 \pm 0.18 \mu\text{M}$ , followed by the monohydroxylated metabolite M1 (*m/z* 487.3) that reached the amount of  $0.15 \pm 0.03 \mu\text{M}$ . The other monohydroxylated metabolites were found at 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, respectively (Figure 3). Similarly, the dihydroxylated and dehydrogenated compounds were present in plasma in minor amounts, of  $25.1 \pm 4.1 \text{ nM}$  for M7 and  $10.3 \pm 2.3 \text{ nM}$  for M6 (Figure 3).

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

The analytical method for the determination of maslinic acid in urine was also validated to ensure a reliable quantification of both the parent compound and its metabolites. Recovery and matrix effect were analyzed at concentrations of 0.5, 1, 5 and 10 μM (Table 2). The extraction method was appropriate for the analysis of maslinic acid in urine, since it yielded recoveries between 95.6 and 99.4% (Table 2) and matrix effect values from 103 to 112%. Table 3 displays the intra- and inter-day precision and accuracy,

which were assayed by spiking blank urine at three concentrations (1, 5 and 10  $\mu\text{M}$ ). The method was precise, as evidenced by relative standard deviations (RSDs) of intra-day and inter-day assays lower than 6.90% and 7.59%, respectively, which fall below the 15% limit stipulated by the EMEA Guideline on Bioanalytical Method Validation.<sup>14</sup> The accuracy of the method met the same criterion. Linearity was observed over the concentration range assayed (0.005 - 10  $\mu\text{M}$ ), with a representative calibration curve of  $y = 0.58x + 0.05$  and correlation coefficients that surpassed 0.99. The LOD was 2 nM and the LLOQ was 5 nM, meaning appropriate sensitivity.

Maslinic acid and its metabolites were quantified by LC-APCI-MS in urine samples obtained 45 min after the administration of the triterpene (Figure 3B). As previously observed in plasma, maslinic acid was the major compound in urine (73.9%). However, the metabolite profile in this biological fluid differed from that found in plasma. The most abundant compound was the monohydroxylated derivative M1, representing 19.9%, whereas the monohydroxylated and dehydrogenated metabolite (M5) accounted for only 4.30%. The other monohydroxylated metabolite (M4) and the dihydroxylated and dehydrogenated compound M6 represented only a 0.71% and 1.23%, respectively.

## DISCUSSION

A large variety of drugs and bioactive compounds from the diet, like maslinic acid, are considered as xenobiotics by the organism. Consequently, a detoxification process is activated, consisting of the increase of its hydrophilicity via metabolism in order to facilitate their excretion.<sup>17</sup> The biotransformation of xenobiotics can take place through phase I reactions, based on oxidation, reduction and hydrolysis processes, and phase II reactions, which comprise glucuronidation, sulfation, methylation, acetylation and glutathione conjugation.<sup>1,18</sup> To devise a comprehensive strategy for the detection in plasma and urine of maslinic acid and its metabolites, the derivatives arising from both processes were considered, but only phase I metabolites were found.

The analysis by LTQ-ORBITRAP allowed the identification of a monohydroxylated metabolite with four isomers in plasma samples (M1 - M4) and two in urine (M1 and M4). The metabolism of pentacyclic triterpenes has been scarcely assessed with only an *in vivo* study for boswellic acids.<sup>19</sup> In agreement with our study, Krüger et al.<sup>19</sup> found in plasma two monohydroxylated derivatives after the oral administration of 12.5 mg/kg of boswellic acids to female albino Wistar rats. The fact that hydroxylation is the principal metabolic route of pentacyclic triterpenes has been confirmed by *in vitro* assays consisting of incubations of oleanolic acid<sup>20</sup> or boswellic acids<sup>19,21</sup> with rat and human liver microsomes. Regarding maslinic acid, the biotransformation of this pentacyclic triterpene has only been investigated *in vitro* with the use of fungi such as *Cunninghamella*<sup>22</sup> and *Rhizomucor*.<sup>23</sup> These species express cytochrome P450 (CYP) enzymes that enable equivalent phase I reactions to mammalian metabolism thus being widely used in the assessment of the biotransformation of drugs and xenobiotics.<sup>24</sup> The results obtained with these microbial models of mammalian drug metabolism are in concordance with our findings. Feng et al.<sup>22</sup> described that maslinic acid was transformed by *Cunninghamella blakesleana* into three different monohydroxylated derivatives (7 $\beta$ -hydroxy, 15 $\alpha$ -hydroxy, 13 $\beta$ -hydroxy with double bond migration) and one dihydroxylated metabolite (7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -dihydro derivative). Moreover, the bioconversion of maslinic acid by *Rhizomucor miehei* also yielded a monohydroxylated metabolite, but in this case the addition of the hydroxyl group took place at the angular methyl group on position 30.<sup>23</sup> Taking into account these published data and considering that in our study four isomers of the monohydroxylated maslinic acid were detected in plasma, it could be suggested that the hydroxyl groups were added to the positions 7, 13, 15 and 30.

Maslinic acid underwent a biotransformation that yielded M5, which was detected in both plasma and urine. The mass shift of +14 Da exhibited by this metabolite was compatible with monohydroxylation followed by dehydrogenation, which could be due to the oxidation of the corresponding secondary alcohol to a ketone. The pentacyclic ring skeleton of maslinic acid has two

alcohols at the 2 and 3 positions, respectively, which are likely to be converted to a ketone. Up to now, this modification of maslinic acid has not been reported. However, this reaction has been described *in vitro* for boswellic acids after incubation with rat liver microsomes,<sup>19</sup> and also for betulinic acid after incubations with different microbial models of drug metabolism.<sup>25,26</sup> Additionally, metabolites M6 and M7 showed a mass shift of +30 Da, which corresponded to the addition of two hydroxyl groups plus the conversion of a secondary alcohol to a ketone. This result is consistent with the biotransformation observed for boswellic acids<sup>19</sup> as well as ursolic acid after the incubation with the fungus *Pestalotiopsis microspora*.<sup>27</sup> Under our experimental conditions, no metabolites resulting solely from oxidation (-2 Da) or dihydroxylation (+32 Da) reactions were found neither in plasma nor in urine.

Once the metabolites of maslinic acid were identified by LTQ-ORBITRAP, their plasmatic concentrations were quantified in order to know the degree of the biotransformation of this compound by LC-APCI-MS. After the administration of 50 mg/kg body weight of maslinic acid, this bioactive molecule was the prevalent compound in plasma and urine where it accounted for 81.8% and 73.9%, respectively. Therefore, although the results indicate that maslinic acid undergoes phase I metabolism yielding to 7 derivatives in plasma and 4 in urine, their contribution to the elimination of this pentacyclic triterpene is not preeminent, since the parent compound is excreted in urine mainly unaltered. These findings are consistent with our previous assessment of the pharmacokinetics of maslinic acid that indicated a low clearance that was attributed to minor hepatic and renal metabolism along with unchanged renal excretion.<sup>10</sup> Moreover, the oral bioavailability of 5.13% observed cannot be mainly attributed to metabolism. At present, experiments on the intestinal absorption of this compound are being conducted in our laboratory, and the results suggest a poor absorption from the gastrointestinal tract (data not shown).

In summary, the present study thoroughly characterizes for the first time the metabolite profile of maslinic acid in rat plasma and urine. Although the oral bioavailability of similar pentacyclic triterpenes has been reported, and the derivatives of some of them have been identified after incubation with different microorganisms<sup>19,25-27</sup> or rat and human microsomes,<sup>19,20</sup> none of these studies quantified the metabolites in biological fluids. Our results reveal that maslinic acid undergoes mainly phase I metabolism through hydroxylation and oxidation reactions but it is not subjected to phase II biotransformations. A total of seven metabolites were identified in plasma, four monohydroxylated derivatives (M1, M2, M3 and M4), one monohydroxylated and dehydrogenated metabolite (M5) and two dihydroxylated and dehydrogenated derivatives (M6 and M7). Only M1, M4, M5 and M6 were detected in urine. This study provides a comprehensive insight into the metabolite profile of maslinic acid, thus increasing our knowledge about the bioavailability of this bioactive food component.

## ABBREVIATIONS USED

LC-MS, Liquid chromatography-mass spectrometry; LOD, limit of detection; LLOQ, lowest limit of quantification; RSD, relative standard deviation.

## ACKNOWLEDGMENTS

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

## REFERENCES

- (1) 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.
- (2) García-Cañas, V.; Simó, C.; León, C.; Cifuentes, A. Advances in Nutrigenomics research: novel and future analytical approaches to investigate the biological activity of natural compounds and food functions. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 290-304.
  - (3) Romero, C.; García, A.; Medina, E.; Ruiz-Méndez, M. V.; de Castro, A.; Brenes, M. Triterpenic acids in table olives. *Food Chem.* **2010**, *118*, 670-674.
  - (4) 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*, 735-741.
  - (5) Lin, C. C.; Huang, C. Y.; Mong, M. C.; Chan, C.Y.; Yin, M. C. Antiangiogenic potential of three triterpenic acids in human liver cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 755-762.
  - (6) Kalogeropoulos, N.; Chiou, A.; Ioannou, M.; Karathanos, V. T.; Hassapidou, M.; Andrikopoulos, N. K. 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.
  - (7) Li, G. L.; You, J. M.; Song, C. H.; Xia, L.; Zheng, J.; Suo, Y. R. 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.
  - (8) Sánchez-González, M.; Lozano-Mena, G.; Juan, M. E.; García-Granados, A.; Planas, J. M. Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 339-346.
  - (9) Lozano-Mena, G.; Sánchez-González, M.; Juan, M. E.; Planas, J. M. Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives--a promising nutraceutical? *Molecules.* **2014**, *19*, 11538-11559.
  - (10) Sánchez-González, M.; Colom, H.; Lozano-Mena, G.; Juan, M. E.; Planas, J. M. Population pharmacokinetics of maslinic acid, a triterpene from olives, after intravenous and oral administration in rats. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 1970-1979.
  - (11) García-Granados, A. Process for the industrial recovery of oleanolic and maslinic acids contained in the olive milling by products. Patent No. 6,037,492, **2002**.
  - (12) Lozano-Mena, G.; Juan, M. E.; García-Granados, A.; Planas, J. M. Determination of maslinic acid, a pentacyclic triterpene from olives, in rat plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 10220-10225.
  - (13) 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.
  - (14) European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on Bioanalytical Method Validation, London, **2011**.
  - (15) Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3019-3030.
  - (16) Jirásko, R.; Holčápek, M.; Nobilis, M. Identification of phase I and phase II metabolites of benfluron and dimefluron in rat urine using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 2153-2162.
  - (17) Benedetti, M. S.; Whomsley, R.; Poggesi, I.; Cawello, W.; Mathy, F. X.; Delporte, M. L.; Papeleu, P.; Watelet, J. B. Drug metabolism and pharmacokinetics. *Drug Metab. Rev.* **2009**, *41*, 344-390.

- (18) Testa, B.; Krämer, S. D. The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part I. Principles and overview. *Chem. Biodivers.* **2006**, *3*, 1053-1101.
- (19) Krüger, P.; Daneshfar, R.; Eckert, G. P.; Klein, J.; Volmer, D. A.; Bahr, U.; Müller, W. E.; Karas, M.; Schubert-Zsilavecz, M.; Abdel-Tawab, M. Metabolism of boswellic acids *in vitro* and *in vivo*. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 1135-1142.
- (20) Jeong, D. W.; Kim, Y. H.; Kim, H. H.; Ji, H. Y.; Yoo, S. D.; Choi, W. R.; Lee, S.M.; Han, C. K.; Lee, H. S. Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats. *Biopharm. Drug Dispos.* **2007**, *28*, 51-57.
- (21) 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.
- (22) Feng, X.; Luan, J.; Guo, F. F.; Li, D. P.; Chu, Z. Y. Microbial transformation of maslinic acid by *Cunninghamella blakesleana*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *82*, 127-130.
- (23) Martinez, A.; Rivas, F.; Perojil, A.; Parra, A.; Garcia-Granados, A.; Fernandez-Vivas, A. Biotransformation of oleanolic and maslinic acids by *Rhizomucor miehei*. *Phytochemistry.* **2013**, *94*, 229-237.
- (24) Murphy, C.D. Drug metabolism in microorganisms. *Biotechnol Lett.* **2014**, DOI 10.1007/s10529-014-1653-8.
- (25) Chatterjee, P.; Kouzi, S. A.; Pezzuto, J. M.; Hamann, M. T. Biotransformation of the antimelanoma agent betulonic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3850-3855.
- (26) Bastos, D. Z.; Pimentel, I. C.; de Jesus, D. A.; de Oliveira, B. H. Biotransformation of betulonic and betulonic acids by fungi. *Phytochemistry.* **2007**, *68*, 834-839.
- (27) Fu, S.B.; Yang, J.S.; Cui, J. L.; Meng, Q. F.; Feng, X.; Sun, D. A. Multihydroxylation of ursolic acid by *Pestalotiopsis microspora*

isolated from the medicinal plant *Huperzia serrata*. *Fitoterapia.* **2011**, *82*, 1057-1061.

---

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



## FIGURE CAPTIONS

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

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

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

**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 Body Weight 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 <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	471.3480	471.3479	0.04	-0.22	+	+
<i>Monohydroxylated metabolites</i>								
M1	4.77	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	487.3429	487.3426	-0.05	-0.30	+	+
M2	5.33	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	487.3429	487.3425	0.13	-0.35	+	ND <sup>a</sup>
M3	6.61	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	487.3429	487.3425	0.25	-0.80	+	ND <sup>a</sup>
M4	7.13	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	487.3429	487.3424	0.9	-0.50	+	+
<i>Monohydroxylated and dehydrogenated metabolites</i>								
M5	7.75	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>5</sub>	485.3272	485.3271	0.23	0.03	+	+
<i>Dihydroxylated and dehydrogenated metabolites</i>								
M6	4.24	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>6</sub>	501.3222	501.3216	-0.37	0.18	+	+
M7	4.65	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>6</sub>	501.3222	501.3218	-0.05	-1.13	+	ND <sup>a</sup>

<sup>a</sup>ND: Not detected

**Table 2.**

Matrix Effect and Recovery of the Analytical Methods to Determine Maslinic Acid in Rat Plasma and Urine by LC-APCI-MS.

Theoretical concentration ( $\mu\text{M}$ )	Recovery (%) <sup>a</sup>		Matrix effect (%) <sup>a</sup>	
	Plasma	Urine	Plasma	Urine
0.5	98.8 $\pm$ 1.6 (n = 9)	95.6 $\pm$ 2.7 (n = 3)	108.8 $\pm$ 3.1 (n = 3)	110.6 $\pm$ 1.8 (n = 3)
1	96.8 $\pm$ 2.1 (n = 9)	96.7 $\pm$ 2.2 (n = 8)	124.7 $\pm$ 1.1 (n = 3)	112.0 $\pm$ 4.7 (n = 6)
5	100.2 $\pm$ 4.2 (n = 8)	98.7 $\pm$ 1.8 (n = 8)	116.1 $\pm$ 2.2 (n = 3)	111.5 $\pm$ 3.0 (n = 10)
10	100.4 $\pm$ 5.2 (n = 6)	99.4 $\pm$ 2.0 (n = 6)	126.7 $\pm$ 2.3 (n = 3)	109.7 $\pm$ 2.3 (n = 3)

<sup>a</sup>Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M.

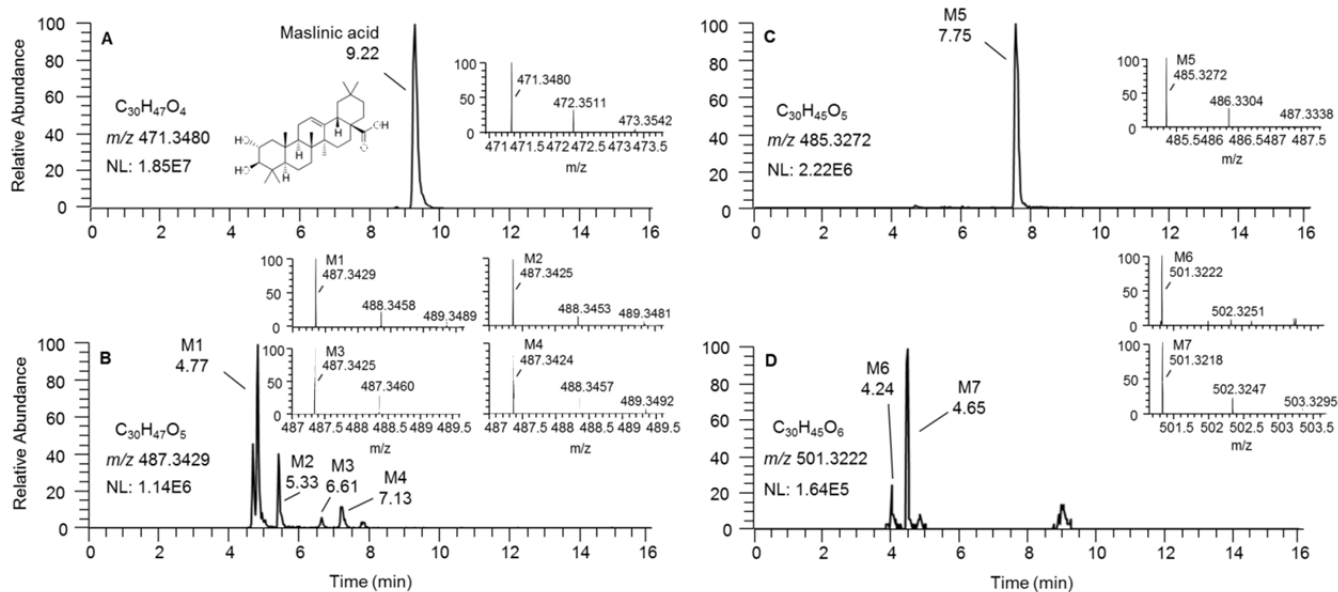
**Table 3.**

Precision and Accuracy of the Analytical Methods to Determine Maslinic Acid in Rat Plasma and Urine by LC-APCI-MS.

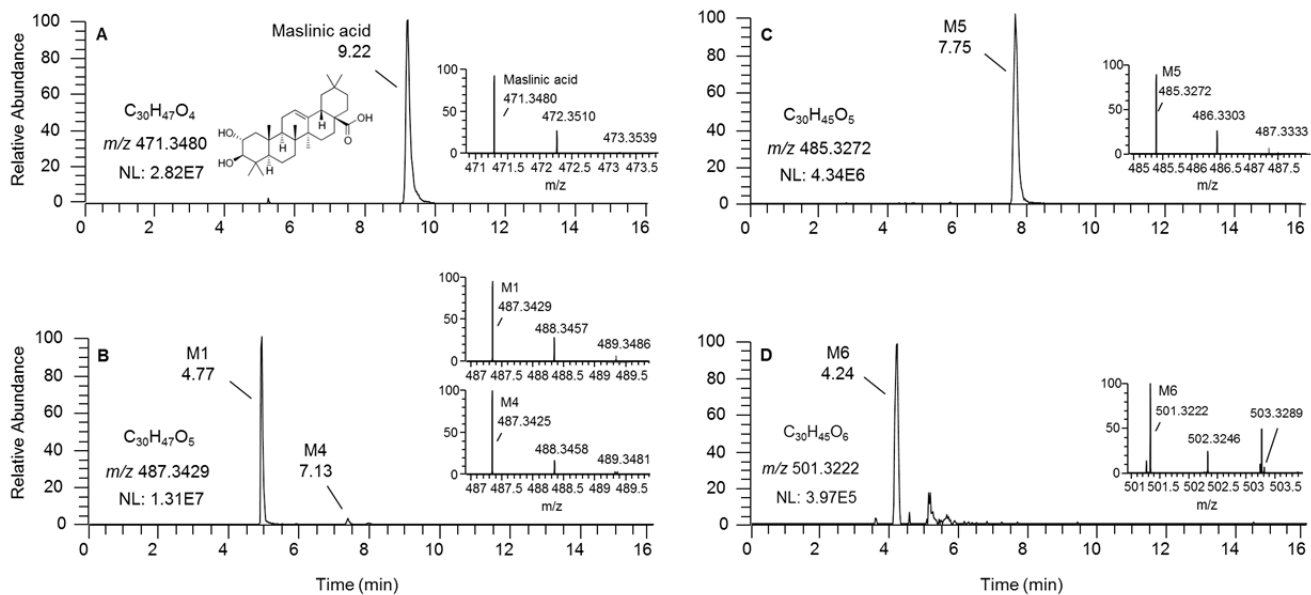
Theoretical concentration ( $\mu\text{M}$ )	Intra-day Precision (%) <sup>a</sup>		Inter-day Precision (%) <sup>a</sup>		Accuracy (%) <sup>a</sup>	
	Plasma	Urine	Plasma	Urine	Plasma	Urine
1	1.30	5.62	5.46	7.59	0.54	-4.36
	(n = 3)	(n = 3)	(n = 8)	(n = 12)	(n = 5)	(n = 8)
5	2.64	6.90	5.93	6.91	2.34	0.85
	(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)

<sup>a</sup>Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M.

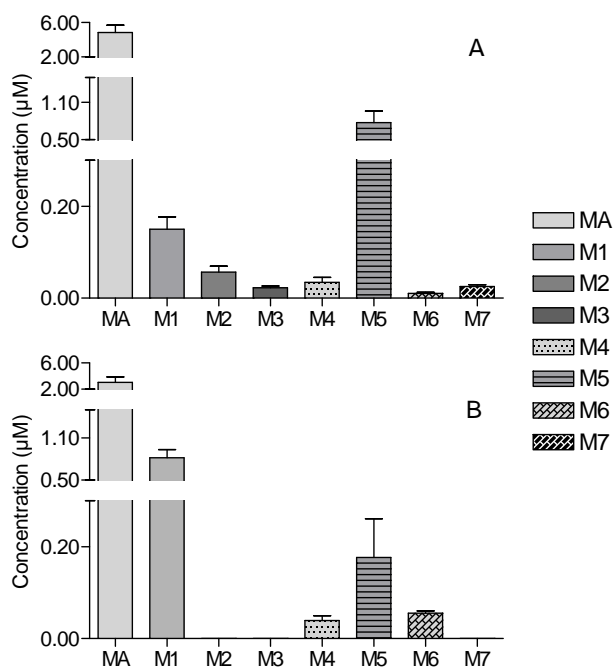
**Figure 1.**



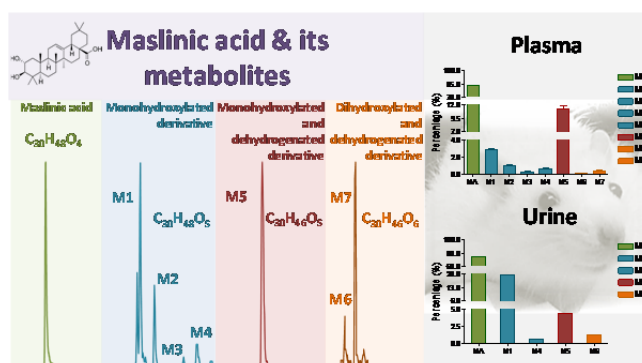
**Figure 2.**



**Figure 3.**



**GRAPHIC FOR TABLE OF CONTENT**





**ANNEX III**

**Article derivat de l'estada de recerca**





Article derivat de l'estada de recerca:

Durmus, S.; **Lozano-Mena, G.**; van Esch, A.; Wagenaar, E.; van Tellingen, O.; Schinkel, A.H. Preclinical mouse models to study human OATP1B1- and OATP1B3-mediated drug-drug interactions *in vivo*. En preparació



## **Preclinical mouse models to study human OATP1B1- and OATP1B3-mediated drug-drug interactions in vivo**

**Authors:** Selvi Durmus<sup>1</sup>, Glòria Lozano-Mena<sup>1,2</sup>, Anita van Esch<sup>1</sup>, Els Wagenaar<sup>1</sup>, Olaf van Tellingen<sup>3</sup>, Alfred H. Schinkel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Molecular Oncology, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, the Netherlands,

<sup>2</sup>Department of Physiology and Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA-UB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Department of Clinical Chemistry, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, the Netherlands

### **Corresponding author:**

Dr. Alfred H. Schinkel,

The Netherlands Cancer Institute,

Division of Molecular Oncology,

Plesmanlaan 121, 1066 CX

Amsterdam, The Netherlands,

E-mail: [a.schinkel@nki.nl](mailto:a.schinkel@nki.nl),

Phone: +31 20 5122046, Fax: +31 20 669 1383

**Article category:** Research article

**Short title:** Human OATP1B-mediated drug-drug interactions

**Keywords:** drug-drug interactions, OATP, hepatic uptake, methotrexate, rifampicin, telmisartan

### **Novelty & Impact Statements: (131/75 words)**

We show that humanized OATP1B transgenic mice can be used as reliable preclinical models to predict DDIs. Using these models, here we demonstrated that rifampicin and methotrexate interact at the level of hepatic OATPs, leading to increased plasma and decreased liver levels of MTX at clinically relevant concentrations, whereas telmisartan and MTX do not show an obvious risk of clinical interactions mediated by OATPs. DDIs may lead to toxicity or altered therapeutic efficacy of at least one of the coadministered drugs. Extra caution should be taken for patients with polymorphic variants of OATP transporters, as they might be more susceptible to clinical outcomes of the DDIs. Therefore, proper preclinical models are highly relevant for clinical DDI predictions, since such predictions are currently largely based on in vitro and in silico models.

**Abbreviations:** OATP; Organic anion-transporting polypeptide, *SLCO/Slco*; Organic anion-transporting polypeptide encoding gene name, WT; wild-type, HEK; human embryonic kidney, IC50; the half maximal inhibitory concentration required for inhibiting biological or biochemical function

Number of words in

Novelty & Impact Statements:131

Abstract: 247

Body of text: 7366

Number of figures: 7

Number of tables: 0

Number of references: 37

## Abstract

The impact of OATP drug uptake transporters in drug-drug interactions (DDIs) is increasingly recognized, especially during new drug discovery. OATP1B1 and -1B3 are human hepatic uptake transporters that can mediate liver uptake of a wide variety of drugs. Recently, transgenic mice with liver-specific expression of human OATP1B1/1B3 were generated in a knockout background for the mouse *Oatp1a/1b* transporters. Here, we investigated the applicability of these transgenic mice for studying DDIs mediated by human OATP1B1 or -1B3 using the prototypic OATP inhibitor rifampicin and a good OATP substrate, methotrexate (MTX). We next assessed the possibility of OATP-mediated interactions between telmisartan and MTX, a clinically relevant drug combination. Using HEK293 cells overexpressing OATP1B1,-1B3 or -1A2, we demonstrated that both rifampicin and telmisartan can inhibit OATP-mediated MTX uptake at low IC50 concentrations (1 - 11  $\mu$ M) in vitro. Using WT, *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup> and OATP1B1 or -1B3 transgenic mice, we showed that rifampicin inhibits hepatic uptake of MTX mediated by the mouse *Oatp1a/1b* and human OATP1B1 and -1B3 transporters, at clinically effective concentrations, highlighting the applicability of these mouse models in DDI studies. Next, we demonstrated that telmisartan was a weak inhibitor of OATP1B1-mediated and not an inhibitor of mouse *Oatp1a/1b* or human OATP1B3-mediated hepatic uptake of MTX at concentrations higher than those used in the clinic; therefore risks for OATP-mediated clinical DDIs for this combination are low at best. Overall, we show here that OATP1B1/1B3 humanized mice can be used as proper in vivo tools to assess and predict clinical DDIs.

## Introduction

Organic anion-transporting polypeptides (OATP/*Oatp*) are sodium-independent transmembrane uptake transporters that are encoded by *SLCO/Slco* genes. OATPs are expressed in several organs including liver, kidney and small intestine where they mediate the tissue uptake of substrate compounds<sup>1</sup>. The pharmacological importance of OATPs is increasingly recognized as more and more studies show that OATPs are important players in disposition of a wide range of drugs including statins, cardiac glycosides, antibiotics, and chemotherapeutics<sup>2</sup>. OATP1B1 and -1B3 are selectively expressed in the sinusoidal membrane of hepatocytes where they have key roles in hepatic uptake and/or plasma clearance of many drugs with a broad range of structures such as methotrexate (MTX), paclitaxel, docetaxel, pravastatin, fexofenadine and doxorubicin<sup>3-7</sup>. Therefore, alterations in the OATP1B activity or drug-drug interactions (DDIs) mediated by inhibition of OATP1B transporters might have important clinical consequences for the pharmacokinetics, efficacy and toxicity of these therapeutics<sup>2,8-10</sup>. For example, genetic variants of OATP1B1 showed significant changes in the disposition and toxicity of pravastatin, valsartan, MTX and SN-38<sup>9,11,12</sup>. Deficiency of OATP1B1 and -1B3 has been shown to result in the disruption of the hepatic re-uptake and consequently increased plasma levels of conjugated bilirubin, causing a syndrome called Rotor-type hyperbilirubinemia<sup>13</sup>.

Our knowledge of the involvement of the OATPs in DDIs is limited, but growing rapidly and the clinical importance of such interactions is becoming more and more evident<sup>14</sup>. FDA and EMA strongly recommend investigation of DDIs mediated by OATP1B1 and -1B3

for new molecular entities (NMEs) during drug development since 2012<sup>15</sup>. Recently, Shitara et al<sup>2</sup> reported examples of DDIs that are caused by inhibition of OATP1B transporters via potent inhibitors, and which affected the pharmacokinetics of victim drugs. The inhibitor drugs tested were antibiotics, antiviral drugs and the immunosuppressant cyclosporin A, and victim drugs were widely used statins, antidiabetic and hypertension drugs. Among the inhibitors, cyclosporin A and rifampicin appeared to be particularly strong inhibitors of OATP1B1 which caused increases in the plasma levels of several statins of 2.2- to 23-fold as a result of DDIs<sup>2</sup>. There are only few recent studies on OATP-mediated DDIs with anticancer drugs, although these are widely used and often substrates of OATPs. Hu et al<sup>16</sup> recently published a study which investigated whether inhibition of OATP1B1 by tyrosine kinase inhibitors could explain a decreased docetaxel clearance. Sorafenib was selected as a potent inhibitor of OATP1B1 based on the in vitro assays, however single or multiple dose of sorafenib did not affect docetaxel plasma levels in vivo using *Oatp1b2* knockout and hOATP1B1-expressing transgenic mice<sup>16</sup>. Another recent study by Nieuweboer et al<sup>17</sup> showed that use of polysorbate 80 or Kolliphor (Cremophor) EL in the drug formulation can inhibit OATP1B2-mediated hepatic elimination of paclitaxel. Clearly, DDI studies involving interactions between widely used medicines and anticancer drugs are urgently needed, as such interactions may lead to unexpected toxicities and changed efficacy in the treatment of cancers, and anticancer drugs are usually administered at high dosages and have a narrow therapeutic window. The antifolate MTX is a widely used anticancer and anti-rheumatic drug that is a transported substrate of mouse *Oatp1a/1b* and human OATP1B1 and -1B3 transporters in vivo<sup>7</sup>. The

likelihood of undesired DDIs and thus altered pharmacokinetics of MTX might be substantial, when prescribed with other commonly used drugs such as antibiotics, hypertension drugs and antidiabetics that are inhibitors/substrates of OATPs. Thus, MTX is of great interest for assessment of such interactions and prediction of clinical outcomes.

In order to predict clinical drug–drug interactions, many studies utilize *in vitro* cellular uptake assays and *in silico*<sup>18-22</sup> and preclinical models<sup>2,23</sup>. However, it remains challenging to translate *in vitro* data to the human *in vivo* situation and use of preclinical wild-type and knockout animal models does not necessarily result in optimal prediction due to species differences<sup>24,25</sup>. Accordingly, we have generated humanized mouse models with liver-specific expression of OATP1B1 or -1B3<sup>7</sup>. In this study, we wanted to assess whether these transgenic mouse models could be used as a tool to assess human OATP1B1 and -1B3-mediated DDIs *in vivo*. For this aim, we used the antibiotic rifampicin as a model inhibitor of OATP1B transporters and MTX as a victim drug. Secondly, we tested OATP1B-mediated DDIs between the antihypertensive drug telmisartan and MTX which has a higher chance for co-prescription in the clinic.

## Materials and Methods

### Chemicals

Methotrexate (100 mg/ml, Pharmachemie, the Netherlands) and cyclosporin A (50 mg/ml, Novartis, Switzerland) were obtained as parenteral formulations from the pharmacy department of the Slotervaart Hospital, the Netherlands. Rifampicin was purchased from Sigma-Aldrich (USA) and telmisartan was purchased from Sequoia Research Chemicals (UK), both in powder forms. 7-OH-MTX, rifampicin-d3 and telmisartan-d7 were purchased from Toronto Research Chemicals (Canada). All of the chemicals used for HPLC and HPLC-MS analysis were from Sigma-Aldrich (USA) or Merck, Germany.

### Drug solutions

#### *In vitro* experiments

MTX stock solution (100 mg/ml = 220.1 mM) and cyclosporin A (CsA, 50 mg/ml = 41.6 mM) were diluted in Krebs-Henseleit buffer to yield 50 μM MTX and 0.5 μM CsA solution, respectively. Rifampicin (50 mM) and telmisartan (10 mM) were prepared in DMSO and dimethyl formamide, respectively, and were further diluted in Krebs-Henseleit buffer to yield the desired concentrations.

#### *In vivo* experiments:

MTX stock solution (100 mg/ml) was diluted 50 or 250-fold with 0.9% NaCl to yield a concentration of 2 or 0.4 mg/ml. Rifampicin was dissolved in DMSO (at 80 mg/ml) and further diluted in 0.9% NaCl to yield a concentration of 4 mg/ml. Telmisartan was dissolved in dimethyl formamide (DMF, 7 mg/ml, maximum solubility) and further diluted in PBS to yield a concentration of 1.4 mg/ml. All drugs were administered intravenously, using a volume of 5 μl/g body weight. All working solutions were prepared on the day of experiment.

### Cell culture

HEK293 cells transduced with vector control, hSLCO1A2, hSLCO1B1 and hSLCO1B3 cDNAs were a kind gift from Prof. Werner Siegmund and Dr. Markus Keiser, (University of Greifswald, Greifswald, Germany)<sup>26</sup>. All cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma), 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin and 0.25 μg/ml amphotericin B at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity.

### Cellular uptake experiments

Cellular uptake experiments were performed according to previously described methods<sup>3,27</sup> and modified as required. Krebs-Henseleit buffer at pH 7.4, which was adjusted before the experiment was started, was used in all the steps of the experiment including dilutions of the drug stock solutions. Briefly, cells were preincubated with 1 ml pre-warmed buffer for 15 min at 37°C. Uptake experiments were started by aspirating the preincubation buffer and adding 600 μl of pre-warmed buffer containing (inhibitor) drugs; MTX (50 μM) alone or together with rifampicin (0, 1, 2.5, 5, 15, 25, 50 or 100 μM) or telmisartan (0, 1, 2.5, 5, 25, 50 or 100 μM) or CsA (0.5 μM). CsA was used as a positive control for the uptake inhibition; therefore it was also added in the pre-incubation buffer as an OATP inhibitor. At designated time points (2.5, 5, 10, 15, 30, 60 or 120 min) experiments were terminated by removing the incubation buffer and immediately adding 1 ml ice-cold buffer. After twice washing with ice-cold buffer, cells were lysed with 150 μl of 0.2 N NaOH for a minimum of 15 min. 10 μl of the cell lysate was used to determine the cellular protein amount by the Bradford method using bovine serum albumin as a standard. 60 μl of the cell lysates were used to determine MTX levels by HPLC.

### Animals

Mice were housed and handled according to institutional guidelines complying with Dutch legislation. Male WT, *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>, *Oatp1a*

/1b-/-;1B1tg and Oatp1a /1b-/-;1B3tg with liver-specific expression of human SLCO genes, all of a >99% FVB genetic background, were used between 8 and 14 weeks of age. Animals were kept in a temperature-controlled environment with a 12 hr light/12 hr dark cycle and received a standard diet (AM-II, Hope Farms) and acidified water ad libitum.

### Plasma and liver pharmacokinetic experiments

Dosages of MTX were 10 and 2 mg/kg body weight, that of rifampicin was 20 mg/kg and that of telmisartan was 7 mg/kg body weight. Rifampicin, telmisartan or vehicles (0.9% NaCl or PBS) were injected into the tail vein of mice 3 minutes before MTX administration. For all experiments, mice were sacrificed at 5 or 15 min after MTX administration by terminal bleeding through cardiac puncture under isoflurane anesthesia and organs were rapidly removed. Plasma was isolated from blood samples after centrifugation at 2,100 g for 6 min at 4°C, livers were homogenized in 1% bovine serum albumin and all the samples were stored at -30°C until analysis.

After drug analysis, results were presented as concentrations in the organs (nmol/g), % of the total dose (dose corrected for the body weight of each individual mouse being equivalent to 100%) and/or organ-to-plasma ratios. Organ-to-plasma ratios were calculated by dividing organ concentration expressed as nmol/g by plasma concentration expressed as nmol/ml, assuming 1 ml of plasma is roughly equivalent to 1 g of tissue.

### Drug Analyses

#### *Determination of MTX and 7-OH-MTX*

Levels of MTX and 7OH-MTX in plasma and liver homogenates were determined by HPLC with an attached UV detector as described previously<sup>28</sup>. For the in vitro experiments, cell lysates in 0.2 N NaOH were pretreated with 1.5 M HClO<sub>4</sub> in a ratio of 1:1.6 v/v. After vortexing 5 s and centrifugation at 16,873 g for 5 min at 4°C, supernatants were injected into the HPLC system directly. Standard curve (4,4 – 2201 nM) and quality control (22.01, 220.1 and 2201 nM) samples were prepared using blank cell lysates as matrix.

#### *Sample pre-treatment for rifampicin and telmisartan*

Plasma and liver homogenates were thawed at room temperature and diluted 1:50 or 1:100 (for rifampicin or telmisartan determinations, respectively) in blank human plasma. A volume of 100 µl of plasma or liver homogenate was pipetted into 2 ml polypropylene vials (Eppendorf, Hamburg, Germany). Next, volumes of 50

µl of IS working solution (rifampicin-d3 or telmisartan-d3; 1 µg/ml in acetonitrile:water 30:70; v/v) and 1000 µl of ethyl acetate were added. After automatic shaking for 15 min at 480 rpm, the samples were centrifuged for 1 min at 14,000 rpm (20,000g). The aqueous layer was frozen in dry ice/ethanol and the upper organic layer was decanted into a 1.5 ml vial (Brand, Wertheim, Germany). The solvent was evaporated to dryness in Speed-Vac SC210A (Savant, Farmingdale, Ny, USA) and the residue was reconstituted with 100 µl of acetonitrile:water (30:70, v/v) by sonicating for 5 min and vortex-mixing for 5 s. Finally, samples were centrifuged for 5 min at 14,000 rpm (20,000 g) prior to analysis.

#### *Instrumentation for rifampicin and telmisartan*

The levels of rifampicin and telmisartan in plasma and liver homogenates were quantified by means of HPLC coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS).

The chromatographic system included a solvent rack with in-line degasser (SRD-3600, Dionex, Sunnyvale, CA, USA), a dual low-pressure gradient pump (DGP-3600A, Dionex) and an autosampler with refrigerated plate (WPS-3000TSL, Dionex). The instrument was coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (API3000 MS/MS, ABSciex, Framingham, MA, USA) equipped with an electrospray ionization source (ABSciex). Data acquisition and analysis were performed using the Analyst v1.5.1 software package (ABSciex).

For both drugs, chromatographic separations were carried out using a stainless steel analytical Zorbax Extend C-18 column (2.1 x 100 mm) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) at ambient temperature. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water (A) and methanol (B) and was delivered at a flow rate of 0.2 ml/min in gradient elution. For rifampicin, the gradient was: 0-3 min 30-95% B; 3-5 min 95% B; 5-5.2 min 95-30% B; 5.2-13 min 30% B. For telmisartan, the gradient was: 0-2 min 40-95% B; 2-4 min 95% B; 4-4.2 min 95-40% B; 5.2-13 min 40% B. The sample compartment of the autosampler was maintained at 10°C and the injection volumes were 50 µl and 10 µl for rifampicin and telmisartan, respectively.

Mass spectrometric analyses of both rifampicin and telmisartan were performed in positive ion mode with ionization voltage set at 5500 V and a temperature of 300°C. Nebulizer gas and curtain gas (both nitrogen) were delivered at 12 and 8 L/min, respectively. Other ESI-MS/MS operating parameters were optimized for each drug. Declustering potential (DP), focusing potential (FP), entrance potential (EP), collision energy

(CE) and collision cell exit potential (CXP) were 50 V, 200 V, 10 V, 35 V and 16 V, respectively, for rifampicin, and 60 V, 190 V, 10 V, 47 V and 16 V for telmisartan. For quantification, the multiple reaction monitoring (MRM) mode was used and the following transitions were monitored: 823.7 → 399.2 for rifampicin, 826.7 → 402.3 for rifampicin-d3 (I.S.); 515.4 → 497.4 for telmisartan, 519.4 → 501.4 for telmisartan-d3 (I.S.).

### Quantification

The concentrations of rifampicin and telmisartan in plasma and liver homogenates was determined by means of the internal standard (I.S.) method, employing the corresponding stable isotope labeled drugs (rifampicin-d3 and telmisartan-d3).

Stock solutions of rifampicin and telmisartan 10 mM were prepared in DMSO and stored at -20°C. For each analytical run, these solutions were diluted in DMSO to obtain working solutions ranging from 100 nM to 100 μM for the preparation of the above-mentioned calibration standards. A set of calibration standards in either blank plasma or liver homogenate was prepared using 100- fold dilution of the DMSO stock in blank biological matrix. Final calibration samples contained 1, 3, 10, 30, 100, 300 and 1000 nM.

### Statistical analysis

IC<sub>50</sub> values for rifampicin and telmisartan for inhibition of MTX uptake were determined using non-linear regression (curve fit) analysis in GraphPad Prism 6.01 software. The 2-sided Student's t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc tests employing Tukey's corrections were used to determine statistical significance either between two or multiple groups, respectively. Results were presented as the mean ± standard deviation (SD). Differences were considered to be statistically significant when  $p \leq 0.05$ .

## Results

### In vitro MTX uptake by OATP1A/1B transporters

In order to establish time-dependent uptake of MTX by OATP1A/1B transporters, we performed cellular uptake experiments with MTX (50 μM) using control and OATP1B1, -1B3 or -1A2-expressing HEK293 cells for various time periods between 2.5 and 120 min. The uptake of MTX by all three OATPs was significantly greater than that in control cells at all time points and remained linear until 30 min (Figure 1A-C). After 30 min, MTX uptake by all three OATPs appeared saturated to various degrees. Uptake in HEK-OATP1A2 cells was high, and that in HEK-OATP1B1 cells was intermediate. Despite low MTX uptake in

OATP1B3-expressing cells (< LLQ for control cells up to 15 min and for OATP1B3 cells at 2.5 min) which also correlated with a somewhat erratic uptake linearity, there was a clear difference between these cells and controls (Figure 1B). To stay in the linear phase of MTX uptake, 15 min time points were chosen for the subsequent inhibition studies. Furthermore, the uptake of MTX in all OATP-expressing cells could be inhibited completely by 0.5 μM CsA, an OATP inhibitor, at 15 min (Figure 1D), further supporting the conclusion that MTX uptake in these cells was OATP-mediated.

### Effect of rifampicin on OATP-mediated MTX uptake in vitro

To determine whether OATP-mediated MTX uptake could be inhibited by the OATP inhibitor rifampicin, we determined the IC<sub>50</sub> of rifampicin for each OATP-expressing cell type using a concentration range between 1 to 100 μM. As indicated in Figure 2, IC<sub>50</sub> concentrations of rifampicin were 0.9, 1.1 and 6.1 μM for OATP1B1, -1B3 and -1A2-mediated MTX uptake, respectively. These IC<sub>50</sub> levels suggest that rifampicin is a fairly strong inhibitor of MTX uptake mediated by these three OATPs (strong = μM range).

### Effect of rifampicin on OATP-mediated MTX and 7-OH-MTX disposition in vivo

In order to investigate whether rifampicin can also inhibit OATP-mediated MTX transport in vivo, we administered 20 mg/kg rifampicin or vehicle (i.v.) 3 min before 10 mg/kg MTX dosing (i.v.) to WT, *Oatp1a/1b* knockout mice as well as to transgenic mice with liver-specific expression of OATP1B1 and -1B3 in view of their physiological relevance to human drug disposition.

In groups receiving vehicle, MTX disposition results were similar to those described previously by van de Steeg et al <sup>7</sup>. Plasma MTX levels were increased in *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>, *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;*1B1*tg and *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;*1B3*tg mice compared to WT strains both at 5 and 15 min after MTX administration (Figure 3A and B). Liver levels of MTX and liver-to-plasma ratios were profoundly decreased by removal of the *Oatp1a/1b* transporters, and expression of human OATP1B1 or -1B3 in these livers led to substantial, albeit not complete, rescue of the impaired liver uptake of MTX (Figure 3), showing that MTX hepatic uptake is primarily mediated by OATPs.

In rifampicin-treated groups, plasma levels of MTX were significantly increased by 4.2-, 1.5- and 1.9-fold in WT, *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup> and *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;*1B3*tg mice 5 min after MTX administration, whereas no increase was observed in plasma of *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;*1B1*tg mice



(Figure 3A). Of note, the increased plasma MTX levels in WT mice after rifampicin pretreatment reached the same levels as in vehicle-treated *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup> mice, and those in *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;1B3tg mice reached the same levels as rifampicin-treated *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup> mice, suggesting strong inhibition of OATP-mediated MTX uptake by rifampicin. Accordingly, rifampicin treatment led to significant decreases in liver MTX levels in all strains except the *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup> mice (Figure 3C and Supplementary Figure 1A). When corrected for plasma levels, substantial decreases were observed in liver-to-plasma ratios after rifampicin treatment. Although not reaching the level of knockout mice, WT mice showed a highly significant decrease by 8-fold ( $P < 0.001$ , Figure 3E), suggesting a very strong inhibition of *Oatp1a/1b*-mediated hepatic uptake of MTX in this strain. Liver-to-plasma ratios of MTX in *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;1B1tg and *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;1B3tg mice were also decreased by 3.5- and 11.4-fold, respectively, and more or less back to the levels in knockout mice (Figure 3E). Furthermore, *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup> mice did not show any difference in liver-to-plasma ratios of MTX upon rifampicin treatment, indicating that the hepatic uptake of MTX that was inhibited by rifampicin was OATP-specific.

In order to assess whether the rifampicin effect also applied at a later time point, we also tested the disposition of MTX at 15 min. The disposition of MTX followed more or less the same trend as observed at 5 min, yet the plasma, but not the liver levels of MTX were overall reduced due to distribution and clearance kinetics. Briefly, plasma levels of MTX were increased in WT (4.7-fold,  $P < 0.01$ ) and *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;1B3tg (2.2-fold,  $P < 0.05$ ) mice by rifampicin treatment but not in *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup> and *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;1B1tg mice (Figure 3B). Decreases in liver MTX levels were significant in *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;1B1tg (~3.5-fold,  $P < 0.01$ ) and *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;1B3tg (~7.6-fold,  $P < 0.01$ ) mice (Figure 3D and Supplementary Figure 1B). Liver-to-plasma ratios clearly showed that hepatic uptake of MTX was decreased highly in WT mice (5.8-fold,  $P < 0.001$ ), substantially in *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;1B1tg (3.7-fold,  $P < 0.01$ ) and profoundly in *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;1B3tg mice (17.9-fold,  $P < 0.001$ ), but not in *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup> mice (Figure 3F). Overall, these results suggest that rifampicin can inhibit hepatic uptake of MTX mediated by mouse *Oatp1a/1b* transporters to a great extent, and uptake mediated by transgenic human OATP1B1 or 1B3 completely.

In line with the MTX data, the liver levels of the active metabolite 7-OH-MTX were decreased in WT and both transgenic strains at 5 ( $P < 0.01$ ) and 15 min ( $P < 0.01$  for transgenic mice) upon rifampicin treatment; however levels in *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup> mice did not change (Supplementary Figure 2). This is likely to reflect the hepatic availability of MTX, and is not due to changes

in the expression levels of aldehyde oxidases (AOX), the enzymes required for conversion of MTX to 7-OH-MTX, since we previously showed that expression of *Aox1* and 2 were similar between all the strains<sup>13</sup>. These findings further support the conclusion that rifampicin inhibits the hepatic uptake of MTX mediated by OATPs, and that lower levels of the parent MTX molecule lead to reduction in the hepatic metabolism and thus lower formation of 7-OH-MTX.

### Plasma and liver levels of rifampicin

In order to assess whether the disposition of rifampicin itself was noticeably affected by OATPs in vivo, we measured the levels in plasma and liver. Albeit not always significantly, rifampicin levels were increased in plasma and were decreased in liver of *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>, *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;1B1tg and *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;1B3tg strains compared to WT mice at both 5 and 15 min (Figure 4A). The changes in plasma and liver MTX levels were similar between knockout and transgenic strains with the exception that liver levels in *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;1B3tg mice were significantly higher than those in *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;1B1tg mice (Figure 4B and D). Liver-to-plasma ratios showed significant decreases in all the strains relative to WT mice, but there were no differences between *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup> and *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;1B1tg or *Oatp1a/1b*<sup>-/-</sup>;1B3tg mice (Figure 4C). These results suggest that rifampicin can be substantially transported by mouse *Oatp1a/1b* transporters, but not by human OATP1B1 or -1B3 in vivo. The very limited differences in plasma concentration of rifampicin between the strains make it unlikely that this substantially affected the DDI experiments.

### Effect of telmisartan on OATP-mediated MTX uptake in vitro

Next, we assessed whether OATP-mediated MTX uptake (50  $\mu$ M) could be inhibited by telmisartan in vitro. We used a concentration range of telmisartan between 1 to 100  $\mu$ M for each OATP-expressing cell type and calculated its IC<sub>50</sub> values for MTX uptake. IC<sub>50</sub> concentrations of telmisartan were 6.8, 11.1 and 2.8  $\mu$ M for OATP1B1, -1B3 and -1A2-mediated MTX uptake, respectively. These IC<sub>50</sub> values were about 10-fold higher than what we have found for rifampicin for OATP1B1 and 1B3, but lower for OATP1A2. This suggests that telmisartan is a less strong inhibitor for MTX uptake mediated by the tested human OATPs occurring in the sinusoidal membrane of the human liver.

### Effect of telmisartan on OATP-mediated MTX disposition in vivo

We initially assessed the inhibition efficacy of telmisartan on OATP-mediated MTX transport in vivo

by predosing WT, Oatp1a/1b<sup>-/-</sup>, Oatp1a/1b<sup>-/-</sup>;1B1tg and Oatp1a/1b<sup>-/-</sup>;1B3tg mice with 7 mg/kg telmisartan or vehicle (i.v.) 3 min before 10 mg/kg MTX (i.v.) administration. 7 mg/kg telmisartan was chosen as it was the highest practically feasible dose. Higher doses were prohibited by formulation problems.

In telmisartan-treated groups, plasma levels of MTX were slightly, but significantly increased by 1.4-fold in WT and 1.3-fold in Oatp1a/1b<sup>-/-</sup> or Oatp1a/1b<sup>-/-</sup>;1B3tg mice 15 min after 10 mg/kg MTX administration (Figure 6B). MTX levels in liver were slightly increased in WT by 1.2- ( $P < 0.05$ ) and in Oatp1a/1b<sup>-/-</sup> mice by 1.1-fold ( $P < 0.01$ ), whereas this was decreased in Oatp1a/1b<sup>-/-</sup>;1B1tg mice by 1.5-fold ( $P < 0.01$ ) (Figure 6D and Supplementary Figure 3B). Liver-to-plasma ratios were decreased in Oatp1a/1b<sup>-/-</sup> mice by 1.2-fold ( $P < 0.05$ ) but in Oatp1a/1b<sup>-/-</sup>;1B1tg mice by 1.9-fold ( $P < 0.001$ ) (Figure 6F), whereas they remained unchanged in WT and Oatp1a/1b<sup>-/-</sup>;1B3tg mice. These results suggest that the inhibitory effect of telmisartan at the plasma concentrations achieved on hepatic uptake of MTX mediated by OATPs is negligible, except for the human OATP1B1. Telmisartan does not seem to inhibit mouse Oatp1a/1b-mediated MTX transport into the liver at this plasma drug concentrations. Furthermore, a slight, but significant decrease in hepatic uptake of MTX in Oatp1a/1b<sup>-/-</sup> mice suggests a contribution of other factor(s) mediating hepatic uptake of MTX, albeit very minor, which can be inhibited by telmisartan.

In order to assess how the achieved in vivo telmisartan levels related to the in vitro IC<sub>50</sub> values, we determined telmisartan concentrations in plasma and liver. We observed that plasma telmisartan levels were often below 10  $\mu$ M in all strains, i.e. comparable to or below the IC<sub>50</sub> concentrations (Figure 7B). As this could be a reason for the low inhibition efficacy of telmisartan for OATP-mediated MTX transport and as increasing the telmisartan dose was not technically feasible, we performed a separate experiment to assess the plasma and liver levels at an earlier time point (5 min) after the same i.v. dose of telmisartan. We assumed that telmisartan plasma levels would be higher at this earlier time point. In order to reach higher plasma telmisartan, but similar MTX concentrations compared to the 15 min experiment, we lowered the MTX dose from 10 to 2 mg/kg. This experiment resulted in similar plasma concentrations of MTX in all strains, except for WT which showed a 1.4-fold increase ( $P < 0.05$ ) upon telmisartan treatment (Figure 6A). Significant differences were observed by telmisartan treatment in liver levels of each strain (Figure 6C and Supplementary Figure 3A). However, liver-to-plasma ratios of telmisartan-treated groups showed decreases compared to nontreated groups (Figure 6E). Liver-to-plasma ratios were decreased by

1.5-fold in WT ( $P < 0.05$ ) and Oatp1a/1b<sup>-/-</sup> ( $P < 0.01$ ) mice, and by 1.6-fold in Oatp1a/1b<sup>-/-</sup>;1B1tg ( $P < 0.001$ ) mice when predosed with telmisartan. In addition, liver concentrations of the active metabolite 7-OH-MTX were also decreased in telmisartan-treated Oatp1a/1b<sup>-/-</sup>;1B1tg mice at 15 min, probably reflecting reduced liver availability of MTX (Supplementary Figure 4). Altogether, these results suggest that hepatic uptake of MTX mediated by human OATP1B1 is partly inhibited by telmisartan, but this inhibition is not complete. Moreover, although minor, other transporters that can be inhibited by telmisartan may also contribute to hepatic uptake of MTX.

### Plasma and liver levels of telmisartan

In vivo assessment of telmisartan concentrations showed that plasma telmisartan levels remained similar between 5 and 15 min, suggesting very slow liver elimination of this drug. Moreover, there were no clear differences between the groups in plasma telmisartan levels at both time points, except for a 1.9-fold decrease ( $P < 0.05$ ) in Oatp1a/1b<sup>-/-</sup> mice compared to the WT strain at 15 min (Figure 7A and B). There were also no clear differences between all strains in either liver levels or liver-to-plasma ratios of telmisartan at 5 or 15 min (Figure 7 C-H). These findings suggest that telmisartan is not a substantially transported substrate of mouse Oatp1a/1b, or human OATP1B1 or OATP1B3 transporters in vivo.

### Discussion

In this study, we show that transgenic mice expressing human OATP1B1 or OATP1B3 can be useful tools to assess clinically relevant DDIs that are mediated by human OATPs. We assessed the potential of these mouse models using the prototypical OATP inhibitor rifampicin as a perpetrator drug and a very good OATP substrate, the anticancer drug MTX, as a victim drug. We showed that in vitro, rifampicin inhibited OATP1A2-, -1B1- and -1B3-mediated MTX uptake at low  $\mu$ M concentrations that are easily achievable in the clinic. In vivo, rifampicin showed strong inhibition efficacy for mouse Oatp1a/1b and human OATP1B-mediated hepatic uptake of MTX at clinically relevant plasma concentrations. These results suggest a possible clinical DDI risk when rifampicin and MTX are coadministered and therefore illustrated that humanized OATP1B1- and OATP1B3-transgenic mice can be a useful model to study DDI in vivo. In addition to the existing in vitro and in silico models, these mice may provide a reliable in vivo method to predict clinical DDIs.

Using the abovementioned models, we tested the possibility of DDIs between a commonly used antihypertensive drug telmisartan and the anticancer

drug MTX. In spite of fairly low IC<sub>50</sub> concentrations (< 11 μM) for OATP1B1, -1B3 and -1A2 in vitro, telmisartan was only a weak inhibitor of human OATP1B1-mediated hepatic uptake of MTX in vivo. Neither mouse Oatp1a/1b nor human OATP1B3-mediated MTX transport were noticeably inhibited by telmisartan. Moreover, telmisartan was not substantially transported by any of the tested OATPs in vivo; thus we think that its inhibition of MTX transport is due to inhibition of OATP1B1 activity, and not related to competition with MTX in the transport process.

The slight, but significant inhibition by telmisartan of hepatic uptake of MTX in Oatp1a/1b<sup>-/-</sup> mice suggests inhibition of another alternative transporter that can transport MTX into the liver. Of course, the very low hepatic levels of MTX in non-treated Oatp1a/1b<sup>-/-</sup> mice show that the contribution of this unknown transporter is small compared to that of the Oatp1a/1b transporters. A possible candidate for this alternative transporter is the reduced folate carrier, RCF-1 (gene name: *SLC19A*). RCF1 is known as a high capacity, bi-directional folate transporter, which can mediate transport of the antifolate drug MTX<sup>29,30</sup>. Furthermore, patients with a c.80AA polymorphism in their *SLC19A1* gene were associated with the occurrence of higher serum MTX concentrations<sup>31,32</sup>.

The discrepancy between our in vitro and in vivo findings on the inhibitory effect of telmisartan on MTX transport via OATPs may be explained by the modest plasma telmisartan concentrations achieved, and by the available free fraction of telmisartan. It is known that free concentrations of the perpetrator drug are an important factor in DDI in addition to the inhibition capacity and specificity of the perpetrator drug for the transporter. Availability of the free drug molecule is inversely related to its plasma protein binding capacity, meaning that high plasma protein binding results in low free drug concentration. As soon as the effective free drug concentration is lower than its K<sub>m</sub> or IC<sub>50</sub>, the risk of inhibition of transporter- or enzyme-mediated processes becomes small. The plasma protein binding capacity of telmisartan is known to be very high, ~99.5%<sup>33</sup>. With a simple estimation, free telmisartan levels in plasma of mice in our experiments were thus only ~0.5% of the in vitro IC<sub>50</sub> concentrations, explaining why there were no strong interactions observed. On the other hand, rifampicin, with ~80% plasma protein binding capacity<sup>34</sup>, shows comparable free drug concentrations in plasma of mice as the IC<sub>50</sub> levels found in vitro. Actually, it is surprising that we could still observe a mild interaction at the OATP1B1 level with the low free telmisartan concentrations, which were far below the IC<sub>50</sub> values.

Our findings may be a good basis for the clinic. For the rifampicin part of this study, our findings suggest a risk of DDI for rifampicin and MTX via OATP1B transporters at clinically administered dosages. The plasma rifampicin levels in all of the mice strains were in a similar range with previously reported serum levels in patients who are treated for tuberculosis<sup>35</sup>. In addition, the plasma levels of MTX in our mice were in the same range as seen in cancer patients receiving high-dose MTX intravenously<sup>36</sup>. These are of particular importance, as the interaction between rifampicin and MTX mediated by both mouse and human OATP1A/1B transporters that we found in this study strongly argues that this interaction may well happen in patients receiving both of these drugs concomitantly. It should be noted though that combined administration of rifampicin (for tuberculosis treatment) and high-dose MTX (for cancer treatment) will be rare. Interactions between rifampicin and MTX at the OATP level for the lower doses of MTX should be investigated for the risk of DDI in other groups of patients receiving lower doses of MTX.

On the other hand, the telmisartan part of our study suggests that combination treatment of telmisartan and MTX is likely to be safe in patients. In the clinic, hypertension patients receive a daily dose of 40 or 80 mg telmisartan and show effective plasma exposure of ~40 to 200 nM with high intersubject variability at a steady state level<sup>33</sup>. On the other hand, the concentration range that we achieved in mouse plasma (7 - 13 μM) was far higher than what is achieved in the serum levels in hypertension patients treated with telmisartan. Considering the lack of substantial interactions even at relatively high telmisartan concentrations in humanized mice, we think that the risk of DDI between telmisartan and MTX at the level of hepatic OATP1B transporters in patients are low. These results are positive for the clinic, as telmisartan and MTX is a clinically realistic combination for the treatment of cancer patients who are at the same time suffering from hypertension.

Variants in the *SLCO1B* genes are found in many people around the world<sup>37</sup>. As these patients have altered activity of their OATP proteins, they might be more sensitive to DDIs and show drug toxicities or altered efficacy due to altered pharmacokinetics such as disposition and clearance. Therefore, extra caution should be taken when two OATP substrate or inhibitor drugs are administered to patients with polymorphic OATPs.

In conclusion, this study demonstrates the usefulness of humanized mouse strains as proper preclinical models to predict clinical DDIs mediated by OATP1B transporters. Using these preclinical models, we demonstrated that rifampicin and MTX interact at the

level of hepatic OATPs, causing increased plasma and decreased liver levels of MTX at clinically relevant doses, whereas telmisartan and MTX do not show a visible risk of interaction involving OATPs at clinical dose levels.

#### Statement of conflict of interest:

The research group of A.H. Schinkel receives revenue from commercial distribution of some of the mouse strains used in this study. No other conflicts of interest are declared.

#### Acknowledgements

We thank Anita Kort and Stephanie van Hoppe for critical reading of this manuscript.

#### Reference List

1. Klaassen CD, Aleksunes LM. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev* 2010;**62**:1-96.
2. Shitara Y, Maeda K, Ikejiri K, Yoshida K, Horie T, Sugiyama Y. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in the hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharm Drug Dispos* 2012.
3. Durmus S, Naik J, Buil L, Wagenaar E, van TO, Schinkel AH. In vivo disposition of doxorubicin is affected by mouse Oatp1a/1b and human OATP1A/1B transporters. *Int J Cancer* 2014.
4. Iusuf D, Sparidans RW, van Esch A, Hobbs M, Kenworthy KE, van de Steeg E, Wagenaar E, Beijnen JH, Schinkel AH. Organic anion-transporting polypeptides 1a/1b control the hepatic uptake of pravastatin in mice. *Mol Pharm* 2012;**9**:2497-504.
5. Iusuf D, Hendriks JJ, van EA, van de Steeg E, Wagenaar E, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH. Human OATP1B1, OATP1B3 and OATP1A2 can mediate the in vivo uptake and clearance of docetaxel. *Int J Cancer* 2014.
6. van de Steeg E, Wagenaar E, van der Kruijssen CM, Burggraaff JE, de Waart DR, Elferink RP, Kenworthy KE, Schinkel AH. Organic anion transporting polypeptide 1a/1b-knockout mice provide insights into hepatic handling of bilirubin, bile acids, and drugs. *J Clin Invest* 2010;**120**:2942-52.
7. van de Steeg E, van Esch A, Wagenaar E, Kenworthy KE, Schinkel AH. Influence of human OATP1B1, OATP1B3, and OATP1A2 on the pharmacokinetics of methotrexate and paclitaxel in humanized transgenic mice. *Clin Cancer Res* 2013;**19**:821-32.
8. Ieiri I, Higuchi S, Sugiyama Y. Genetic polymorphisms of uptake (OATP1B1, 1B3) and efflux (MRP2, BCRP) transporters: implications for inter-individual differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of statins and other clinically relevant drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009;**5**:703-29.
9. Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol* 2009;**158**:693-705.
10. Yoshida K, Maeda K, Sugiyama Y. Transporter-mediated drug-drug interactions involving OATP substrates: predictions based on in vitro inhibition studies. *Clin Pharmacol Ther* 2012;**91**:1053-64.
11. Takane H, Kawamoto K, Sasaki T, Moriki K, Moriki K, Kitano H, Higuchi S, Otsubo K, Ieiri I. Life-threatening toxicities in a patient with UGT1A1\*6/\*28 and SLCO1B1\*15/\*15 genotypes after irinotecan-based chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;**63**:1165-9.
12. Trevino LR, Shimasaki N, Yang W, Panetta JC, Cheng C, Pei D, Chan D, Sparreboom A, Giacomini KM, Pui CH, Evans WE, Relling MV. Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J Clin Oncol* 2009;**27**:5972-8.
13. van de Steeg E, Stranecky V, Hartmannova H, Noskova L, Hrebicek M, Wagenaar E, van Esch A, de Waart DR, Oude Elferink RP, Kenworthy KE, Sticova E, al Edreesi M, et al. Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. *J Clin Invest* 2012;**122**:519-28.
14. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2010;**9**:215-36.
15. Prueksaritanont T, Chu X, Gibson C, Cui D, Yee KL, Ballard J, Cabalu T, Hochman J. Drug-drug interaction studies: regulatory guidance and an industry perspective. *AAPS J* 2013;**15**:629-45.
16. Hu S, Mathijssen RH, de BP, Baker SD, Sparreboom A. Inhibition of OATP1B1 by tyrosine kinase inhibitors: in vitro-in vivo correlations. *Br J Cancer* 2014;**110**:894-8.
17. Nieuweboer AJ, Hu S, Gui C, Hagenbuch B, Ghobadi Moghaddam-Helmantel IM, Gibson AA, de BP, Mathijssen RH, Sparreboom A. Influence of Drug Formulation on OATP1B-Mediated Transport of Paclitaxel. *Cancer Res* 2014;**74**:3137-45.
18. Hirano M, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y. Drug-drug interaction between pitavastatin and various

- drugs via OATP1B1. *Drug Metab Dispos* 2006;**34**:1229-36.
19. Karlgren M, Ahlin G, Bergstrom CA, Svensson R, Palm J, Artursson P. In vitro and in silico strategies to identify OATP1B1 inhibitors and predict clinical drug-drug interactions. *Pharm Res* 2012;**29**:411-26.
  20. Kindla J, Muller F, Mieth M, Fromm MF, Konig J. Influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1- and OATP1B3-mediated drug transport. *Drug Metab Dispos* 2011;**39**:1047-53.
  21. Noe J, Portmann R, Brun ME, Funk C. Substrate-dependent drug-drug interactions between gemfibrozil, fluvastatin and other organic anion-transporting peptide (OATP) substrates on OATP1B1, OATP2B1, and OATP1B3. *Drug Metab Dispos* 2007;**35**:1308-14.
  22. Yoshida K, Maeda K, Sugiyama Y. Transporter-mediated drug-drug interactions involving OATP substrates: predictions based on in vitro inhibition studies. *Clin Pharmacol Ther* 2012;**91**:1053-64.
  23. Chang JH, Ly J, Plise E, Zhang X, Messick K, Wright M, Cheong J. Differential Effects of Rifampin and Ketoconazole on the Blood and Liver Concentration of Atorvastatin in Wild-Type and Cyp3a and Oatp1a/b Knockout Mice. *Drug Metab Dispos* 2014;**42**:1067-73.
  24. Chu X, Bleasby K, Evers R. Species differences in drug transporters and implications for translating preclinical findings to humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012.
  25. Grime K, Paine SW. Species differences in biliary clearance and possible relevance of hepatic uptake and efflux transporters involvement. *Drug Metab Dispos* 2013;**41**:372-8.
  26. Peters J, Eggers K, Oswald S, Block W, Lutjohann D, Lammer M, Venner M, Siegmund W. Clarithromycin is absorbed by an intestinal uptake mechanism that is sensitive to major inhibition by rifampicin: results of a short-term drug interaction study in foals. *Drug Metab Dispos* 2012;**40**:522-8.
  27. Hirano M, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y. Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;**311**:139-46.
  28. van TO, van der Woude HR, Beijnen JH, van Beers CJ, Nooyen WJ. Stable and sensitive method for the simultaneous determination of N5-methyltetrahydrofolate, leucovorin, methotrexate and 7-hydroxymethotrexate in biological fluids. *J Chromatogr* 1989;**488**:379-88.
  29. Ganapathy V, Smith SB, Prasad PD. SLC19: the folate/thiamine transporter family. *Pflugers Arch* 2004;**447**:641-6.
  30. Zhao R, Diop-Bove N, Visentin M, Goldman ID. Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. *Annu Rev Nutr* 2011;**31**:177-201.
  31. Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Walsh M, Kremer J. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;**50**:2766-74.
  32. Laverdiere C, Chiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajinovic M. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;**100**:3832-4.
  33. Stangier J, Su CA, Roth W. Pharmacokinetics of orally and intravenously administered telmisartan in healthy young and elderly volunteers and in hypertensive patients. *J Int Med Res* 2000;**28**:149-67.
  34. Acocella G. Clinical pharmacokinetics of rifampicin. *Clin Pharmacokinet* 1978;**3**:108-27.
  35. van IJ, Aarnoutse RE, Donald PR, Diacon AH, Dawson R, Plemper van BG, Gillespie SH, Boeree MJ. Why Do We Use 600 mg of Rifampicin in Tuberculosis Treatment? *Clin Infect Dis* 2011;**52**:e194-e199.
  36. Holmboe L, Andersen AM, Morkrid L, Slordal L, Hall KS. High dose methotrexate chemotherapy: pharmacokinetics, folate and toxicity in osteosarcoma patients. *Br J Clin Pharmacol* 2012;**73**:106-14.
  37. Nakanishi T, Tamai I. Genetic polymorphisms of OATP transporters and their impact on intestinal absorption and hepatic disposition of drugs. *Drug Metab Pharmacokinet* 2012;**27**:106-21.

## Figure Legends

**Figure 1:** Time-dependent in vitro uptake of MTX by OATP1B1 (A), OATP1B3 (B) and OATP1A2 (C), and its inhibition by CsA (D). Uptake of 50  $\mu\text{M}$  MTX was measured between 2.5 to 120 min incubation using vector-transfected (control) or OATP1B1-, OATP1B3- or OATP1A2- overexpressing HEK293 cells. Inhibition of MTX uptake by 0.5  $\mu\text{M}$  Cyclosporin A (CsA), an OATP inhibitor, was assessed for 15 min. Data are given as mean  $\pm$  S.D. Student's t-test was applied to compare transporter expressing cells to controls. (n = 3, \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  when compared with HEK control cells).

**Figure 2:** Inhibition of OATP-mediated MTX uptake by rifampicin. Inhibition of 50  $\mu\text{M}$  MTX uptake by different concentrations of rifampicin (1 - 100  $\mu\text{M}$ ) was assessed at 15 min using OATP1B1 (A), OATP1B3 (B) or OATP1A2 (C) over expressing HEK293 cells. MTX uptake in OATP-expressing clones was not corrected for the background in the control cells. IC50 values were calculated from generated data using non-linear regression (curve fit) analysis. Data are given as mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

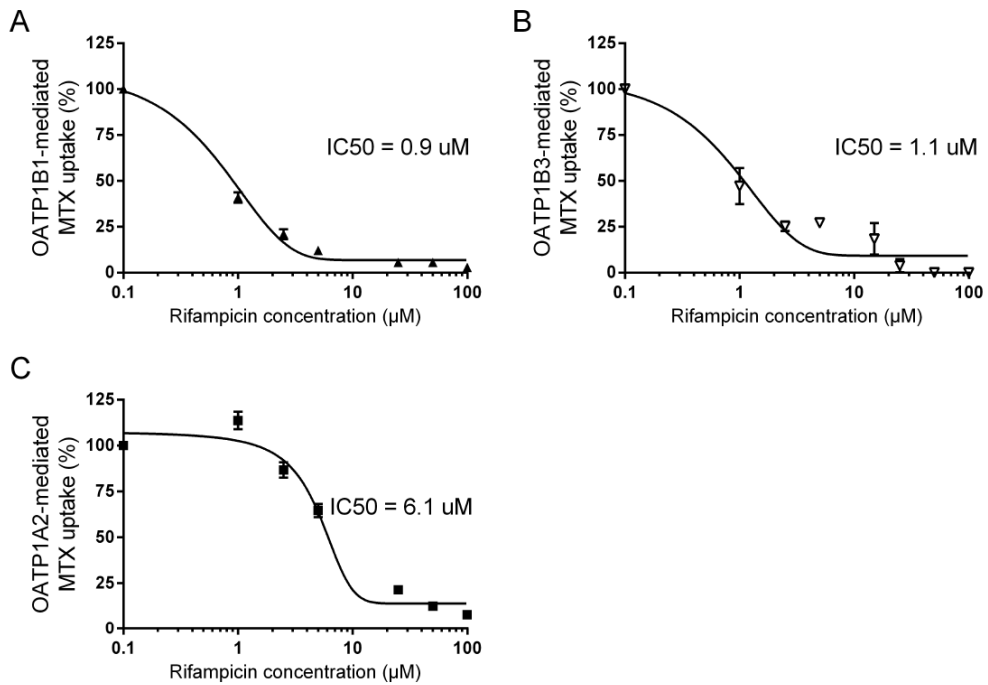
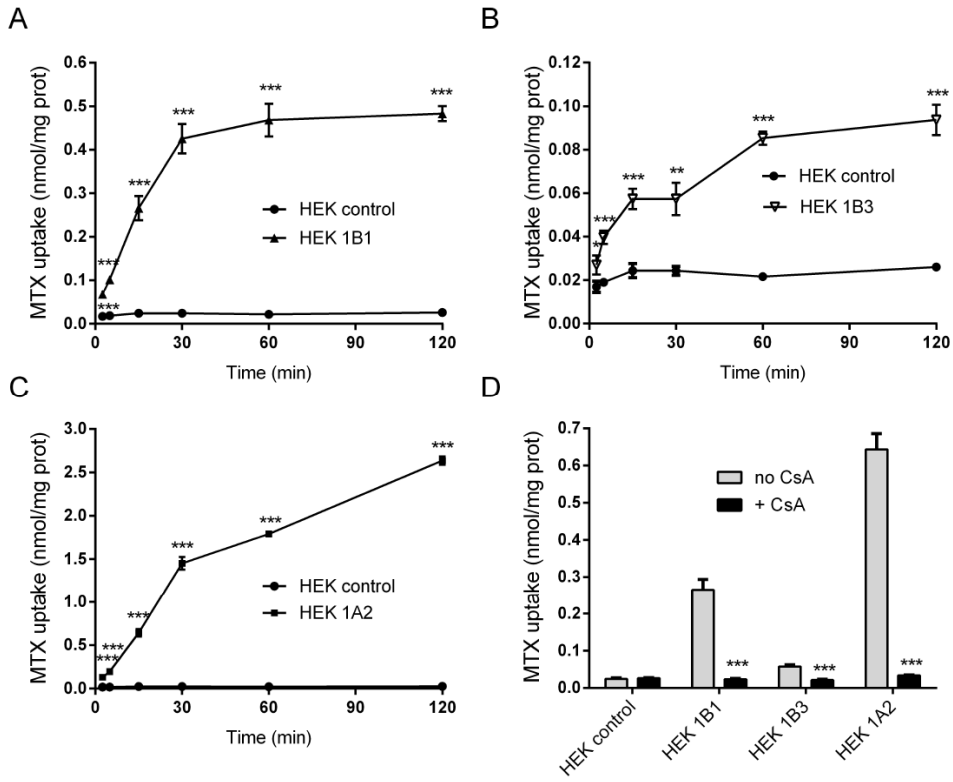
**Figure 3:** Effect of rifampicin on OATP-mediated MTX disposition in male WT, Oatp1a/1b<sup>-/-</sup> and OATP1B1-, and OATP1B3-humanized transgenic mice. MTX plasma concentrations in nmol/ml (A,B), liver concentrations in nmol/g (C,D) and liver-to-plasma ratios (E,F) 5 and 15 min after i.v. administration of 10 mg/kg MTX  $\pm$  20 mg/kg rifampicin are presented. Vehicle (0.9% NaCl) or rifampicin was administered i.v. 3 min before MTX dosing. Data are given as mean  $\pm$  S.D. Student's t-test was applied to compare rifampicin-treated with vehicle-treated groups. (n = 4 for 5 min and n = 3 - 5 for 15 min experiments, \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  when compared with vehicle treatment. #,  $P < 0.05$ ; ##,  $P < 0.01$ ; ###,  $P < 0.001$  when compared with vehicle-treated Oatp1a/1b<sup>-/-</sup> mice).

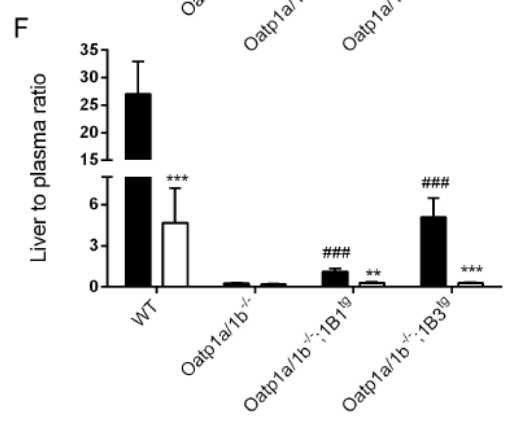
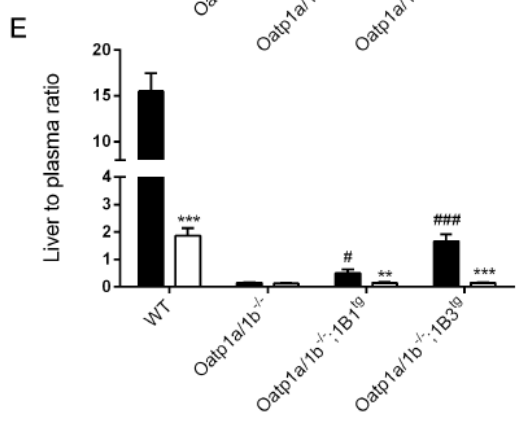
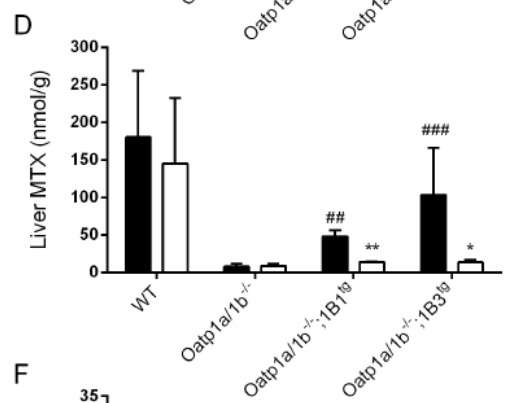
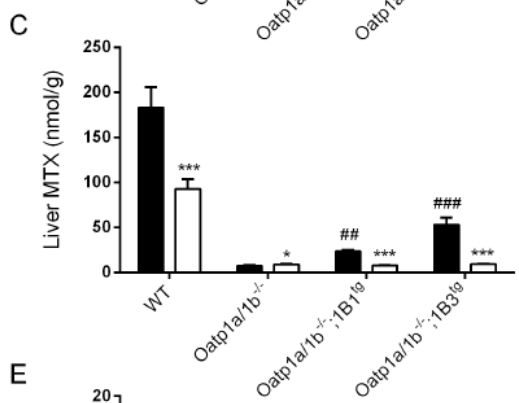
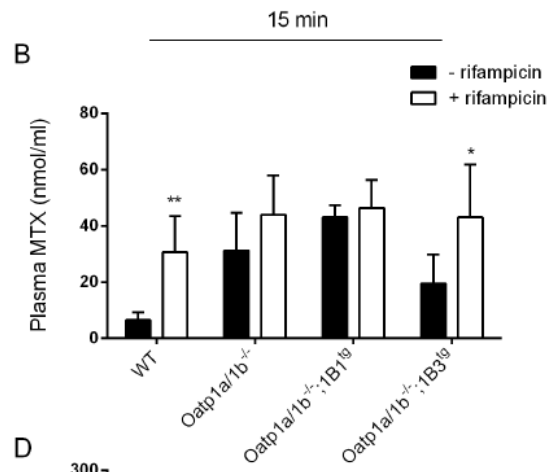
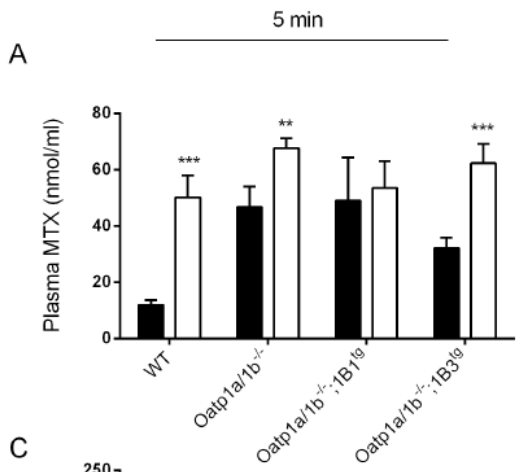
**Figure 4:** Plasma and liver disposition of rifampicin in male WT, Oatp1a/1b<sup>-/-</sup> and OATP1B1-, and OATP1B3-humanized transgenic mice pre-dosed with rifampicin. Rifampicin plasma concentrations in nmol/ml (A), liver concentrations in nmol/g (B), liver-to-plasma ratios (C) and % of the total rifampicin dose in liver (D) 5 and 15 min after i.v. administration of 10 mg/kg MTX and 20 mg/kg rifampicin are presented. Data are given as mean  $\pm$  S.D. One-way ANOVA was applied to compare Oatp1a/1b<sup>-/-</sup> and either of the transgenic strains to WT mice. (n = 4 for 5 min and n = 3 - 5 for 15 min experiments, \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  when compared with WT mice and #,  $P < 0.05$ ; ##,  $P < 0.01$  when transgenic mice were compared to each other).

**Figure 5:** Inhibition of OATP-mediated MTX uptake by telmisartan. Inhibition of 50  $\mu\text{M}$  MTX uptake by different concentrations of telmisartan (1 - 100  $\mu\text{M}$ ) was assessed at 15 min using OATP1B1- (A), OATP1B3- (B) or OATP1A2- (C) overexpressing HEK293 cells. MTX uptake in OATP-expressing clones was not corrected for the background in control cells. IC50 values were calculated from generated data using non-linear regression (curve fit) analysis. Data are given as mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

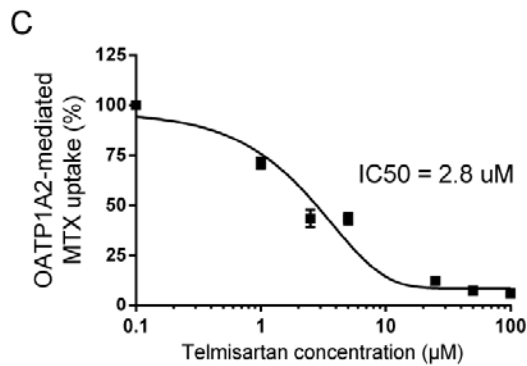
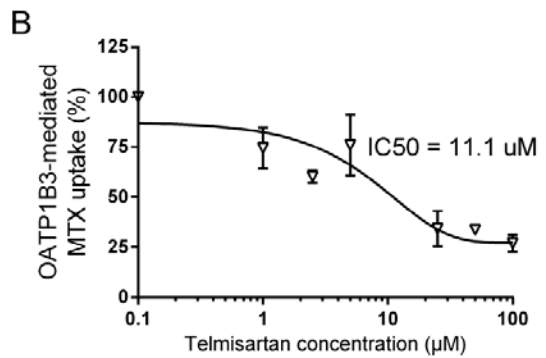
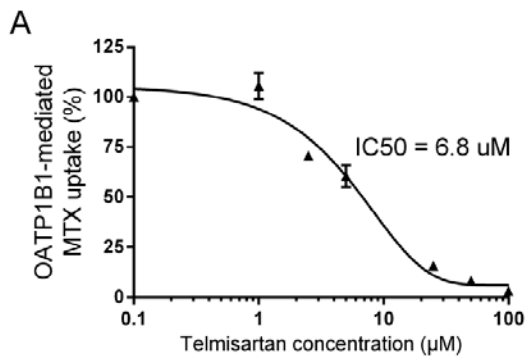
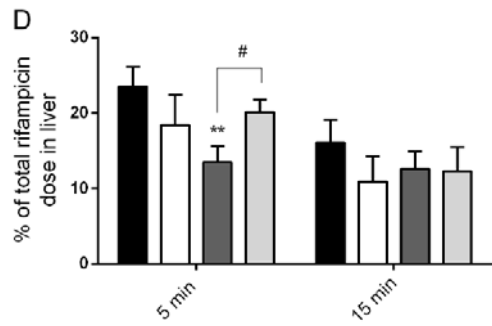
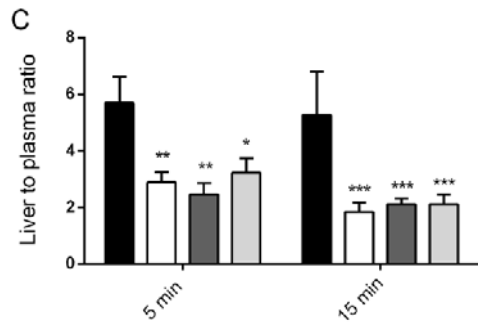
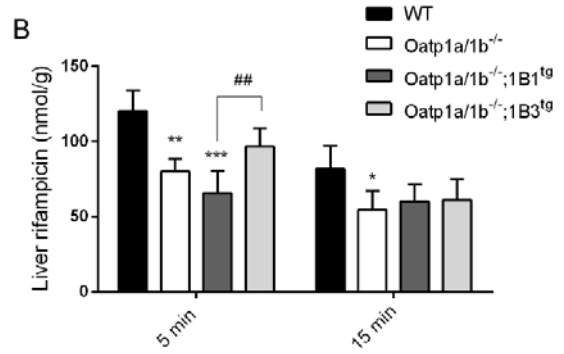
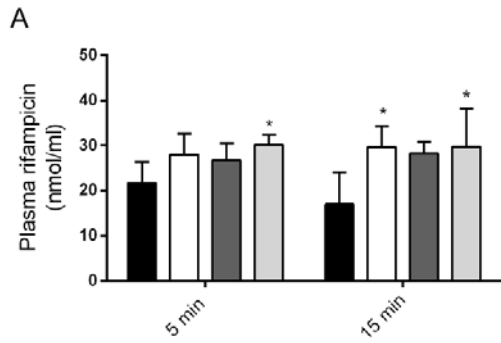
**Figure 6:** Effect of telmisartan on OATP-mediated MTX disposition in male WT, Oatp1a/1b<sup>-/-</sup> and OATP1B1-, and OATP1B3-humanized transgenic mice. MTX plasma concentrations in nmol/ml (A,B), liver concentrations in nmol/g (C,D) and liver-to-plasma ratios (E,F) 5 and 15 min after i.v. administration of 2 or 10 mg/kg MTX and 7 mg/kg telmisartan are presented. Vehicle (PBS) or telmisartan were administered i.v. 3 min before MTX dosing. Data are given as mean  $\pm$  S.D. Student's t-test was applied to compare telmisartan-treated with vehicle-treated groups. (n = 4 - 6 for 5 min and n = 4 for 15 min experiments, \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  when compared with vehicle treatment. #,  $P < 0.05$ ; ##,  $P < 0.01$ ; ###,  $P < 0.001$  when compared with vehicle-treated Oatp1a/1b<sup>-/-</sup> mice).

**Figure 7:** Plasma and liver disposition of telmisartan in male WT, Oatp1a/1b<sup>-/-</sup> and OATP1B1-, and OATP1B3-humanized transgenic mice dosed with 7 mg/kg telmisartan. Telmisartan plasma concentrations in nmol/ml (A), liver concentrations in nmol/g (B), liver-to-plasma ratios (C) and % of the total telmisartan dose in liver (D) 5 and 15 min after i.v. administration of 2 or 10 mg/kg MTX  $\pm$  7 mg/kg telmisartan are presented. Data are given as mean  $\pm$  S.D. One-way ANOVA was applied to compare Oatp1a/1b<sup>-/-</sup> and either of the transgenic strains to WT mice. (n = 4 for 5 min and n = 3 - 5 for 15 min experiments, \*,  $P < 0.05$  when compared with WT mice).

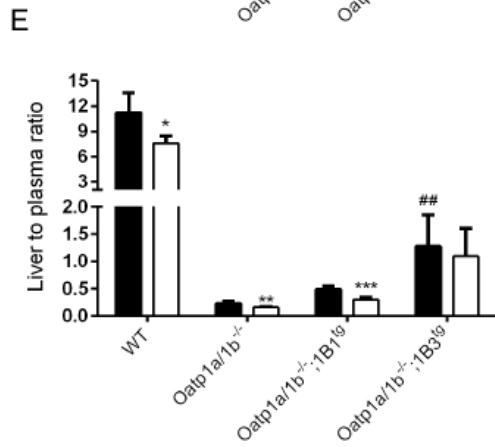
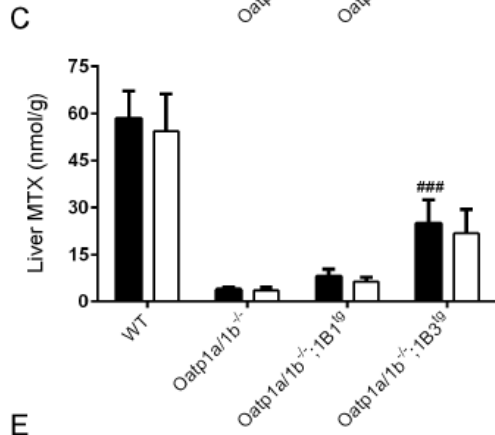
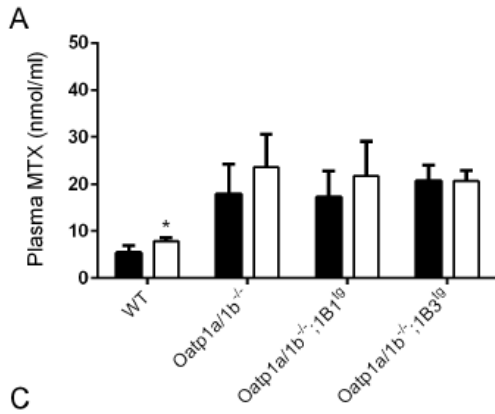




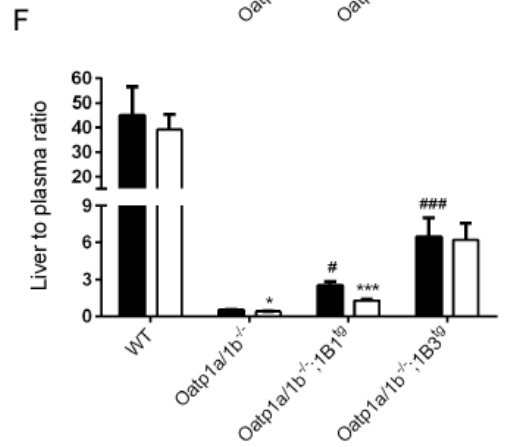
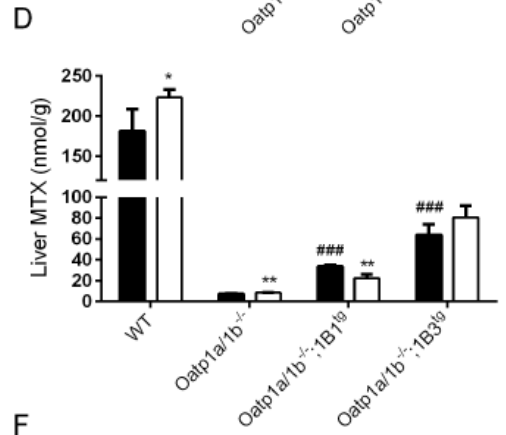
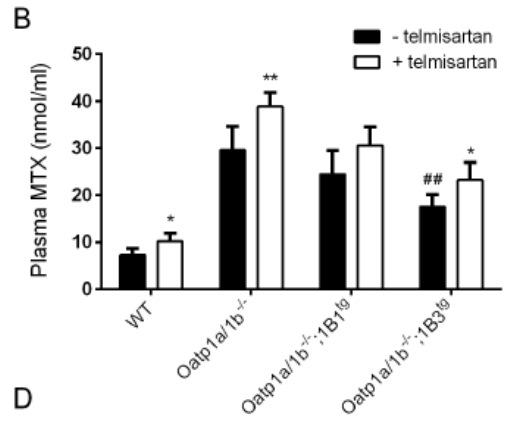




7 mg/kg telmisartan + 2 mg/kg MTX  
5 min



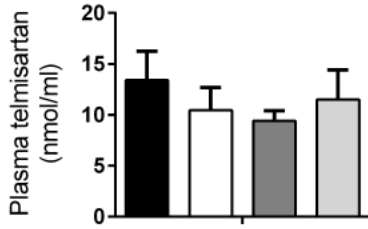
7 mg/kg telmisartan + 10 mg/kg MTX  
15 min



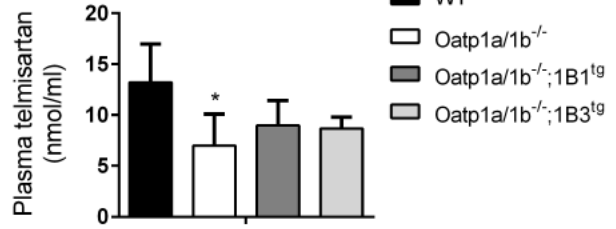
7 mg/kg telmisartan + 2 mg/kg MTX  
5 min

7 mg/kg telmisartan + 10 mg/kg MTX  
15 min

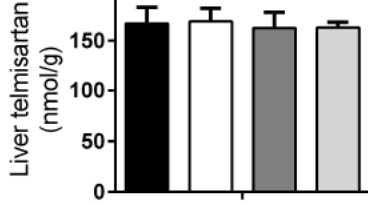
A



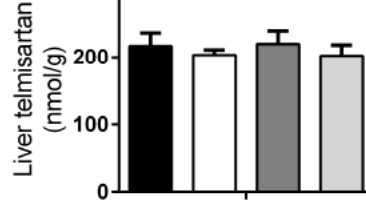
B



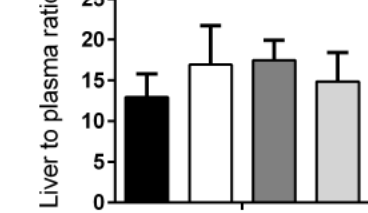
C



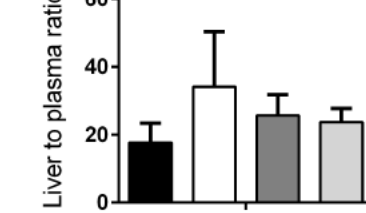
D



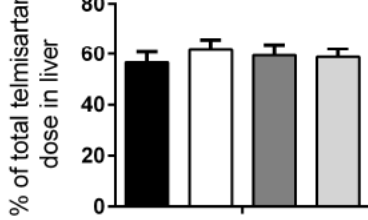
E



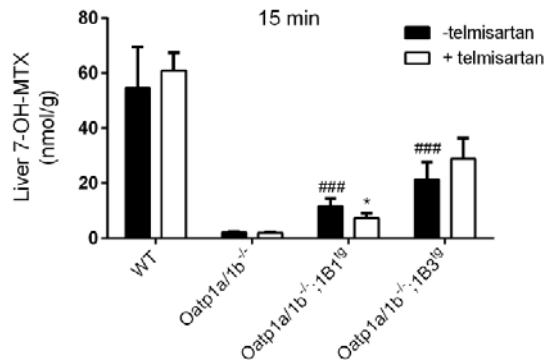
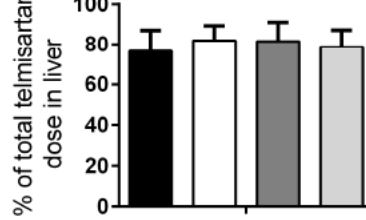
F

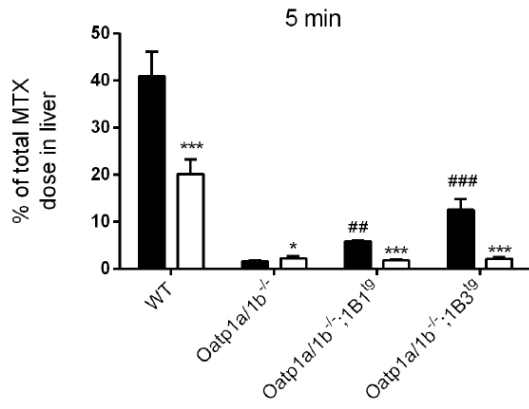
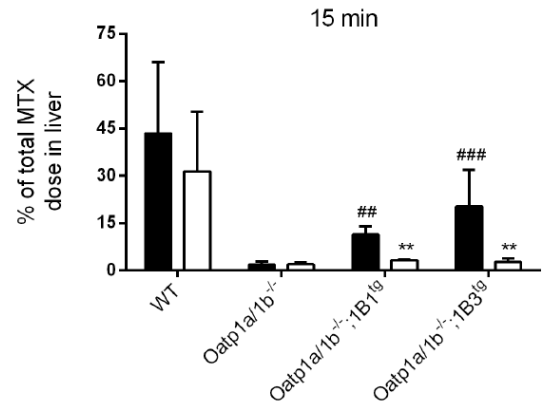
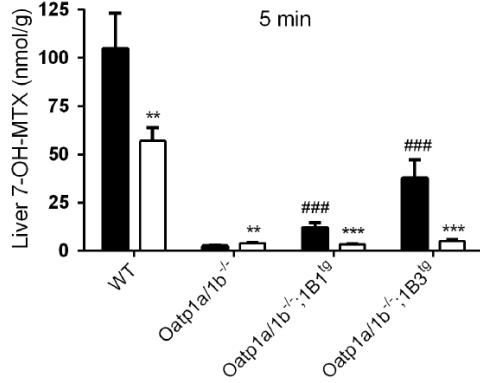
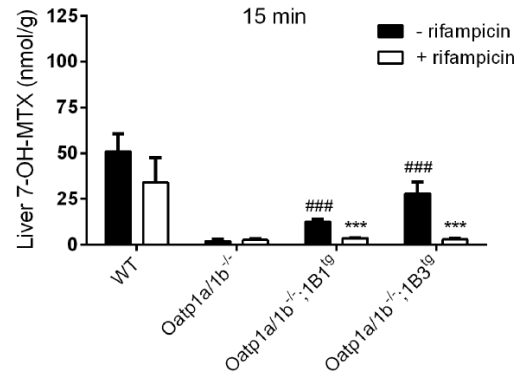
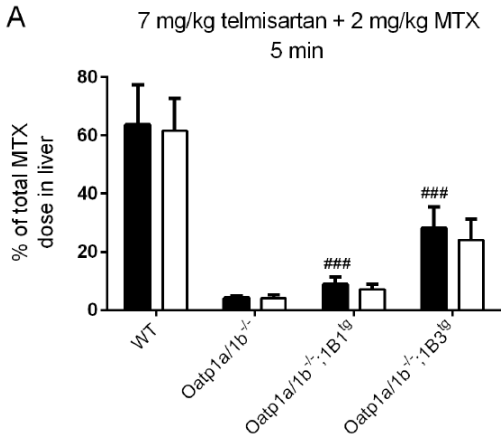


G



H



**A****B****A****B****A****B**