



Original / Investigación animal

Evaluación de la citotoxicidad y bioseguridad de un extracto de polifenoles de huesos de aceitunas

C. Veciana Galindo¹, E. Cortés Castell², L. Torro Montell¹, E. Sirvent Segura¹, M. M. Rizo Baeza³ y V. Gil Guillén⁴

¹Laboratorio de Biotecnología y Proyectos. Biopartner S.L. ²Departamento Farmacología, Pediatría y Q. Orgánica. Universidad Miguel Hernández. ³Departamento de Enfermería y Nutrición. Universidad de Alicante. ⁴Departamento de Medicina Clínica. Universidad Miguel Hernández. España.

Resumen

El olivo constituye una fuente de compuestos bioactivos, tanto en su fruto, como en sus subproductos. Algunos de sus compuestos han mostrado beneficios para la salud, siendo objetivo de este trabajo la evaluación de la bioseguridad in vitro e in vivo de extractos de huesos de aceituna ricos en polifenoles.

Material y métodos: Se ha evaluado la citotoxicidad mediante adición de extracto de hueso de olivas disuelto en PBS(0-400 mg/l) a un cultivo de la línea celular THP1-XBlue-CD14 y evaluación de la viabilidad celular mediante la reacción de reducción de la resazurina por las células vivas. La bioseguridad se ha evaluado en pez cebra, incubando huevos fecundados en extracto de 0 a 100 mg/l durante 24 a 72 horas y midiendo los parámetros: a) letales (embriones muertos, huevos coagulados), b) subletales (movimientos espontáneos, pigmentación, edemas) y c) teratogénicos (malformaciones, retraso desarrollo).

Resultados: La citotoxicidad (efecto tóxico cuando viabilidad inferior al 75%) del extracto de huesos de oliva en la línea celular THP1-XBlue-CD14, está en concentraciones superiores a 50 mg/l de extracto (viabilidad 77,5%), calculando una LD50 (dosis de letalidad 50%) superior a 800 mg/l. La bioseguridad in vivo con los embriones de pez cebra expuestos a concentraciones de extracto de 0-100 mg/l mostró total viabilidad a 24, 48 y 72 horas post fecundación (hpf), no observándose mortalidad ni se apreciaron embriones con efectos subletales, teratogénicos, ni adelanto o retraso en la eclosión. Se puede concluir que el extracto de huesos de olivas es altamente bioseguro hasta al menos concentraciones de 100 mg/l.

(Nutr Hosp. 2014;29:1388-1393)

DOI:10.3305/nh.2014.29.6.7141

Palabras clave: *Compuestos bioactivos. Hueso aceituna. Bioseguridad. Citotoxicidad. Pez cebra.*

ASSESSMENT OF CYTOTOXICITY AND BIOSAFETY OF POLYPHENOLIC EXTRACTS FROM OLIVE PITS

Abstract

The olive tree is a source of bioactive compounds, both its fruit and its by-products. Some of its compounds have shown health benefits, being objective of this work the evaluation of biosafety in-vitro and in vivo of extracts of olive stones rich in polyphenols.

Material and methods: He has been evaluated for cytotoxicity by addition of lyophilized extract dissolved in PBS(0-400 mg/l) to a culture of the cell line THP1-XBlue-CD14 and evaluation of cell viability by the reaction of reduction of resazurin by living cells. Biosecurity has been evaluated in zebrafish, incubating eggs fertilized in 0 to 100 mg/l extract for 24 to 72 hours and measuring parameters: a) lethal (dead embryos, coagulated eggs), b) sublethal (spontaneous movements, pigmentation, edemas) and c) teratogenic (malformations, retardation development).

Results: Cytotoxicity (toxic effect when less than 75% viability) extract bones of olive in the cell line THP1-XBlue-CD14, is in concentrations higher than 50 mg/l, calculating a LD50 (dose lethality 50) more than 800 mg/l. The biosafety of zebrafish embryos exposed to concentrations of extract from 0-100 mg/l showed total viability at 24, 48 and 72 hours post fertilization (hpf), not observed mortality or appreciated embryos with sublethal effects, teratogenic, or advancement or delay in hatching. It can be concluded that the bones of olive extract is highly biosecured until at least 100 mg/l concentrations.

(Nutr Hosp. 2014;29:1388-1393)

DOI:10.3305/nh.2014.29.6.7141

Key words: *Bioactive compound. Olive bone. Biosecurity. Cytotoxicity. Zebrafish.*

Correspondencia: Ernesto Cortés Castell.
E-mail: ernesto.cortes@umh.es

Recibido: 14-I-2014.
1.ª Revisión: 9-II-2014.
Aceptado: 25-III-2014.

Introducción

Entre las sustancias presentes en algunos alimentos en los que se ha demostrado una característica adicional para la salud, con declaración de salud aprobadas (GRAS)¹ están: Fibra soluble, fitoesteroles, proteína de soja, ácidos grasos n-3, potasio, vitaminas antioxidante, folato, etc. Entre los compuestos que otorgan estas características funcionales a los alimentos se encuentran los compuestos fenólicos que han despertado gran interés debido a su poder antioxidante, que les dota de un efecto quimioprotector en seres humanos y les hace tener gran influencia en la estabilidad a la oxidación que presentan los alimentos.

Existen distintos nutrientes de gran relevancia para el desarrollo y mantenimiento de la función cognitiva, como los ácidos grasos poliinsaturados n-3 (DHA) y compuestos antioxidantes, importantes para la formación y desarrollo de las neuronas y otras células del SNC, pero también para la prevención de enfermedades neurodegenerativas. Diversos estudios han demostrado que la suplementación con estos nutrientes se asocia a una mejora de la función cognitiva, que se refleja en el proceso de aprendizaje o la memoria en niños o a una prevención del declive en personas de la tercera edad.

Estos hechos están produciendo un interés creciente por sustancias con capacidad neuroprotectora, que puedan contribuir a prevenir la incidencia de factores degenerativos desde la infancia y mitigar el impacto de enfermedades de carácter neurodegenerativo, que tienen un índice de prevalencia en aumento en la edad madura. Entre los mecanismos de acción para explicar la capacidad neuroprotectora de estas sustancias, se pueden citar la acción antiinflamatoria, la modulación de vías de señalización intracelular, la modulación de la expresión de proteínas, la inhibición de las vías apoptóticas o la acción antioxidante².

Los antioxidantes pueden anular los efectos perjudiciales de los radicales libres en las células³, y personas con dietas ricas en frutas y vegetales (alimentos ricos en polifenoles y antocianinas) tienen un riesgo más bajo de contraer cáncer, enfermedades cardíacas y algunas enfermedades neurológicas⁴. Sugiriéndose que estos compuestos pueden prevenir la degeneración macular⁵, la supresión de inmunidad debida a una nutrición pobre⁶, y neurodegeneración, que son causados por el estrés oxidativo⁷. También los antioxidantes han demostrado ser una protección efectiva y eficaz para prevenir el envejecimiento prematuro y enfermedades crónicas degenerativas, como hipertensión, artritis reumatoide, lupus, diabetes mellitus, arteriosclerosis, entre otras.

Los antioxidantes metabólicos y los que se obtienen con la alimentación, no son suficientes para la mayoría de las personas, por esa razón muchas compañías alimentarias y de nutracéuticos venden formulaciones de antioxidantes como suplementos dietéticos y estos son ampliamente consumidos en los países industrializa-

dos⁸. Estos suplementos pueden incluir químicos específicos antioxidantes, como el resveratrol (de las semillas de uva), *hidroxitirosol* procedente de la oliva, combinaciones de antioxidantes, como el "ACES" productos que contienen beta-caroteno (provitamina A), vitamina C, vitamina E y Selenio, o hierbas especiales que se sabe que contienen antioxidantes, como el té verde y el jiaogulan. Los niveles de vitaminas antioxidantes y minerales en la dieta son necesarios para la buena salud, pero hay considerables dudas sobre si los suplementos antioxidantes son beneficiosos y, en caso afirmativo, que antioxidantes lo son y en qué cantidades^{4,9,10}.

El olivo constituye una fuente natural de compuestos bioactivos, tanto de su fruto la oliva, el aceite o los subproductos de su procesado (huesos de oliva, hojas, etc). En las hojas se han aislado toda una serie de productos bioactivos mediante la extracción con hexano¹¹. Por ello se han realizado investigaciones encaminadas a la recuperación de antioxidantes en los efluentes acuosos durante el proceso de obtención del aceite de oliva^{12,13}, en los residuos sólidos¹⁴, pulpa¹⁵, hojas¹⁶ o madera de olivo¹⁷.

La evaluación de la citotoxicidad y bioseguridad de un compuesto o mezcla de compuestos puede abordarse en distintas etapas complementarias: actividad teórica mediante pruebas químicas (por ejemplo índice teórico de polifenoles totales), biológico *in vitro* sobre modelos biológicos y actividad *in vivo* en animales y humanos tras la ingesta de los mismos. En este sentido, los estudios *in vitro* con cultivos celulares son una herramienta de diagnóstico de gran utilidad ya que es posible reproducir estados fisiológicos a escala de laboratorio, facilitando la manipulación y condiciones de ensayo, y permiten elucidar el mecanismo de acción y el efecto beneficioso tanto de sustancias puras como de alimentos ricos en compuestos bioactivos^{18,19}. En cuanto a los estudios *in vivo* con modelos animales se intenta reducir el número de animales y el uso de especies alternativas al ratón, en ese sentido, el uso del pez cebra ha sido utilizado como modelo alternativo en áreas como la agroalimentaria y farmacéutica, para investigar el efecto teratogénico, embriotóxico y genotóxico de muy diversas sustancias así como en estudios embriológicos y neurobiológicos entre otras áreas, debido a un alto grado de similitud genética con los vertebrados superiores, compartiendo un 70% de genes con los humanos, su fácil manejo y reproducción y sus grandes posibilidades de aplicación de las nuevas tecnologías de genómica y proteómica. Junto a estas ventajas su facilidad para obtener gametos y observar el desarrollo embrionario (durante las primeras 24 horas de desarrollo, los embriones son totalmente transparentes permitiendo observar el desarrollo de órganos internos a tiempo real, facilidad de manipulación en el empleo de técnicas genéticas, tiene la habilidad de absorber compuestos directamente desde el agua, producen puestas de embriones numerosas. Es por ello que se ha utilizado para evaluar la bioseguridad de compuestos, el análisis

sistemático de compuestos químicos con potencial terapéutico, identificándose nuevos genes y compuestos químicos que regulan la proliferación descontrolada de células²⁰.

Como objetivo del presente trabajo, se ha planteado evaluar la bioseguridad *in vitro* e *in vivo* de extractos de huesos de aceituna ricos en polifenoles, para posteriormente estudiar sus posibles propiedades beneficiosas y con ello revalorizar dicho subproducto de la aceituna.

Material y métodos

Las muestras evaluadas corresponden a extractos procedentes de huesos de aceituna y redisueltos en PBS a las diferentes concentraciones utilizadas para su evaluación.

Evaluación citotoxicidad

La citotoxicidad se ha evaluado usando la línea celular THP1-XBlue-CD14 (*invivogen*). Se han incubado 50.000 células/pocillo en placas multipocillo de 96 pocillo, con PBS (control) y las concentraciones de 10, 50, 100 y 200 mg/l del extracto de polifenoles en DMS, durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido el período de incubación se evalúa la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico con el reactivo AlamarBlue (*invitrogen*)²¹. Se mide la absorbancia a 570nm. El AlamarBlue® es un indicador de la viabilidad celular demostrado que utiliza el poder natural de la reducción de las células vivas para convertir resazurina a la molécula resorufin. El principio activo de AlamarBlue® (resazurina) es un compuesto no tóxico, la célula es permeable al colorante de color azul y no fluorescente de forma virtual. Al entrar en las células, se reduce la resazurina a resorufin, que produce un compuesto de color rojo. Las células viables convierten continuamente la resazurina a resorufin, generando así una medida cuantitativa de la viabilidad y citotoxicidad. Dada la relación directa entre absorbancia y viabilidad celular, el cálculo de la viabilidad se realiza respecto a las células control (sin tratamiento) mediante la fórmula: % viabilidad = (Abs muestra/ Abs control) x 100.

Evaluación bioseguridad

Se han testado las concentraciones de extracto con polifenoles a 1, 3, 10, 30 y 100 mg/l en agua con DMSO al 0,1%, más un grupo control (agua con DMSO al 0,1%) en embriones de pez cebra. Para la realización del ensayo, se utilizaron únicamente aquellos huevos fecundados que no presentaron ningún tipo de anomalía externa (asimetrías, vesículas, membrana estuviera dañada). Se transfirió un huevo/pocillo con pipeta Pas-

teur a una microplaca de 96 pocillos, de forma que los huevos no entraron en contacto con el aire y de modo que cada pocillo contuviera un único huevo en un volumen de 100 µl de las concentraciones de ensayo y del vehículo. Las placas se incubaron a 26 ± 1°C durante 24, 48 y 72 h. Tras cada periodo de incubación, se examinaron los huevos/embriones/larvas mediante un estereomicroscopio y se anotaron los resultados obtenidos según los criterios especificados a continuación: a) Parámetros letales, un embrión se considera muerto si presenta alguno de los parámetros: huevos coagulados que son opacos, desprendimiento de la cola, detección o no de ritmo cardiaco, formación de somitas (series longitudinales del mesodermo que por delaminación, fusión y migración se convierten en el esqueleto axial, la dermis y los músculos dorsales y la pared del cuerpo y las extremidades). b) Parámetros subletales, si aparecen: Movimientos espontáneos, cambios en la pigmentación, formación de edemas o formación de coágulos. Y c) Parámetros teratogénicos: malformaciones en órganos y estructuras; escoliosis, raquitismo o retardo generalizado del desarrollo.

Resultados

Evaluación citotoxicidad

Los resultados de toxicidad en función de la concentración aplicada sobre el modelo de la línea celular THP1-XBlue-CD14 están expresados en la tabla I, observándose que a 10 mg/l la viabilidad en los cultivos es superior incluso al control, con un efecto aparentemente protector, decayendo a 50 mg/l al 77,5%, y considerando efecto tóxico cuando la viabilidad es inferior al 75%, la concentración del extracto puede considerarse viable hasta aproximadamente los 100 mg/l en los que se obtiene un 74,6% de viabilidad.

Considerando una función exponencial (fig. 1), se puede tener un valor teórico aproximado de la LD50 (dosis que presenta una letalidad del 50%), resultando superior a 800 mg/l, superiores al rango de concentraciones seleccionado e incluso a la solubilidad acuosa del extracto.

Evaluación bioseguridad

Se ha analizado la bioseguridad y determinado la dosis máxima tolerada (MTD) del extracto mediante el uso del ensayo FET en embrión de pez cebra. Los embriones fueron expuestos hasta la concentración de 100 mg/l del extracto, no observándose ninguna mortalidad a los periodos de 24, 48 y 72 horas postfecundación (hpf) en ninguno de los 96 pocillos de cada concentración de extracto ni en la placa de los controles, obteniéndose en todos los casos un 100% de viabilidad. Tampoco aparecen, a ninguna concentración de las analizadas, embriones que hayan sufrido efectos suble-

Tabla I
Absorbancias obtenidas a distintas concentraciones del extracto y porcentaje de viabilidad de las células THP1-XBlue-CD14

Concentraciones extracto (mg/l)	Abs muestra	% Viabilidad	Citotoxicidad
0	0,71	100	control
10	0,82	115,5	viable
50	0,55	77,5	viable
100	0,53	74,6	tóxico
200	0,49	69,0	tóxico

Tóxico: Se considera efecto tóxico cuando la viabilidad celular es inferior al 75% Viable: Se considera efecto viable cuando la viabilidad celular es superior al 75%.

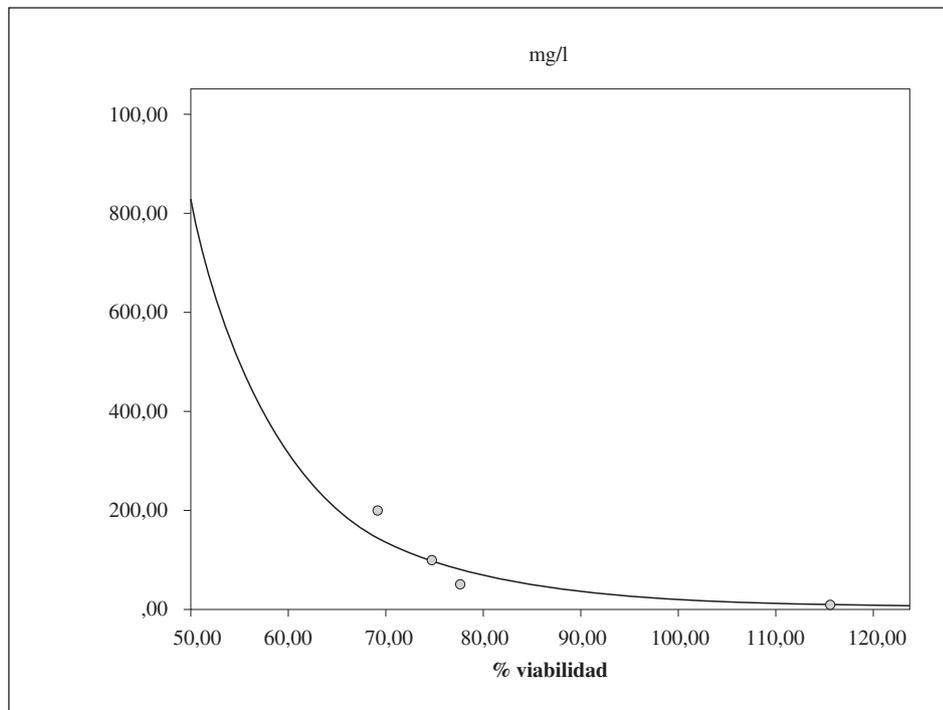


Fig. 1.—Cálculo de la LD50 (dosis que presenta una letalidad del 50%), a partir de la representación exponencial de la concentración de extracto utilizada (mg/l) y el porcentaje de viabilidad.

tales, como ausencia de movimiento espontáneo, despigmentación, formación de edemas, formación de coágulo, es decir no se observaron efectos tóxicos, ni efectos teratogénicos. Los ensayos FET por norma se realizan hasta un tiempo de 48 hpf, sin embargo, se ha implementado el estudio llevándolo hasta el tiempo de 72 h, debido a que en ese tiempo se produce el proceso denominado como decorionización del embrión, es decir, la ruptura del corion (membrana que rodea al embrión) para comenzar el proceso de estadio larvario, considerándose este parámetro como un marcador toxicológico adicional al estudio FET, no observándose tampoco ninguna modificación en la decorionización.

Un fenómeno importante para el estudio de toxicidad en el modelo del pez cebra es la capacidad que tiene un compuesto de acelerar o retrasar el proceso denominado como eclosión, es decir, la salida del embrión al exterior para convertirse en estadio larvario. No se

registró ningún retraso o adelanto en el tiempo post-fertilización para la eclosión con las concentraciones del extracto analizadas.

En resumen, los parámetros de concentración letal 50 (LC50), concentración mínima con efecto observado (LOEC) y concentración máxima sin efecto observado (NOEC), también denominada como máxima dosis tolerada (MTD), son superiores a 100 mg/l. Por lo que según el método de estudio realizado, se considera que el extracto es altamente bioseguro.

Discusión

El efecto de la alimentación en la salud se atribuye a la presencia de ciertos compuestos que ejercen una acción beneficiosa, los compuestos bioactivos. Dada la importancia de los compuestos bioactivos en los secto-

res de la alimentación y farmacéutico actualmente existe un gran interés en la identificación de nuevos compuestos bioactivos y/o en la identificación de nuevas propiedades de los mismos. Las propiedades bioactivas se analizan mediante la realización de ensayos específicos en función del efecto biológico de interés. Para ello, se dan varios niveles en la experimentación de dichos efectos biológicos, que en orden cronológico deben de efectuarse: in vitro, in vivo y ensayos clínicos.

Los polifenoles contenidos en los extractos procedentes del olivo presentan propiedades antioxidantes que hacen que sean candidatos para la investigación de enfermedades neurodegenerativas y reguladoras de la obesidad²². Además tienen otras actividades biológicas que le confieren importancia dentro de la "Dieta mediterránea"²³. Se ha demostrado, además de otros efectos beneficiosos, el poder protector de la ingesta de flavonoides, compuestas fenólicas contenidos en vinos, vegetales y frutas frente a la demencia²⁴. La mayoría de los estudios sobre los efectos de los polifenoles procedentes de extractos del olivo apuntan que su acción se debe a su capacidad antioxidante, causada por la capacidad de eliminar las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno implicadas en las enfermedades humanas²⁵.

Históricamente los modelos de ratones han sido los más utilizados para estudios de este tipo, sin embargo, el pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido recientemente en un foco de estudios neuroconductuales, ya que muestra neuropatologías y fenotipos conductuales que son cuantificables^{26,27} y ha sido recientemente propuesto como un paradigma experimental válido para estudio de la enfermedad de Alzheimer²⁸. El pez cebra es un modelo ideal para el estudio de enfermedades humanas debido a que presentan una serie de características que lo hacen único como modelo animal: ofrece un compromiso razonable entre complejidad fisiológica y el rendimiento al tener un genoma caracterizado completamente, y mostrar homología fisiológica significativa a los mamíferos, incluyendo los seres humanos²⁹, ya que el diseño y la conectividad en el centro de su sistema nervioso central (SNC) se correlaciona con la humana³⁰; presenta una ventaja en comparación con otros modelos animales, su dualidad larva-adulto y la disponibilidad de ambas formas que es beneficiosa y permite la investigación de un espectro más amplio de fenómenos neurodegenerativos relacionados en la ontogénesis; su desarrollo más rápido, en comparación con ratones, un corto tiempo de desarrollo hasta la madurez sexual (3 meses) y una alta tasa de reproducción (cientos de embriones por hembra en cada gestación y por semana), hace de ellos la elección ideal para modelar el desarrollo de fenómenos de neurodegeneración. Por otra parte, los modelos de roedores son caros de mantener y más difíciles de modificar genéticamente.

Los embriones son transparentes y desarrollados externamente, hechos que permiten la observación directa de la embriogénesis y el desarrollo del sistema nervioso central. Los embriones son también fácilmente susceptibles a métodos para manipular los genes y la

actividad de la proteína tales como la inyección de oligonucleótidos³¹, ARNm o cADN (transgenes), y para el cribado de bibliotecas de drogas están dispuestos en placas de microtitulación³².

Por otra parte, el desarrollo temprano del pez cebra tiene etapas importantes para analizar procesos y anomalías del sistema nervioso central, y ya en peces adultos, con toda la gama de funciones del cerebro adulto, tienen una ventaja significativa en el análisis de las funciones cerebrales complejas características de los vertebrados³³, y en los estudios de fenotipo conductual.

En efecto, el pez cebra expone muchos de los comportamientos de orden superior, incluyendo la memoria, respuestas condicionadas y comportamientos sociales como el aprender conductas³⁴. Todas estas propiedades hacen del pez cebra un modelo ideal para el estudio de enfermedades humanas, incluyendo trastornos del SNC³⁵ y modelo para el estudio de efectos de agentes bioactivos.

En el presente estudio, la citotoxicidad (efecto tóxico cuando viabilidad inferior al 75%) del extracto de huesos de oliva en la línea celular THP1-XBlue-CD14, está en concentraciones superiores a 50 mg/l de extracto (viabilidad 77,5%), calculando una LD50 (dosis de letalidad 50%) superior a 800 mg/l. La bioseguridad in vivo con los embriones de pez cebra expuestos a concentraciones de extracto de 0-100 mg/l mostró total viabilidad a 24, 48 y 72 horas post fecundación (hpf), no observándose mortalidad ni se apreciaron embriones con efectos subletales, teratógenos, ni adelanto o retraso en la eclosión. Según el *Test Guideline* de la OECD 212 (1998), *Ensayo de toxicidad a corto plazo en embriones de pez y alevines*, no sería preciso someter a ensayo con concentraciones superiores a 100 mg/l, ya que según la teoría binomial, cuando se usan 10 animales expuestos a esta concentración y no presentan mortalidad, existe un 99.9% de confianza de que la LC50 sea mayor de 100 mg/l, siendo esta dosis considerada como la concentración límite o umbral para ensayos de toxicidad en peces, siendo la utilizable en posteriores estudios del extracto de polifenoles en este modelo animal.

Alcanzar concentraciones de trabajo superiores a 100 mg/l del extracto producía problemas con la disolución del mismo en medio acuoso por lo que se trabajó con la dosis más alta para evaluar la toxicidad, la cual alcanzaba un equilibrio entre la capacidad de disolución del extracto y la concentración final de uso. Ya que según el TG 203 de la OECD (1998), las sustancias no deben someterse a ensayo a concentraciones superiores a su límite de solubilidad en el medio de ensayo.

En conclusión, el extracto de polifenoles de huesos de oliva es altamente bioseguro y puede suponer una fuente adecuada de polifenoles.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a Neuron BioServices: Proveedor de Servicios de Investigación,

por su colaboración en los ensayos realizados con el pez cebra.

Referencias

1. FAO. Etiquetado de los alimentos Textos completos. Codex Alimentarius. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. 1999. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/W8612S/W8612S00.htm>
2. Jordan E, Lovett DK, Monahan FJ, Callan J, Flynn B, O'Mara FP. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. *J Anim Sci* 2006; 84 (1): 162-70.
3. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82 (2): 291-5.
4. Bartlett H, Eperjesi F. Age-related macular degeneration and nutritional supplementation: a review of randomised controlled trials. *Ophthalmic Physiol Opt* 2003; 23 (5): 383-99. PMID 12950886.
5. Wintergerst E, Maggini S, Hornig D. Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. *Ann Nutr Metab* 2006; 50 (2): 85-94. PMID 16373990.
6. Wang J, Wen L, Huang Y, Chen Y, Ku M. Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of gliamediated inflammation. *Curr Pharm Des* 2006; 12 (27): 3521-33. PMID 17017945.
7. Bleys J, Miller E, Pastor-Barriuso R, Appel L, Guallar E. Vitamin-mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2006; 84 (4): 880-7; quiz 954-5. PMID 17023716.
8. Radimer K, Bindewald B, Hughes J, Ervin B, Swanson C, Picciano M. Dietary supplement use by US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Am J Epidemiol* 2004; 160 (4): 339-49. PMID 15286019.
9. Woodside J, McCall D, McGartland C, Young I. Micronutrients: dietary intake v. supplement use. *Proc Nutr Soc* 2005; 64 (4): 543-53.
10. Hughes J, Kelly CN, Buttriss J. A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. *Public Health Nutr* 2004; 7 (3): 407-22.
11. Guinda A, Lanzón A, Rios JJ, Albi T. Aislamiento y cuantificación de los componentes de la hoja del olivo: extracto de hexano. *Grasas y Aceites* 2002; 419 Vol. 53. Fasc. 4: 419-22.
12. De Marco E, Savarese M, Paduano A, Sacchi R. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chem* 2007; 104 (2): 858-67.
13. Obied HK, Bedgood DR Jr, Prenzler PD, Robards K. Effect of processing conditions, prestorage treatment, and storage conditions on the phenol content and antioxidant activity of olive mill waste. *J Agric Food Chem* 2008; Jun 11; 56 (11): 3925-32.
14. Aldini G, Piccoli A, Beretta G, Morazzoni P, Riva A, Marinello C, Maffei Facino R. Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of c.v. Coratina. *Fitoterapia* 2006; Feb; 77 (2): 121-8. Epub 2006 Jan 6.
15. Soni MG, Burdock GA, Christian MS, Bitler CM, Crea R. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food Chem Toxicol* 2006 Jul; 44 (7): 903-15.
16. Jemai H, Bouaziz M, Fki I, El Feki A, Sayadi S. Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem Biol Interact* 2008; Nov 25; 176 (2-3): 88-98.
17. Zbidi H, Salido S, Altarejos J, Perez-Bonilla M, Bartegi A, Rosado JA, Salido GM. Olive tree wood phenolic compounds with human platelet antiaggregant properties. *Blood Cells Mol Dis* 2009; May-Jun; 42 (3): 279-85.
18. O'Brien NM, Woods JA, Aheme SA, O'Callaghan YC. Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochem Soc Trans* 2000; 28: 22-6.
19. Lee YY, Kim HG, Jung HI, Shin YH, Hong SM, Park EH, Sa JH, Lim CJ. Activities of antioxidant and redox enzymes in human normal hepatic and hepatoma cell lines. *Mol Cells* 2002; 14: 305-11.
20. Martinez A, del Carmen J, Gonzalez MR. Evaluación de los efectos histopatológicos de un extracto alcohólico de *Microcystis sp* en hígado de Carpa Dorada (*Carassius auratus*) y Tilapia (*Cichlasoma nigrofasciatum*) CIVA 2006; (767-773).
21. Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum Reprod* 2007; 22 (5): 1304-1309 first published online February 16, 2007.
22. Sears B, Ricordi C. Role of fatty acids and polyphenols in inflammatory gene transcription and their impact on obesity, metabolic syndrome and diabetes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012 Sep; 16 (9): 1137-54.
23. Visoli F. Antioxidant and aother biological activities of phenols from olives and olives oil. *Med Res Rev* 2001; 22: 65-75.
24. Commenges, D. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur J Epidemiol* 2000; 16: 357-363.
25. De la Puerta R, Martinez Dominguez ME, Ruiz-Gutierrez V. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitergic neurotransmission. *Life Sci* 2001; Jul 27; 69 (10): 1213-22.
26. Bowman TV, Zon LI. Swimming into the future of drug discovery: in vivo chemical screens in zebrafish. *ACS Chem Biol* 2010; 5: 159-61.
27. Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Da Silva RS, Bonan CD. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicol Teratol* 2011; 33: 608-17.
28. Newman M, Verdile G, Martins RN, Lardelli M. Zebrafish as a tool in Alzheimer's disease research. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 346-52.
29. Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, McPherson JD, Johnson SL. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res* 2000; 10: 1351-8.
30. Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav* 2004; 3: 63-74.
31. Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* 2000; 26: 216-20.
32. Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 35-44.
33. Panula P, Sallinen V, Sundvik M, Kolehmainen J, Torkko V, Tiittula A, Moshnyakov M, Podlasz P. Modulatory neurotransmitter systems and behavior: towards zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Zebrafish* 2006; 3: 235-47.
34. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 353-67.
35. Grunwald DJ, Eisen JS. Headwaters of the zebrafish—emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 717-24.