

Una innovadora aproximación metabolómica inductiva para la identificación de metabolitos derivados de polifenoles de la hoja de olivo y sus dianas moleculares

Patricia Fernández-Moreno^{1,2}, Álvaro Fernández-Ochoa¹, María del Carmen Villegas-Aguilar¹,
María de la Luz Cádiz-Gurrea¹, David Arráez-Román¹, Antonio Segura-Carretero¹

1) Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Av. Fuentenueva s/n, Granada 18071, España (patrifdez@correo.ugr.es)
2) Máster en Ciencias y Tecnologías Químicas (KHEMIA), Facultad de Ciencias, Universidad de Granada



Resumen

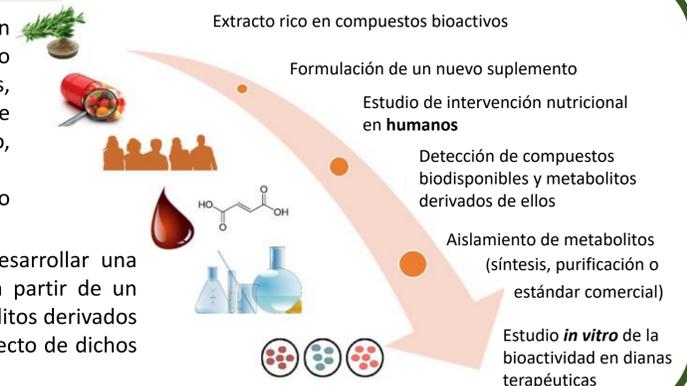
En los últimos años ha surgido un creciente interés sobre los subproductos del sector oleico, destacando principalmente las **hojas de olivo**, que a día de hoy suponen un gran problema tanto económico como medioambiental, y que pueden generar nuevos caminos de **bioeconomía circular**. Por otro lado, es conocido el **carácter bioactivo y pleiotrópico** de diferentes familias de compuestos presentes en la hoja de olivo.

Aquí se describe un ensayo de intervención nutricional, basado en la ingesta de un extracto de hoja de olivo encapsulado, en el que se recogen muestras de plasma sanguíneo con la finalidad de identificar los metabolitos que son biodisponibles y evaluar las rutas de metabolización de los compuestos bioactivos del extracto.

Introducción

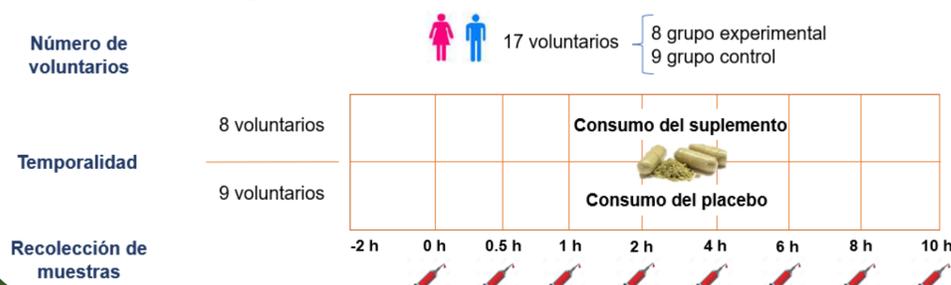
Numerosas evidencias demuestran que la hoja de olivo es un subproducto agrícola que contiene compuestos a los que se han asociado múltiples **propiedades beneficiosas para la salud** (antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias y antimicrobianas, entre otras). Entre diferentes familias de compuestos bioactivos descritos en la hoja de olivo, destaca la presencia de **compuestos fenólicos** [1-2]. Pese a ello, pocos estudios han investigado su absorción y metabolismo en seres humanos tras su ingestión.

Dado este motivo, el objetivo fundamental de la investigación es desarrollar una metodología novedosa basada en una aproximación metabolómica, a partir de un ensayo *in vivo* en modelos humanos, que permita identificar los metabolitos derivados de los compuestos fenólicos de la hoja de olivo, así como conocer el efecto de dichos compuestos sobre mecanismos biológicos.



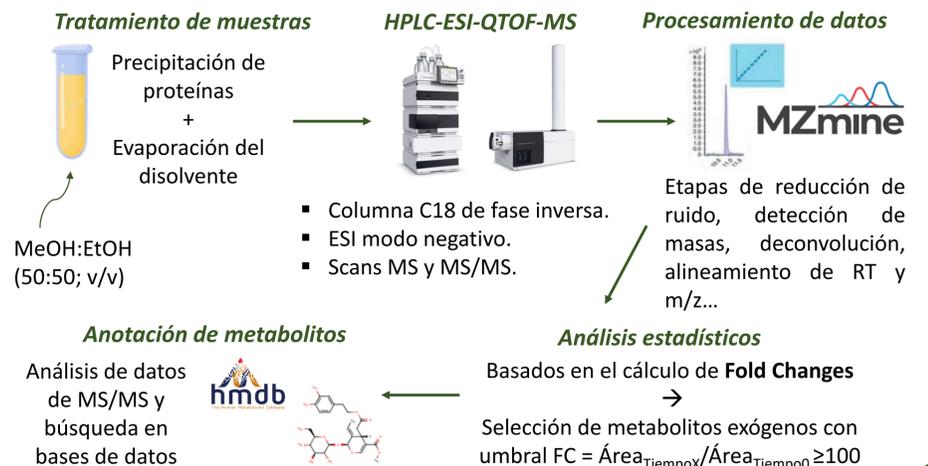
Diseño experimental

- El extracto de hoja de olivo fue encapsulado en cantidades de 500 mg/cápsula.
- 17 voluntarios sanos** fueron reclutados para participar en el ensayo de intervención nutricional.
- Dicho ensayo consistió en la ingesta de una **única dosis del extracto encapsulado** para 8 de los voluntarios (grupo experimental). Los 9 participantes restantes ingirieron una cápsula placebo (grupo control).
- Muestras de **plasma sanguíneo** fueron recolectadas a distintos tiempos el día de la intervención.



Materiales y Métodos

Metodología metabolómica no dirigida



Resultados y Discusión

Más de 11.000 señales fueron detectadas en el conjunto de las muestras biológicas analizadas.

Dichas señales fueron filtradas en base a los siguientes dos criterios:

- Que la señal haya sido detectada en, al menos, 6 voluntarios de los 8 voluntarios del grupo experimental.
- Que la señal no haya sido detectada en ninguna de las muestras de los voluntarios del grupo placebo.

Con ello, el número de señales de interés se redujo a 22.

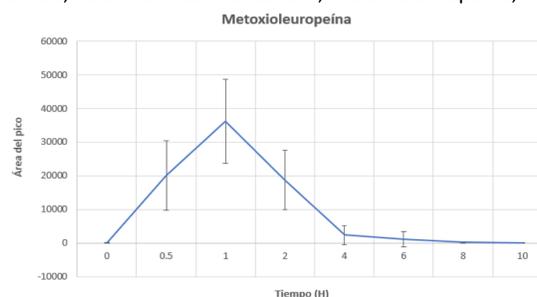
Entre ellas, **se propone la anotación de 18 metabolitos**, que pueden verse en la tabla [3-5].

El análisis cualitativo mostró una **alta biodisponibilidad** de los compuestos fenólicos de la hoja de olivo, y, en especial, de aquellos para los que la oleuropeína, el compuesto más abundante y ampliamente estudiado, es la estructura precursora (ej.: derivados de oleuropeína, de hidroxitirosol o de ácido elenólico).

Muchos de los metabolitos encontrados se generan a partir de **reacciones metabólicas de fase I** (ej.: hidroxioleuropeína) y **de fase II** (ej.: hidroxitirosol glucuronido, ácido vanílico 4-O-sulfato, metoxioleuropeína, etc.).

Para la mayoría de estos metabolitos, las señales plasmáticas más intensas se encuentran **entre 0.5 y 2 horas después de la ingesta del suplemento**, lo que sugiere una absorción, fundamentalmente, en la primera parte del tracto gastrointestinal.

En la figura se muestra como ejemplo el caso de la metoxioleuropeína, para la que el pico de máxima absorción se halla 1 hora tras la toma del extracto encapsulado.



m/z	RT (min)	Fórmula propuesta	Metabolito propuesto	Fragmentos de MS/MS	T _{máx}
233.0123	6.51	C ₈ H ₁₀ O ₆ S	Hidroxitirosol sulfato	123/79/153	1 h
246.9916	7.24	C ₈ H ₈ O ₇ S	4-O-sulfato de ácido vanílico	123/124/68/129	1 h
329.0877	8.64	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	Hidroxitirosol glucuronido isómero 1	123/95/59/113/153	0.5 h
329.0876	8.92	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	Hidroxitirosol glucuronido isómero 2	123/153/59/87/113	1 h
343.1032	10.13	C ₁₅ H ₂₀ O ₉	Alcohol homovanílico glucuronido isómero 1	113/152	1 h
243.0870	10.55	C ₁₁ H ₁₆ O ₆	Ácido elenólico hidrogenado	149/181	1 h
343.1032	11.04	C ₁₅ H ₂₀ O ₉	Alcohol homovanílico glucuronido isómero 2	133/153/113	1-2 h
275.0230	12.57	C ₁₀ H ₁₂ O ₇ S	Sulfato de acetato de hidroxitirosol	59/61/195	0.5-1 h
243.0871	13.77	C ₁₁ H ₁₆ O ₆	Treo-siringoilglicerol	44/170/99	1 h
555.1717	13.88	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₄	Derivado 2 de oleuropeína aglicona	113/59/149	1 h
571.1663	13.95	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₅	Derivado 1 de oleuropeína aglicona	-	1 h
553.1558	14.02	C ₂₅ H ₃₀ O ₁₄	Oleuropeína aglicona glucuronido 1	-	0.5-1 h
555.1713	14.04	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₄	Derivado 2 de oleuropeína aglicona	175/113/149	0.5-1 h
553.1556	14.17	C ₂₅ H ₃₀ O ₁₄	Oleuropeína aglicona glucuronido 2	113	0.5 h
555.1711	14.96	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₄	10-Hidroxioleuropeína	-	0.5 h
577.1535	14.97	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	Apigenina 7-O-rutinósido	-	0.5 h
555.1713	15.29	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₄	10-Hidroxioleuropeína	-	0.5 h
569.1872	15.42	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₄	Metoxioleuropeína	-	1 h

Conclusiones

En conclusión, los resultados preliminares de este estudio han demostrado la **presencia de, al menos, 18 diferentes metabolitos en las muestras de plasma** relacionados con la ingesta del suplemento estudiado. Muchos de estos metabolitos se generan a partir de **reacciones de fase I y de fase II**, que tienen lugar principalmente en el intestino delgado, de ahí su **rápida absorción**, con máximos entre 0.5 y 2 horas después de la ingesta.

Con los prometedores resultados obtenidos, el proyecto continuará con la búsqueda de nuevos metabolitos minoritarios de interés, mediante la disminución del umbral de FC a 20. Incluso, otra de las perspectivas de futuro es el aislamiento de los metabolitos encontrados a través de varios enfoques (estándar comercial, síntesis química o purificación), para la posterior evaluación de la bioactividad utilizando modelos *in vitro*, tal como se muestra en la figura de la Introducción.

Agradecimientos

La autora Patricia Fernández Moreno desea agradecer al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades por los fondos aportados al proyecto "Una innovadora aproximación metabolómica inductiva para la identificación de metabolitos derivados de polifenoles de la dieta y sus dianas moleculares, POLYMEALTH (RTI2018-096724-B-C22)", dentro del que han sido obtenidos los resultados reflejados en este póster.

Referencias

- [1] Charoenprasert, S. *et al.* Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea Europaea*). *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60 (29), 7081–7095.
- [2] Karakaya, S. *et al.* Olive Tree (*Olea Europaea*) Leaves: Potential Beneficial Effects on Human Health. *Nutr. Rev.* **2009**, 67 (11), 632–638.
- [3] Garcia-Aloy *et al.* Exploratory Analysis of Commercial Olive-Based Dietary Supplements Using Untargeted and Targeted Metabolomics. *Metabolites.* **2020**, 10 (12), 1–26. (57).
- [4] García-Villalba *et al.* Bioavailability of Phenolics from an Oleuropein-Rich Olive (*Olea Europaea*) Leaf Extract and Its Acute Effect on Plasma Antioxidant Status: Comparison between Pre- and Postmenopausal Women. *Eur. J. Nutr.* **2014**, 53 (4), 1015–1027.
- [5] The Metabolites Innovation Centre. Human Metabolome Data Base (HMDB). <https://hmdb.ca/metabolites>.