



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

L'àcid maslínic: de fitoalexina a nutracèutic?

M. Emília Juan i Joana M. Planas

Departament de Fisiologia & INSA,
Universitat de Barcelona



GRUP DE FISIOLOGIA I
NUTRICIÓ EXPERIMENTAL

Barcelona, 3 de novembre de 2015



**Recerca en els efectes
beneficiosos**

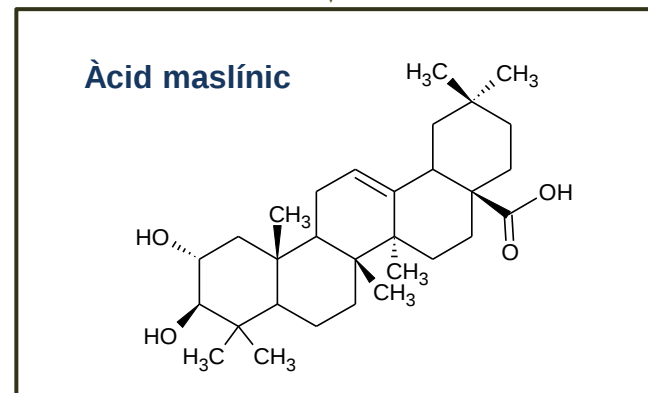
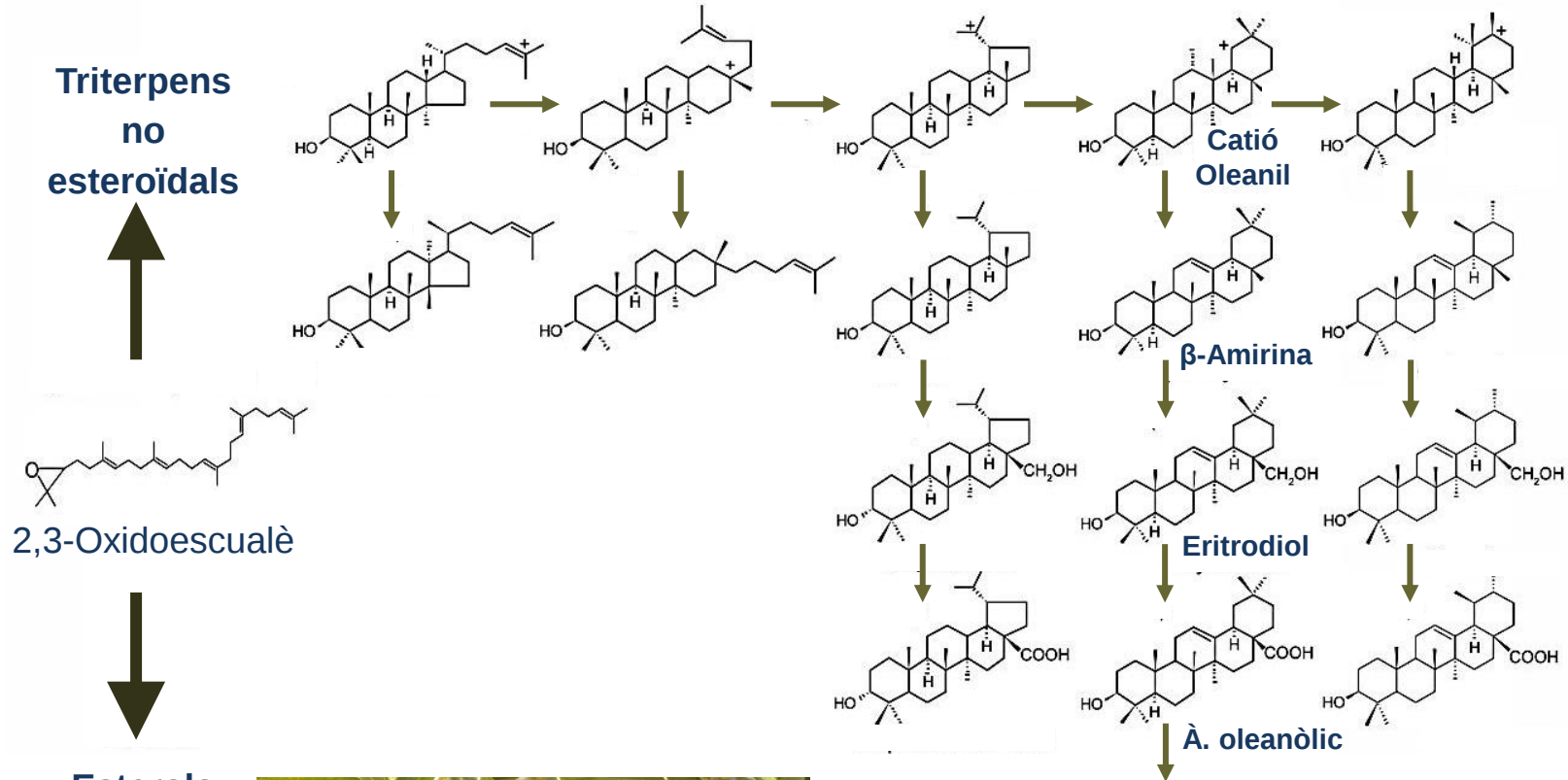
Nutrients

No-Nutrients

Compostos bioactius

**Milloren el benestar físic i mental
Redueixen el risc de sofrir
malalties**

Àcid maslínic

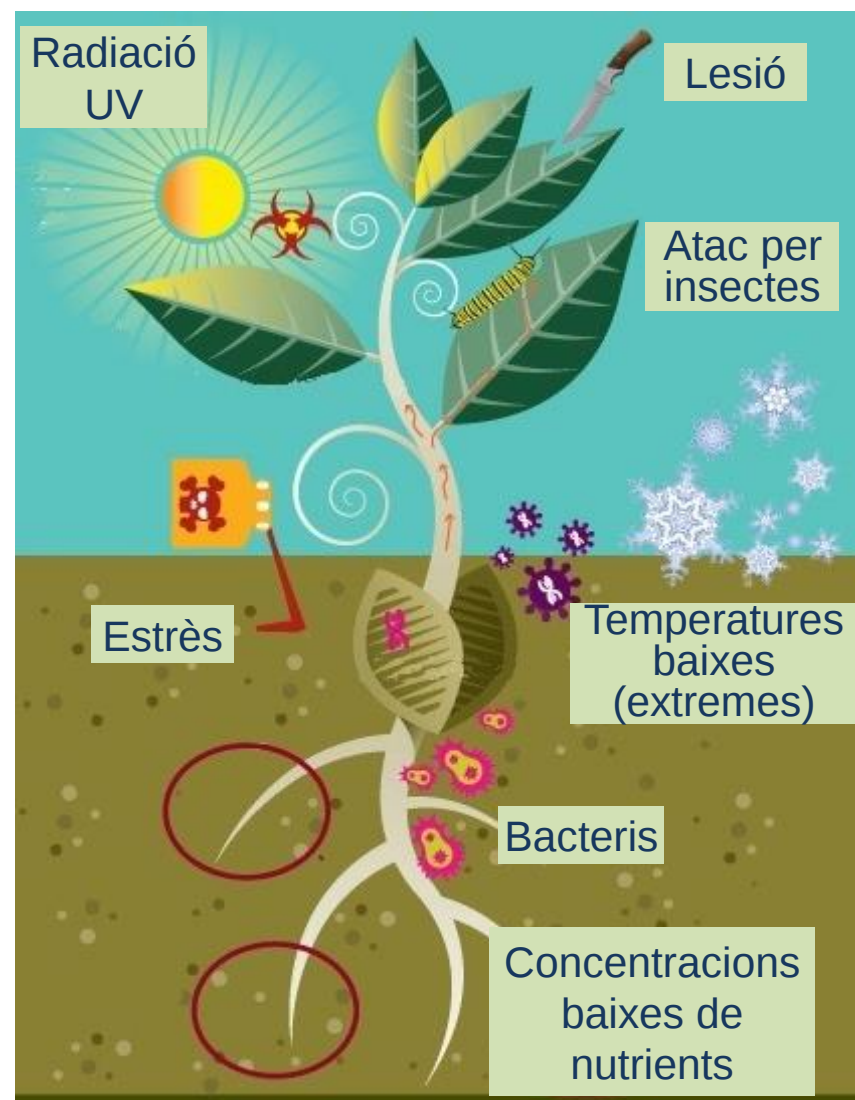


L'àcid maslínic al mon vegetal

L'àcid maslínic és sintetitzat en nombroses espècies vegetals com un compost no nutritiu amb activitat protectora en front:

- Estrés
- Lesió
- Infecció fúngica
- Radiació ultraviolada

Fitoalexina



Àcid maslínic

Espino blanco



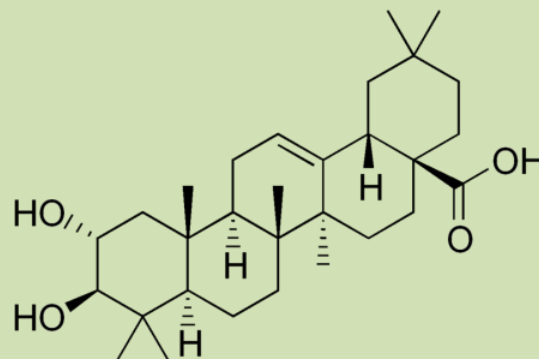
Crataegus oxyacantha L.



Banaba



Ácid maslínico (MA)
Ácido cratególico



Ácido 2 α ,3 β -dihidroiolean-12-en-28-oico

Olea europaea L.



Ácid maslínic



61,9 mg/kg
Kalogeropoulos *et al.* (2011)

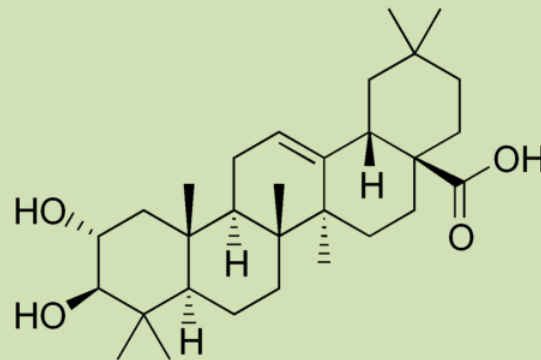


287 – 1318 mg/kg
Romero *et al.* (2010)

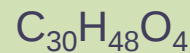


10,76 mg/kg
Li *et al.* (2011)

Ácid maslínico (MA) Ácido cratególico



Ácido 2α,3β-dihidroxiolean-12-en-28-oico



145 – 251 mg/kg
Pérez-Camino y Cert
(1999)



1,18 mg/kg
Li *et al.* (2011)

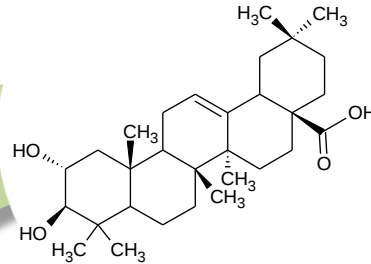


1260 mg/kg
Lin *et al.* (2011)



840 mg/kg
Lin *et al.* (2011)

Efectes biològics de l'àcid maslínic



Estimulant del creixement

Fernández-Navarro *et al.* (2006)
Fernández-Navarro *et al.* (2008)

Antitumoral

Juan *et al.* (2008)
Reyes-Zurita *et al.* (2011)
Villar *et al.* (2014)

Cardioprotector

Liu *et al.* (2007)
Hussain Shaik *et al.* (2012)

Antioxidant i antiinflamatori

Montilla *et al.* (2003)
Márquez-Martín *et al.* (2006)
Allouche *et al.* (2010)

Neuroprotector

Qian *et al.* (2011a)
Qian *et al.* (2011b)

Antidiabètic

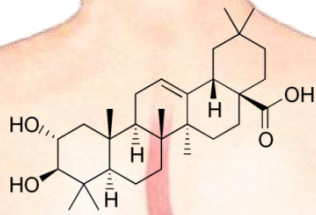
Wen *et al.* (2005)
Liu *et al.* (2007)

Antiparasitari

De Pablos *et al.* (2010)
Moneriz *et al.* (2011)

Ácid maslínic

Ácido maslínico



Digestión

Absorción y Metabolismo

Luz intestinal

Enterocito

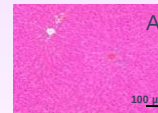
Enterocito

Sangre

Biodisponibilidad

Toxicidad

- Magnitudes hematológicas y bioquímicas
- Estudio histopatológico de los órganos vitales



Distribución y eliminación



Efectos biológicos

Cáncer de colon



TOXICIDAD AGUDA

Ratones

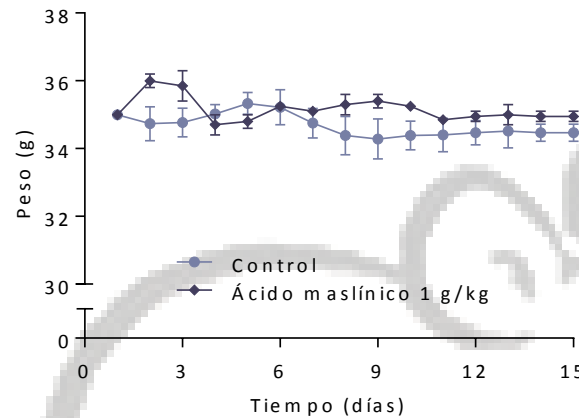
1 g/kg

Única

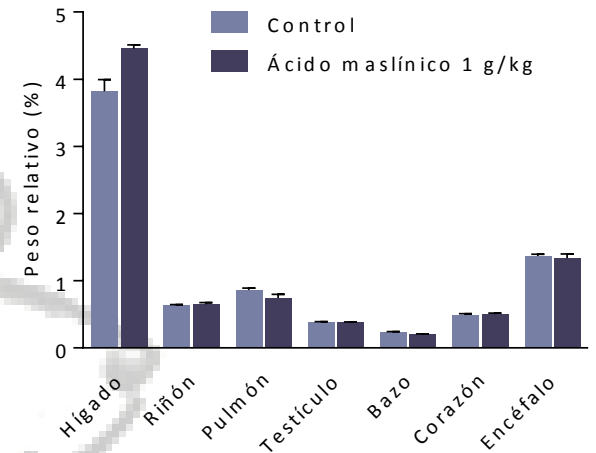
Vía oral



Peso corporal



Peso relativo de los órganos

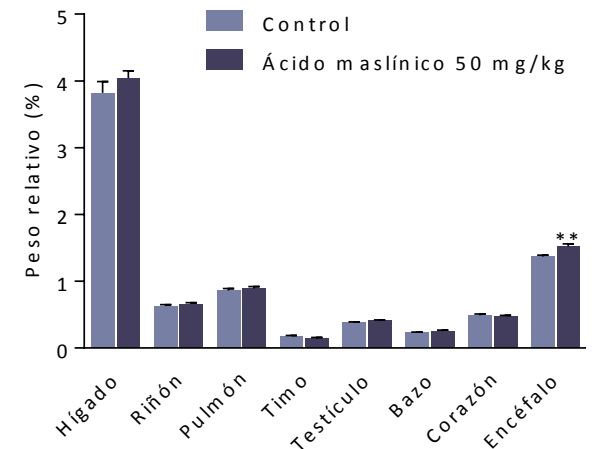
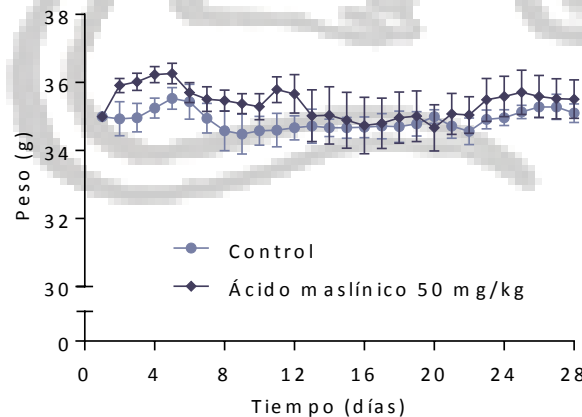


TOXICIDAD SUBAGUDA

50 mg/kg

Repetida

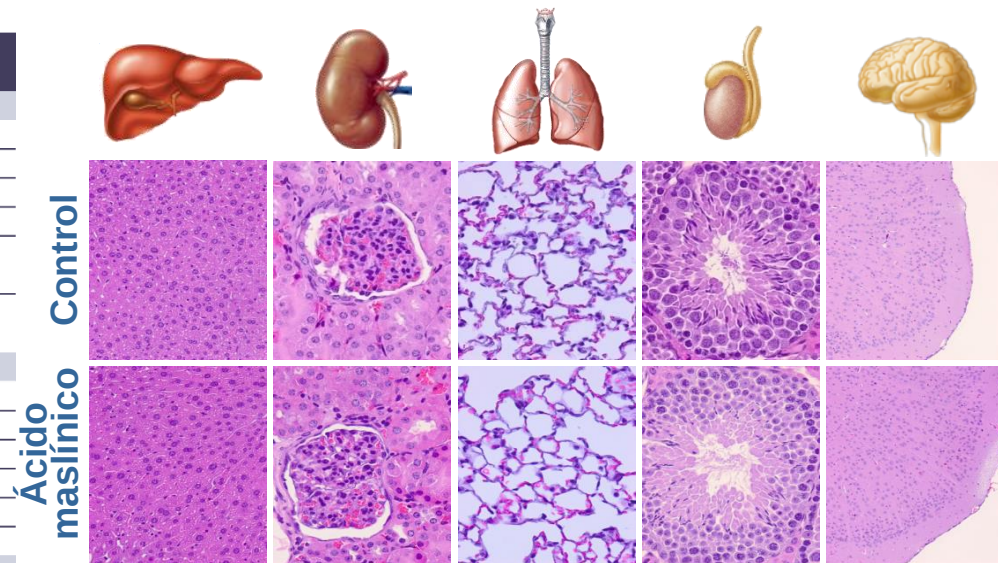
Vía oral



Estudi de la toxicitat

Variables hematològiques	Control	Àcido maslínico 50 mg/kg
Glòbuls rojos		
Hematocrito (%)	37,6 ± 0,8	40,0 ± 1,6
Eritrocitos (10 ¹² /L)	8,08 ± 0,13	8,55 ± 0,39
Volumen corpuscular medio (fL)	46,2 ± 0,7	46,8 ± 0,3
Hemoglobina (mM)	7,76 ± 0,12	8,25 ± 0,37
Hemoglobina corpuscular media (pg)	15,4 ± 0,2	15,5 ± 0,1
Concentració de hemoglobina corpuscular media (mM)	20,6 ± 0,06	20,6 ± 0,19
Glòbuls blancs		
Leucocitos (10 ⁹ /L)	3,52 ± 0,48	5,28 ± 1,03
Neutròfils (%)	13,6 ± 2,1	12,9 ± 2,2
Linfocitos (%)	83,5 ± 2,4	85,0 ± 2,6
Monocitos (%)	2,24 ± 0,74	1,52 ± 0,41
Eosinòfils (%)	0,22 ± 0,16	0,20 ± 0,18
Basòfils (%)	0,40 ± 0,11	0,32 ± 0,09
Plaquetes		
Plaquetes (10 ⁹ /L)	929 ± 102	980 ± 79
Volumen plaquetario medio (fL)	5,88 ± 0,68	5,32 ± 0,26

Variables bioquímicas	Control	Àcido maslínico 50 mg/kg
Glucosa (mM)	10,2 ± 1,6	9,20 ± 1,02
Colesterol (mM)	3,58 ± 0,22	3,38 ± 0,14
Triglicéridos (mM)	0,84 ± 0,11	1,20 ± 0,15
HDL (mM)	3,23 ± 0,17	2,96 ± 0,15
ALT (IU/L)	190 ± 58	206 ± 92
Bilirrubina (µM)	2,13 ± 0,18	2,08 ± 0,14
Creatinina (µM)	17,3 ± 1,8	12,9 ± 1,4
Sodio (mM)	154 ± 1	154 ± 1
Potassio (mM)	3,75 ± 0,16	4,34 ± 0,22
Cloruro (mM)	112 ± 2	112 ± 1



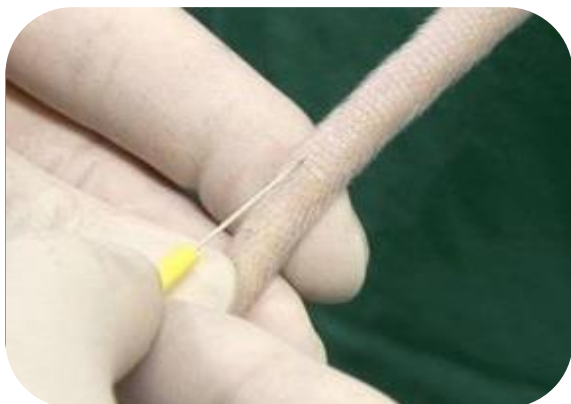
Ausencia de
efectos adversos

Administració i obtenció de mostres



Administració oral (50 mg/kg)

Solvent: 40 % ciclodextrina i
0,5% carboximetilcel·lulosa



Administració endovenosa (1 mg/kg)

Solvent: 20 % ciclodextrina i
0,5% carboximetilcel·lulosa



Vena safena

SANG

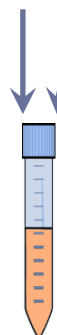


Mostra de sang
(0-24 hores)

Determinació de l'àcid maslínic

200 μ L plasma/orina

2 mL **acetat d'etil**



3 min



1500xg, 30 min, 4°C



Sobrenadant



Evaporació a sequedat



100 μ L **metanol 80%**



Reconstituïció
(vòrtex 30 s)

Segona extracció

Condicions HPLC

Columna Luna C18 en fase reversa, T = 40°C

Elució en gradient: aigua-acetonitril

Flux: 0.8 mL/min

Condicions MS

Font APCI at 500°C, mode negatiu

Àcid maslínic: m/z 471.3

Àcid betulínic: m/z 455.3



HPLC-MS

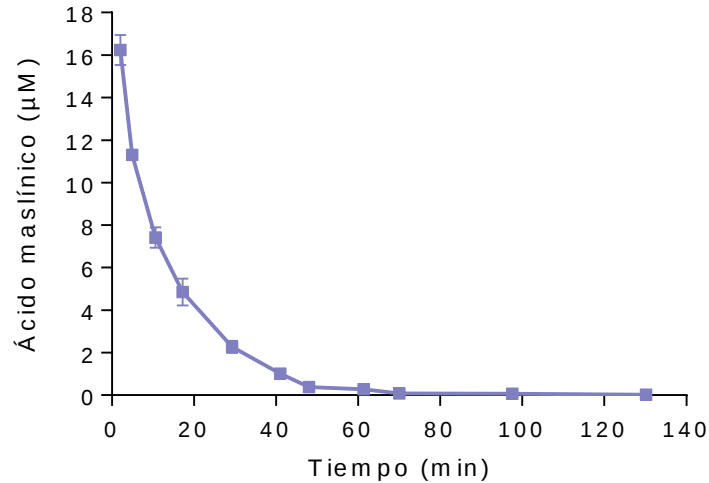
Sobrenadant



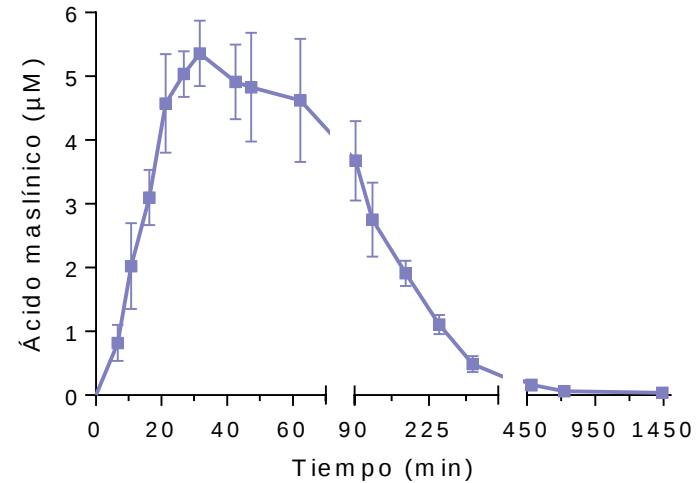
2500xg, 15 min, 4°C

Farmacocinética del ácido maslínico

Administración endovenosa



Administración oral



Parámetro	Unidades	Análisis no compartimental	Análisis compartimental
Concentración máxima (Cmax)	μM	5,36	4,03
Tiempo máximo (Tmax)	h	0,513	0,500
Área bajo la curva (AUC _{0-∞})	μmol·h/L	14,87	12,43
Tiempo medio de residencia (MRT)	h	4,60	3,68
Biodisponibilidad (F)	%	6,25	5,13
Constante de absorción (Ka)	1/h		0,519

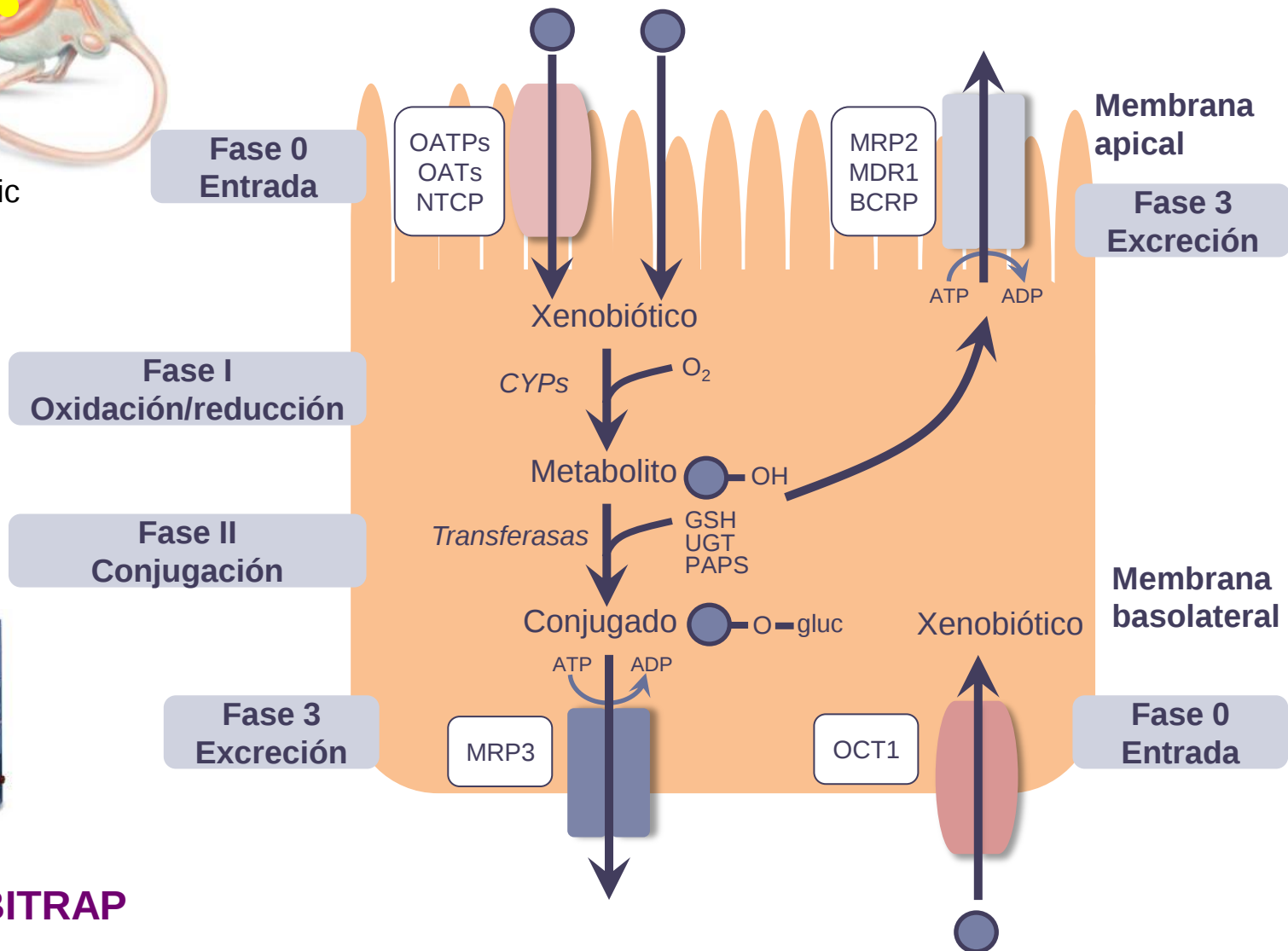
Metabolisme de xenobiòtics



- Àcid maslínic
- Metabòlits



HPLC-LTQ-ORBITRAP

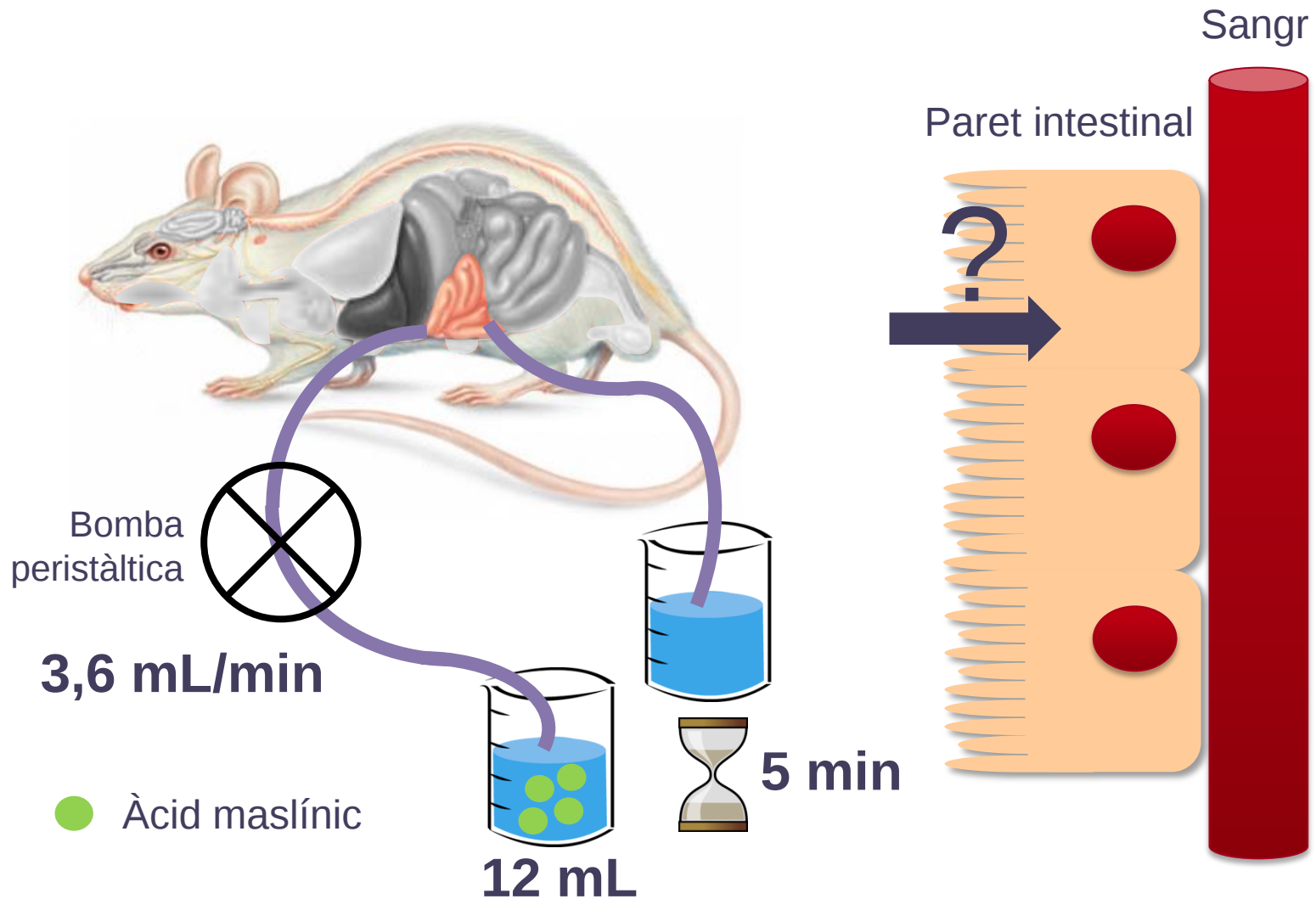


Metabolits de l'àcid maslínic

MODIFICACIÓ	COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN	m/z	LOCALIZACIÓN					
				PLASMA	ORINA	DUODENO Y YEYUNO	ÍLEON	CIEGO	COLON
(C ₃₀ H ₄₈ O ₄)	Ácido maslínico	9.22 min	471,3479	+	+	+	+	+	+
Hidroxilación (C ₃₀ H ₄₈ O ₅)	M1	4.39 min	487,3425	ND	ND	-	+	+	+
	M2	4.77 min	487,3426	+	+	-	+	+	+
	M3	5.33 min	487,3425	+	ND	-	+	-	+
	M4	6.61 min	487,3425	+	ND	-	-	-	-
	M5	7.13 min	487,3424	+	+	-	-	-	-
Hidroxilación + Dehidrogenación (C ₃₀ H ₄₆ O ₅)	M6	4.62 min	485,3273	ND	ND	-	-	+	+
	M7	5.38 min	485,3270	ND	ND	-	+	+	+
	M8	7.75 min	485,3271	+	+	-	-	-	+
Dihidroxilación (C ₃₀ H ₄₈ O ₆)	M9	3.34 min	503,3378	ND	ND	-	+	+	+
	M10	3.69 min	503,3375	ND	ND	-	-	+	+
	M11	3.98 min	503,3373	ND	ND	-	-	+	+
Dihidroxilación + Deshidrogenación (C ₃₀ H ₄₆ O ₆)	M12	3.39 min	501,3219	ND	ND	-	+	+	+
	M13	4.25 min	501,3216	+	+	-	-	+	+
	M14	4.63 min	501,3218	+	ND	-	-	-	+
Deshidrogenación (C ₃₀ H ₄₆ O ₄)	M15	4.75 min	469,3320	-	-	-	-	-	+

METABOLITOS DE FASE I

Absorció intestinal: perfusió

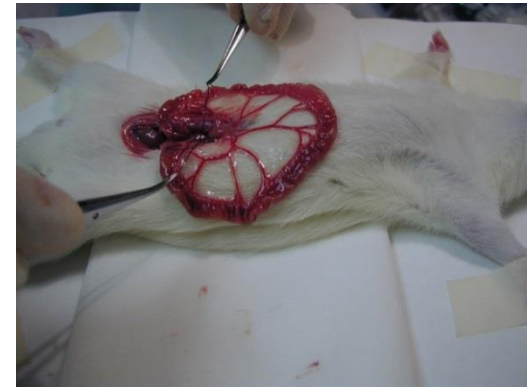


Absorció d'àcid maslínic

Anestèsia de la rata (ketamina 90 mg/kg i xilacina 10 mg/kg)



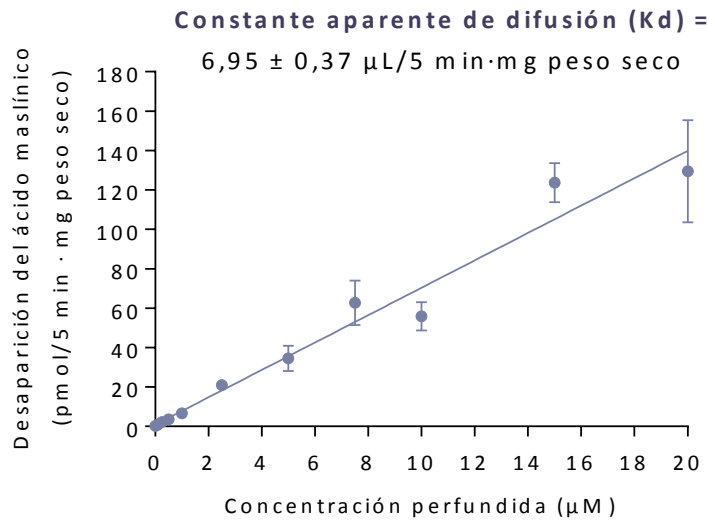
Laparotomia, selecció i canulació d'un segment de jeju (30 cm)



Perfusió de les solucions d'àcid maslínic (0,010 – 20 μ M)

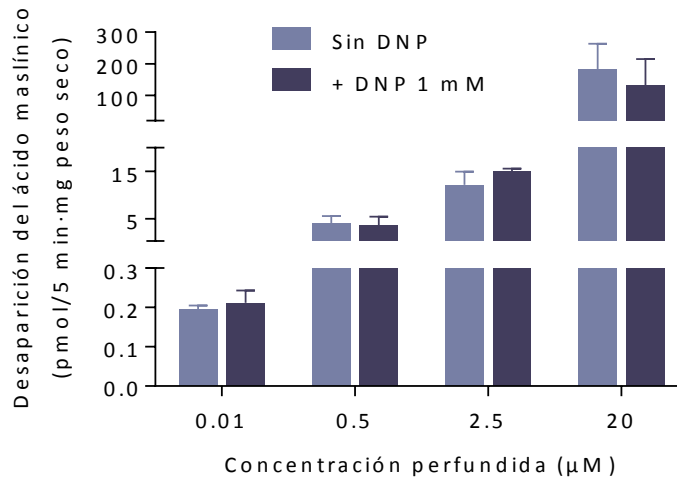


Absorció d'àcid maslínic



Absència de
transport
mediat

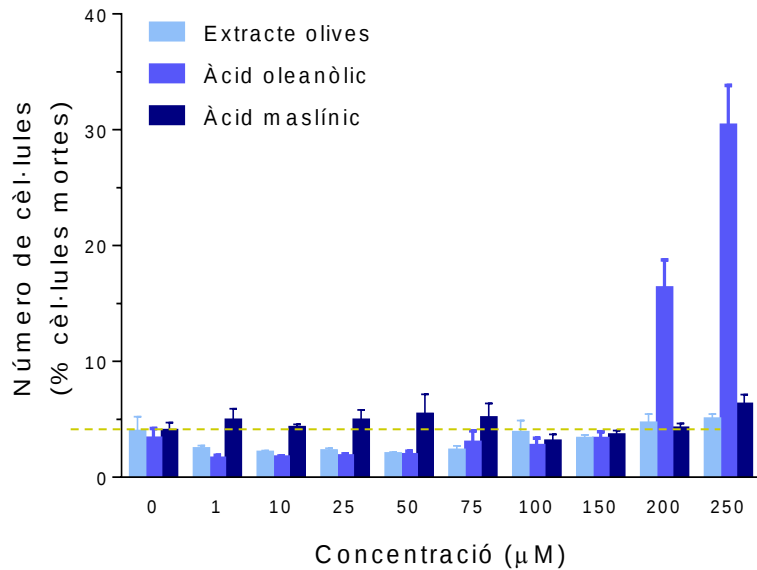
**DIFUSIÓ
SIMPLE**



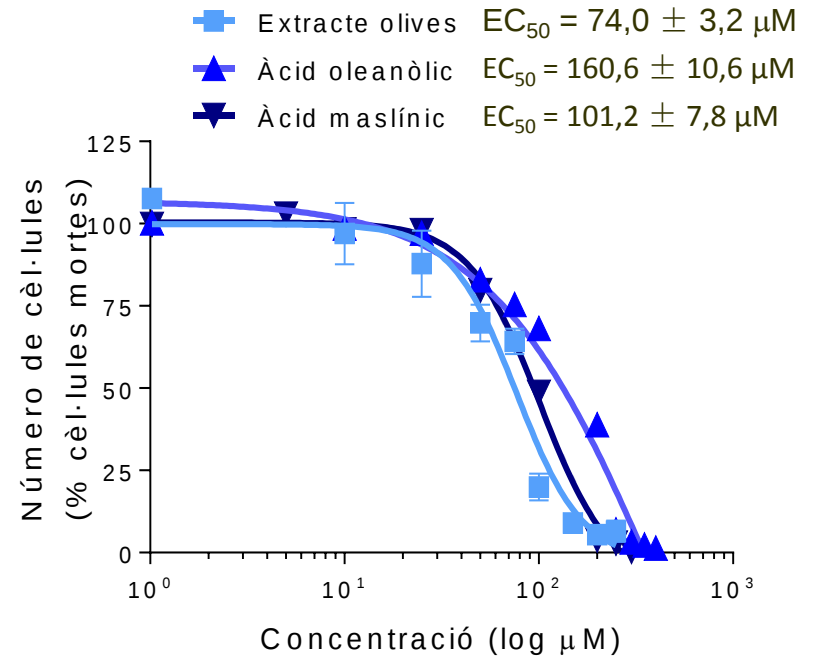
Absència de
transport
actiu

Efecto antitumoral *in vitro*

Citotoxicitat

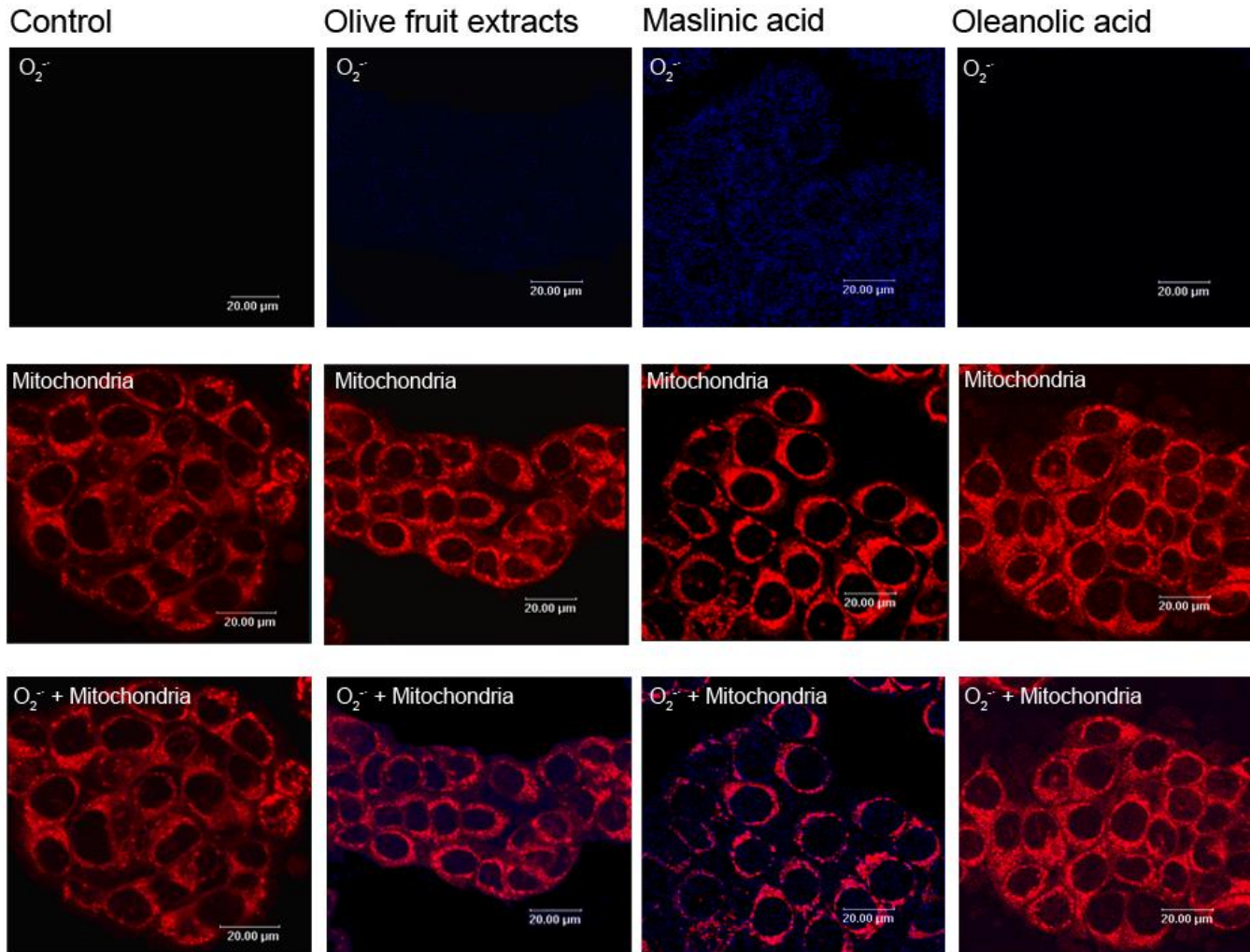


Proliferació



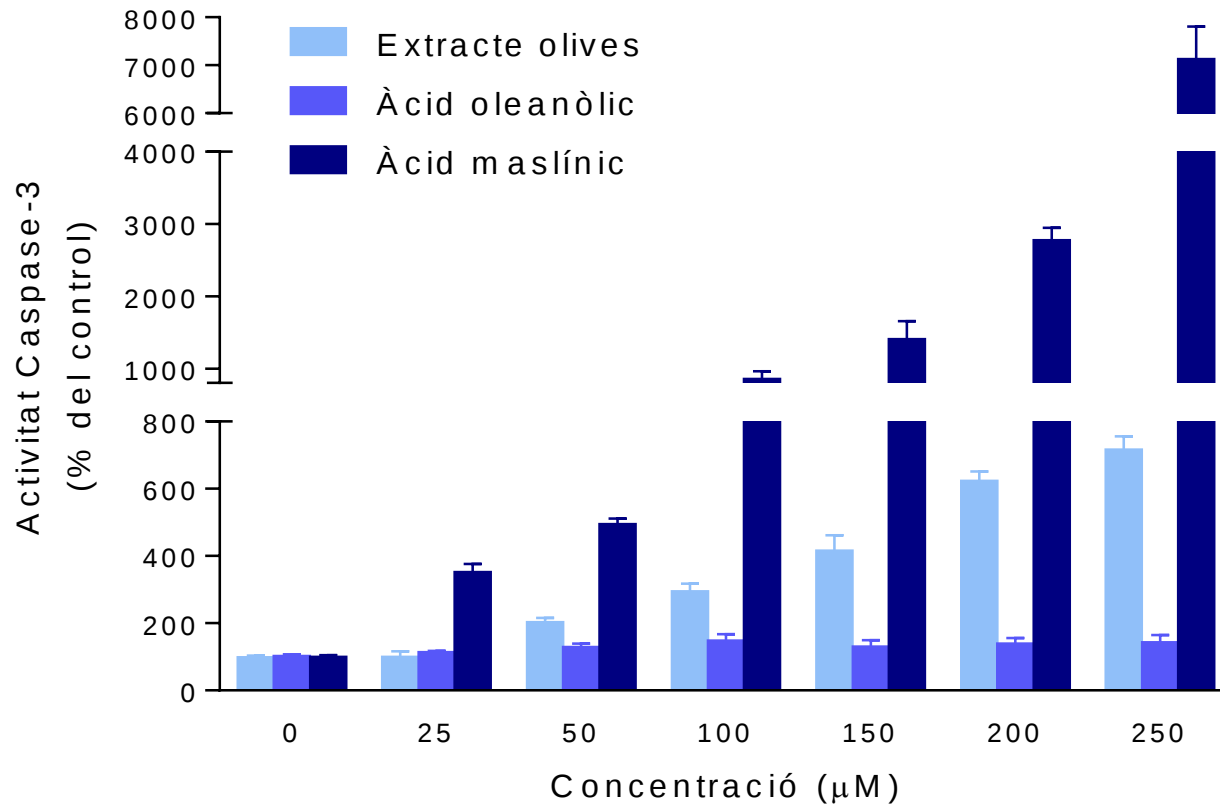
Efecto antitumoral *in vitro*

Efecte sobre les espècies reactives d'oxigen



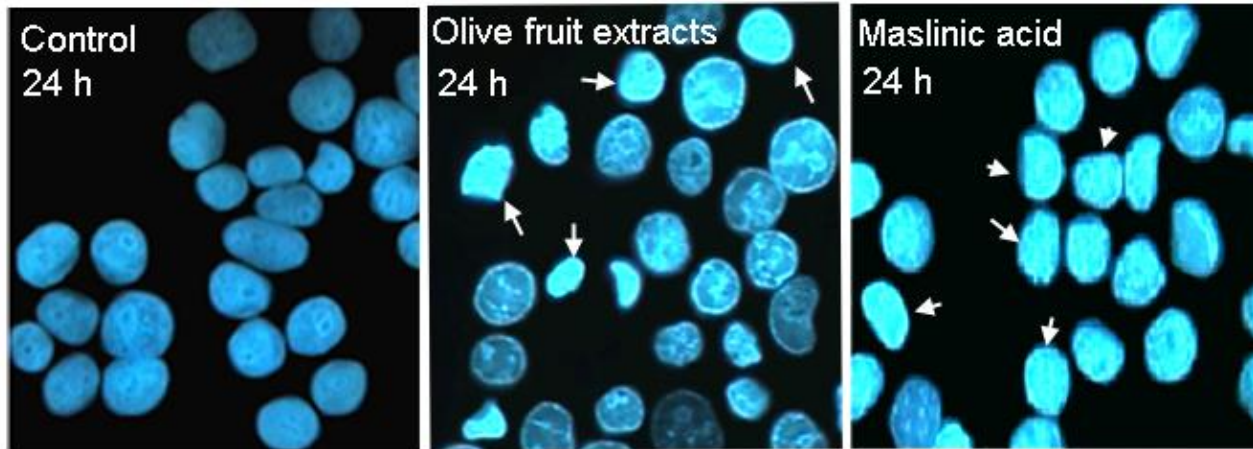
Efecto antitumoral *in vitro*

Caspasa-3

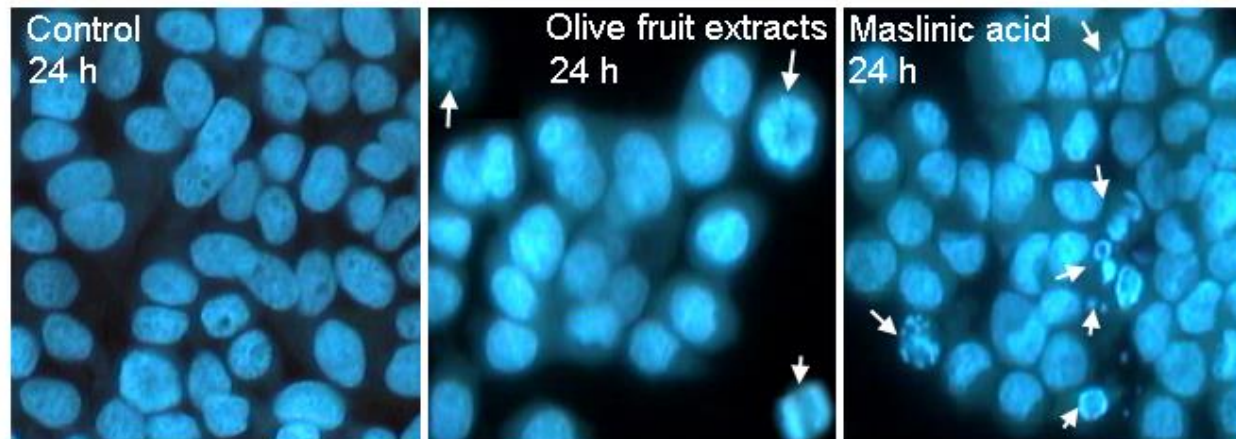


Efecto antitumoral *in vitro*

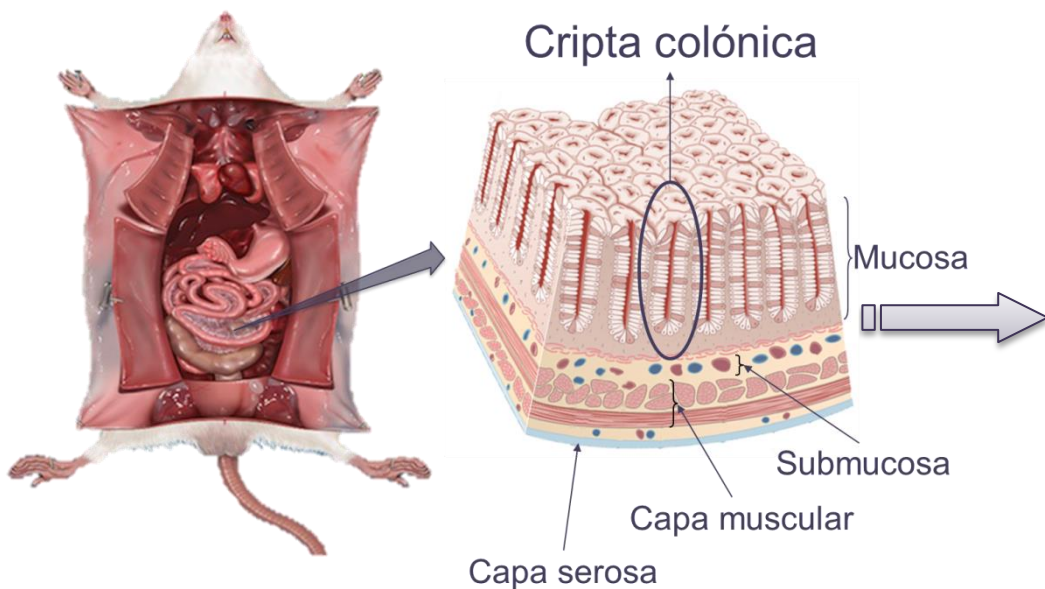
CANVIS EN LA PERMEABILITAT DE LA MEMBRANA (Hoechst 33342)



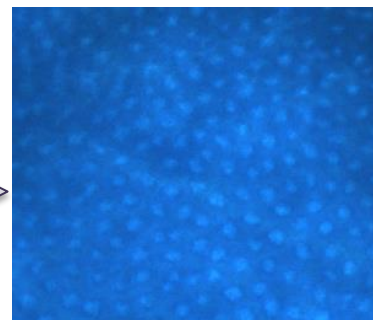
FRAGMENTACIÓ NUCLEAR (Hoechst 33258)



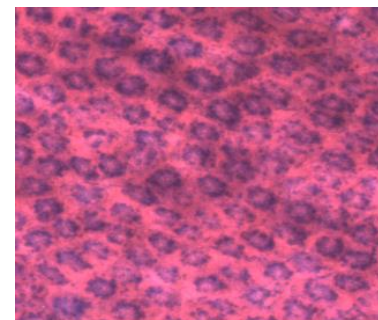
Model de càncer de còlon



Epiteli control



Tinció amb
blau de metilè
2 % en PBS



Tinció amb diamines/
ferro/ blau alcià

Esponatani

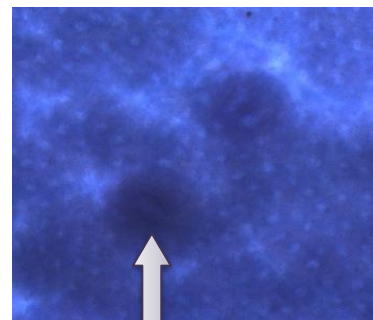
**Induïts
químicament o
per la dieta**



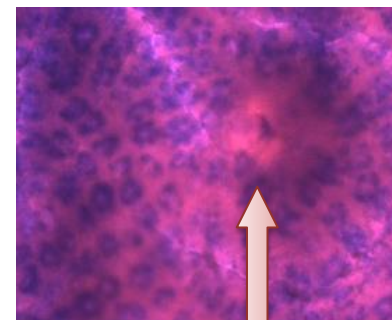
**Manipulació
genètica**



Lesiones preneoplàstiques



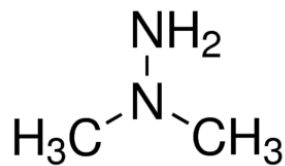
Focus de criptes
aberrants (FCA)



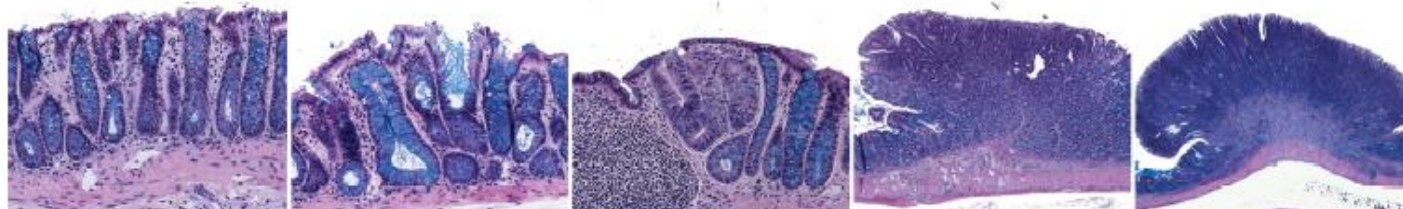
Focus amb depleció
de mucines (FDM)

Model de càncer de còlon

1,2-Dimetilhidrazina (DMH)



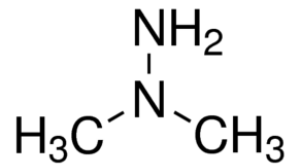
Inductor del càncer de colon
por la seva activitat alquilant del ADN



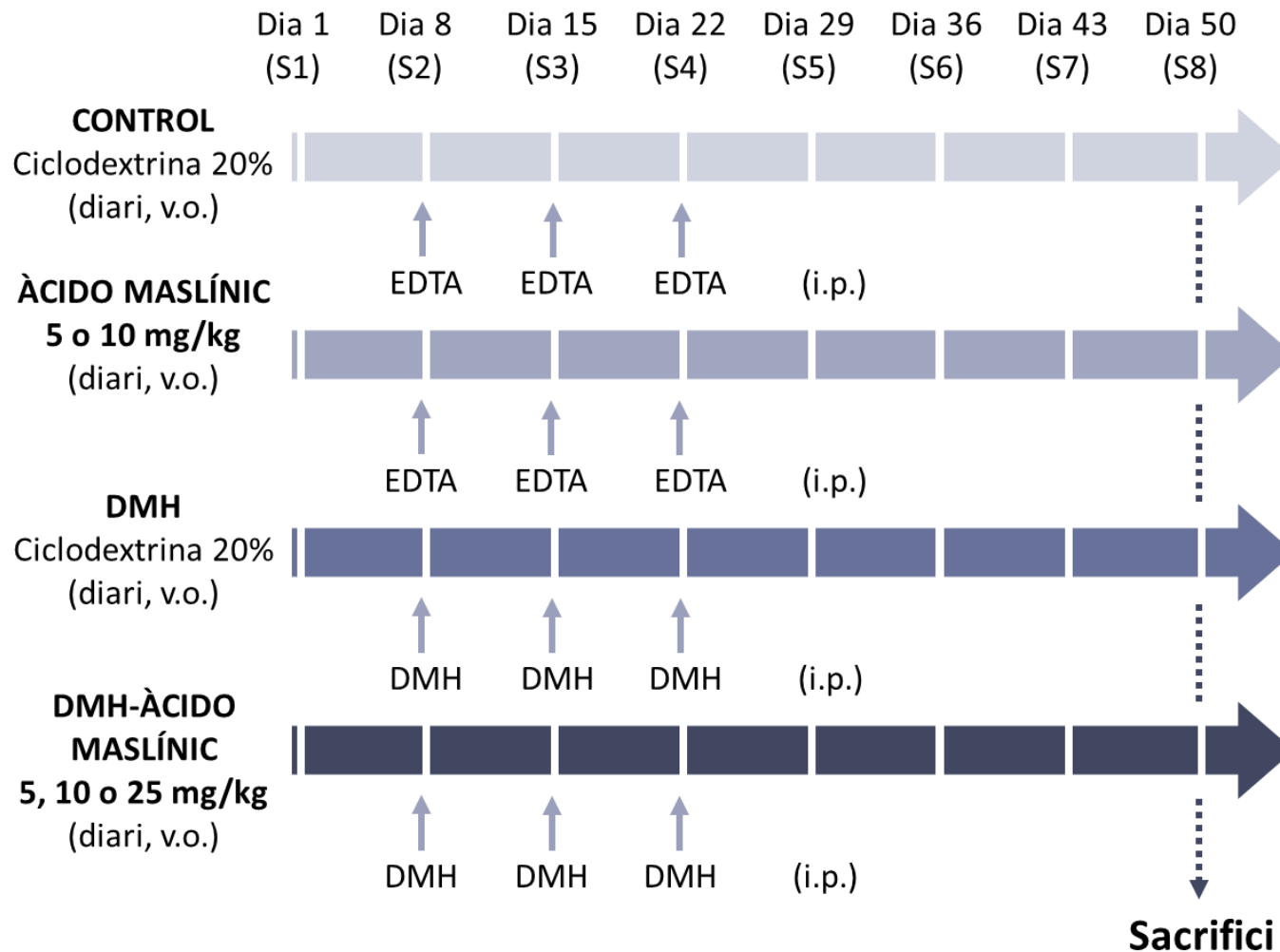
Intraperitoneal	
Dosis	20 mg/kg
Solvent	EDTA 1 mM pH 6.5
Volumen administrat	1 mL/kg
n	6 rates/grup

Disseny experimental

1,2-Dimetilhidrazina (DMH)



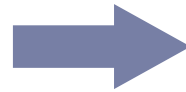
Inductor del càncer de colon
por la seva activitat alquilant del ADN



Disseny experimental



Obtención
del colon



Fijación

Proximal



Medial



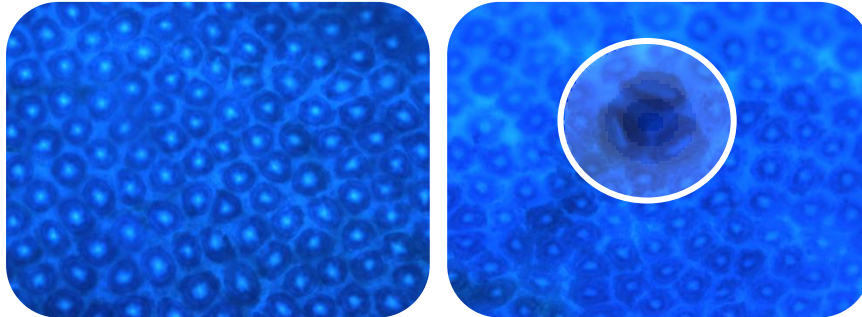
Distal



Formalina neutra
tamponada 10%

Observació de lesions preneoplàstiques

Tinció de blau de metilè

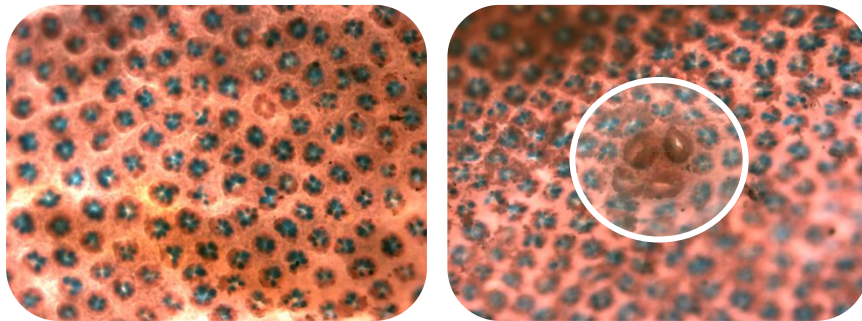


Focus de criptes aberrants (FCA)

Bird (1987)

- Major intensitat tinció
- Mida 2-3 cops més gran
- Solen estar mes elevades
- Presenten una obertura allargada

Tinció de diamines i ferro, blau alcià i vermell neutre



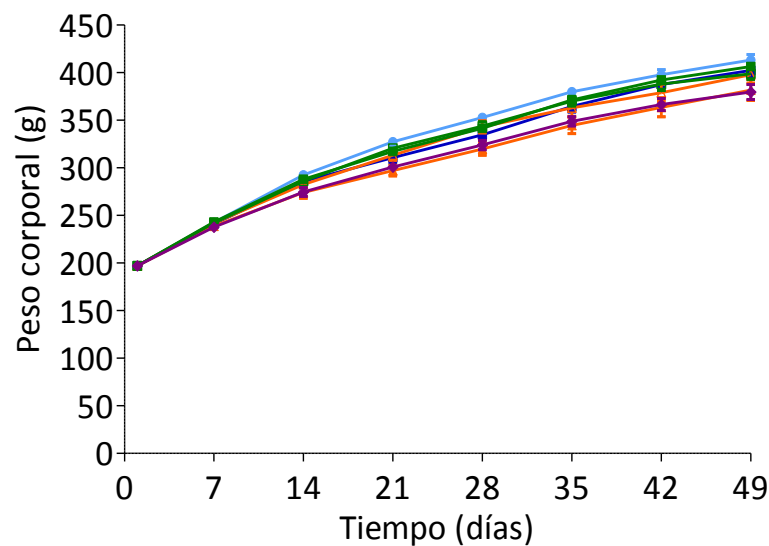
Focus de criptes amb depleció de mucines (FDM)

Caderni *et al.* (2003)

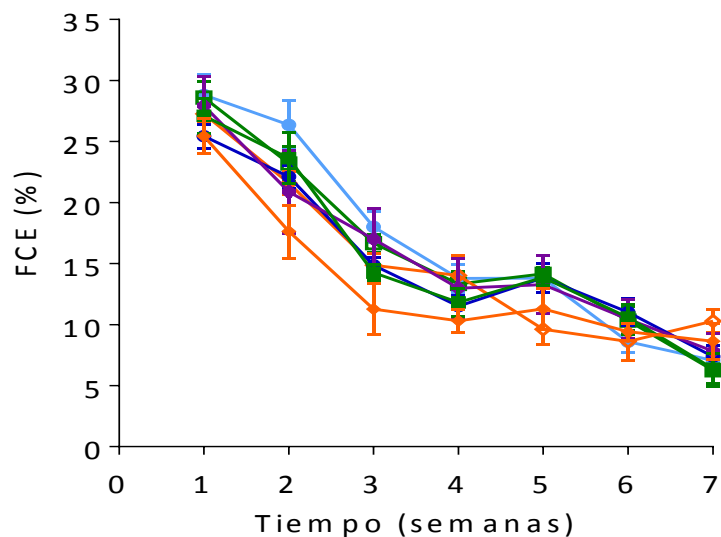
- Mida 2-3 cops més gran
- Solen estar mes elevades
- Presenten una obertura allargada
- Absència de mucines

Efecto del ácido maslínico

Pes

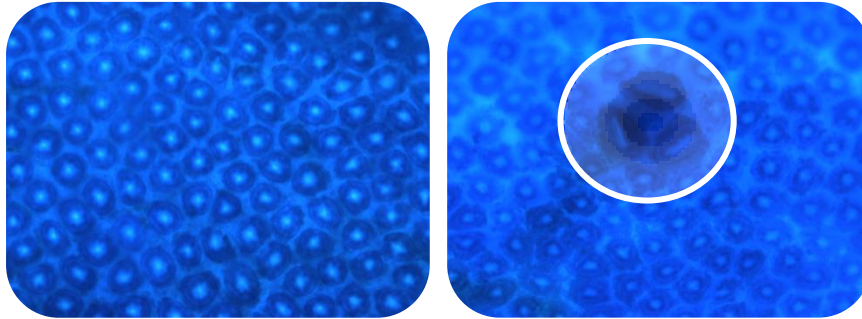


Taxa de
conversió
dels
aliments



Observació de lesions preneoplàstiques

Tinció de blau de metilè

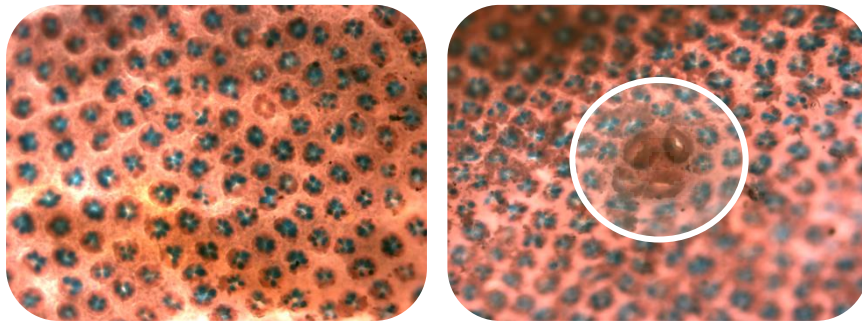


Focus de criptes aberrants (FCA)

Bird (1987)

- Major intensitat tinció
- Mida 2-3 cops més gran
- Solen estar mes elevades
- Presenten una obertura allargada

Tinció de diamines i ferro, blau alcià i vermell neutre

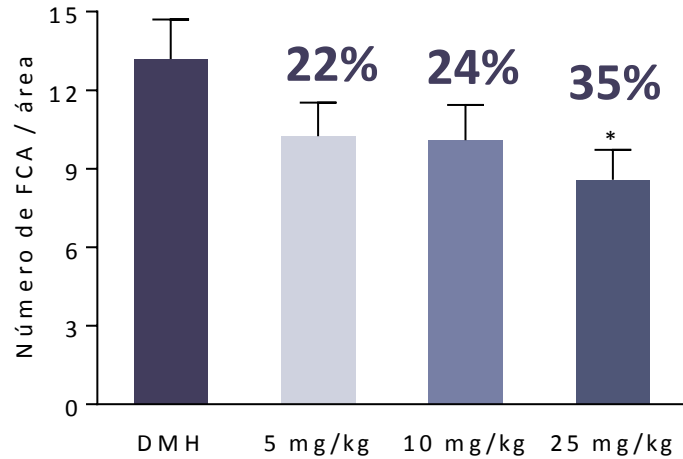
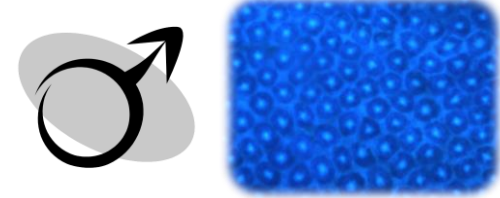


Focus de criptes amb depleció de mucines (FDM)

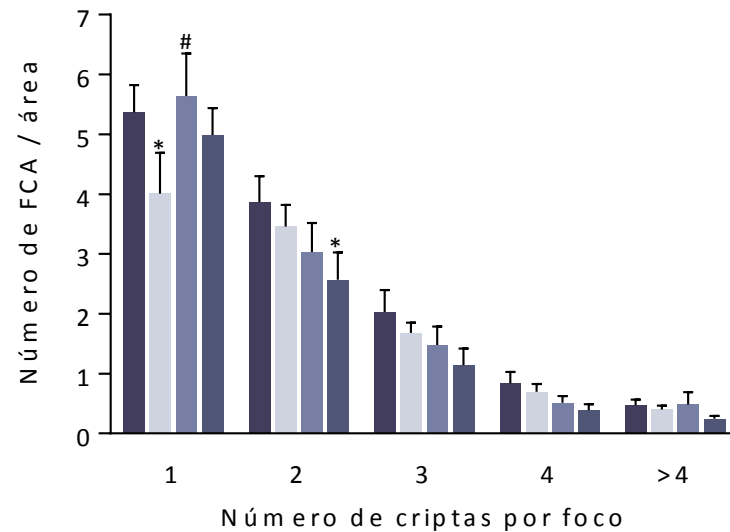
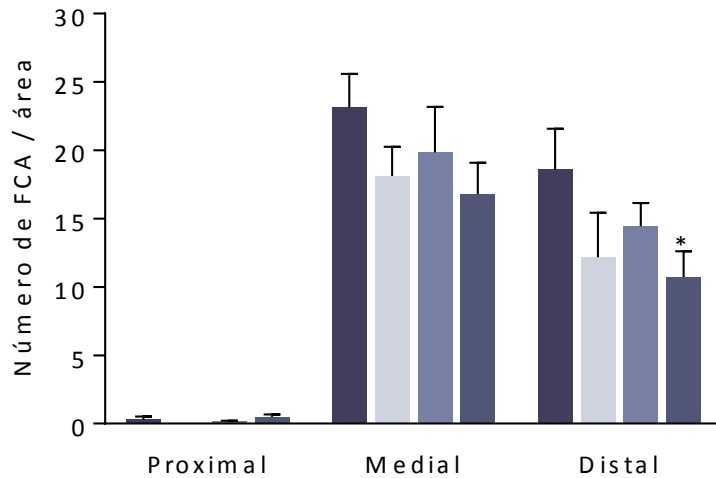
Caderni *et al.* (2003)

- Mida 2-3 cops més gran
- Solen estar mes elevades
- Presenten una obertura allargada
- Absència de mucines

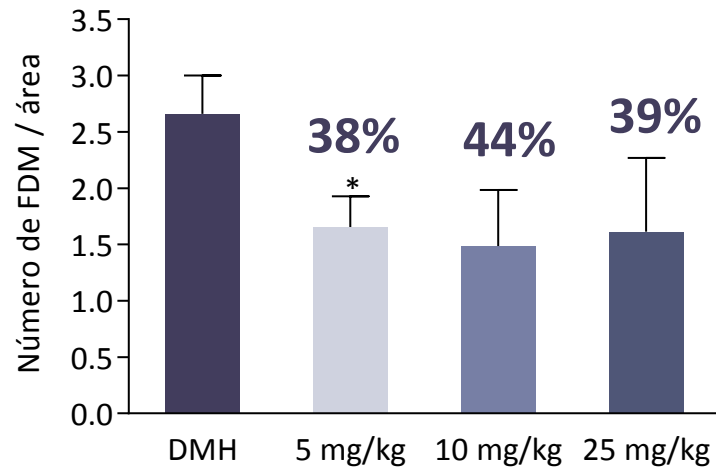
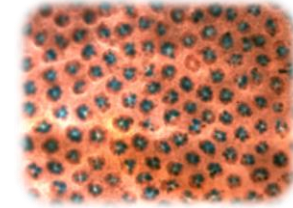
Efecte de l'àcid maslínic



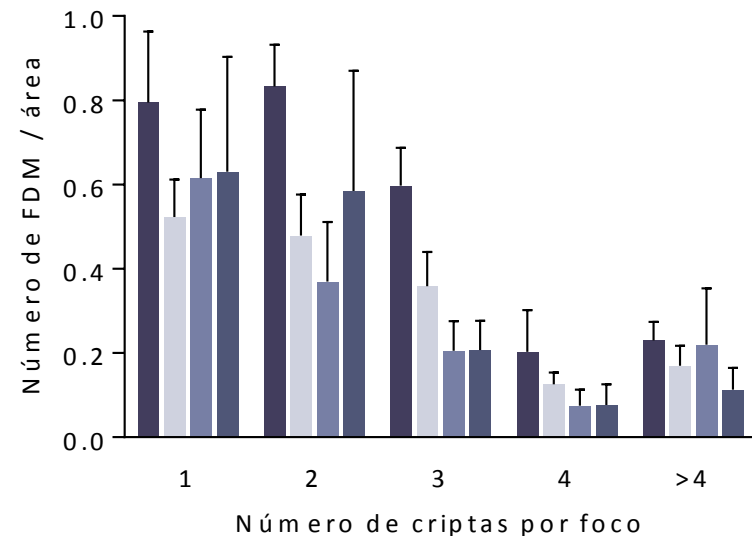
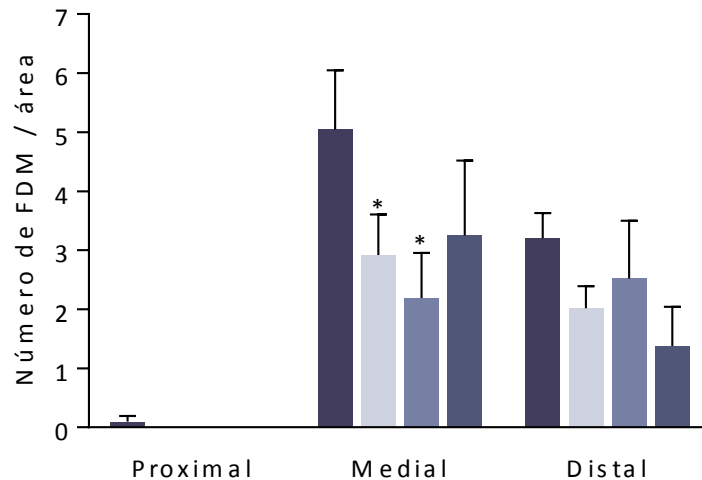
- DMH
- DMH – Àcid maslínic 5 mg/kg
- DMH – Àcid maslínic 10 mg/kg
- DMH – Àcid maslínic 25 mg/kg



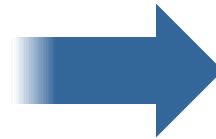
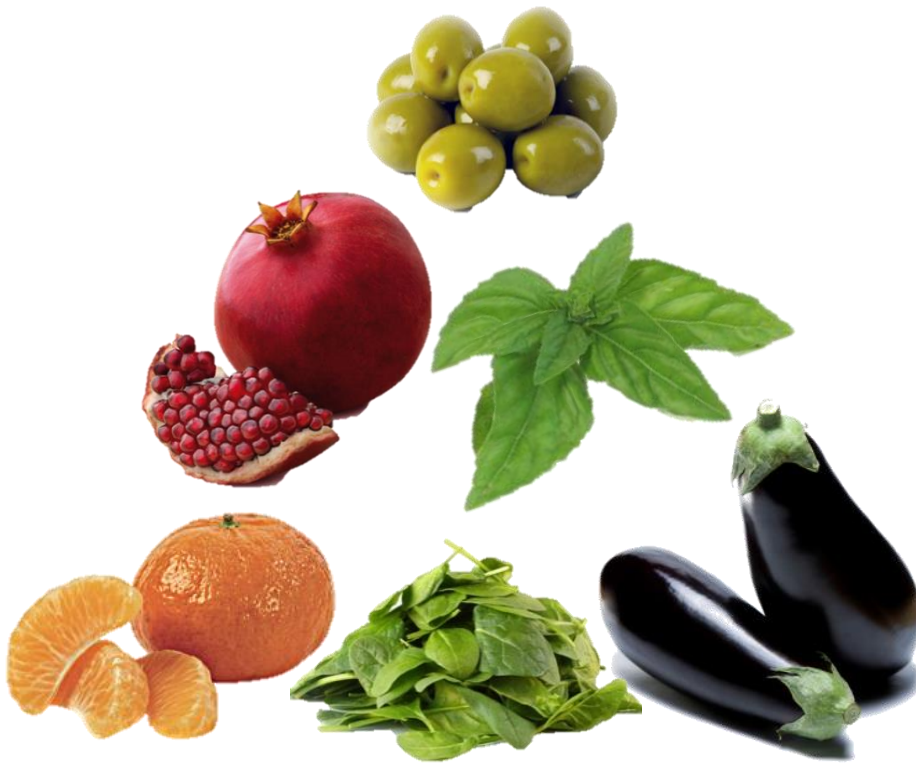
Efecte de l'àcid maslínic



- DMH
- DMH – Àcid maslínic 5 mg/kg
- DMH – Àcid maslínic 10 mg/kg
- DMH – Àcid maslínic 25 mg/kg



De un componente bioactivo... ...a un nutraceutico?



Agraïments

**Grup de Fisiologia i Fisiopatologia
Nutricionals
(Departament de Fisiologia)**



Joana M. Planas
M. Emília Juan
Marta Sánchez
Glòria Lozano



**Unitat de Biofarmàcia i Farmacocinètica
(Departament de Farmàcia
i Tecnologia Farmacèutica)**

Helena Colom



**Espectrometria de masses
Centres Científics i Tecnològics – UB**

Olga Jáuregui
Isidre Casals

**Servei d'Experimentació Animal
(Facultat de Farmàcia)**

**Anàlisis Clíniques
CAP Just Oliveras
(Hospitalet de Llobregat)**

**AGL2009-12866 y AGL2013-41188-R Ministerio de Economía y Competitividad
2009-SGR-00471 y 2014-SGR-1221 Generalitat de Catalunya**