



GUÍA DEL PROYECTO Y RESULTADOS





SUMARIO

Cooperativas Agroalimentarias de Granada 3

CIDAF + Deretil Nature 5

Universidad de Granada 8

COOPERATIVAS AGROALIMENTARIAS DE GRANADA

Cooperativas Agroalimentarias de Andalucía-Granada participa activamente en este proyecto, siendo responsable de la divulgación del mismo. Junto con el resto de miembros del GO, al inicio del proyecto se establecieron los objetivos estratégicos del Plan de Comunicación, perfilando las herramientas que emplearíamos para alcanzar estos objetivos.

Básicamente, nuestra misión ha consistido en la difusión del proyecto, con estos tres objetivos fundamentales:

- 1.- Difundir los retos que plantea el proyecto como experiencia innovadora de investigación para desarrollar una serie de herramientas mediante diferentes tecnologías para potenciar el aprovechamiento de subproductos del olivar.
- 2.- Comunicar a los profesionales del sector agrario las ventajas económicas y medioambientales de la incorporación de nuevas prácticas agrarias que avancen hacia un uso más sostenible de los subproductos.
- 3.- Dar visibilidad y generar demanda entre el sector agrario de métodos de producción más sostenibles y respetuosos con el medio ambiente.

Las acciones de divulgación han estado dirigidas a estos públicos de interés:

- Administraciones, entidades públicas y empresas privadas, de ámbito andaluz, que estén vinculadas con el sector agroalimentario.
- Sector investigador y tecnológico (Universidades, centros de investigación y centros tecnológicos...)
- Productores agrícolas
- Agentes dinamizadores del territorio (Grupos de Desarrollo Rural y otros)
- Entidades financiadoras públicas y privadas
- Ciudadanía en general

Plan de Comunicación

Para difundir este proyecto se diseñó un Plan de Comunicación con los objetivos generales y la naturaleza del proyecto, mensajes a transmitir, grupos de interés del proyecto, herramientas y recursos necesarios para realizar la difusión y el periodo de duración de la misma.

Imagen de Proyecto

Se diseñó un logotipo y rollup con la imagen del proyecto. Se creó la página web www.ecobiolivo.es, un perfil en distintas redes sociales como Facebook, Instagram, Twitter, Youtube. Así mismo, se grabó, editó y difundió un video explicativo del proyecto con los objetivos, miembros y fases de la investigación.

Gabinete de Prensa

El Gabinete de Prensa ha redactado material divulgativo del proyecto, además de notas de prensa, informes y entrevistas a lo largo de los dos años de divulgación.

Publicidad en Medios

Para conseguir llegar a distintos públicos especializados, se han realizado inserciones publicitarias en distintos medios de comunicación como la revistas especializada Vida Rural.

Jornadas informativas

Además, se organizó una jornada informativa de presentación del proyecto, dirigida a entidades del ámbito científico, tecnológico y agroalimentario en la sede de Cooperativas Agroalimentarias de Granada, el 19 de diciembre de 2024, donde se entregó un díptico que también diseñó e imprimió la entidad.



Obtención de extractos de subproductos de olivo enriquecidos en compuestos bioactivos con actividad antiinflamatoria (CIDAF + DERETIL)

• Extracción y microencapsulación de compuestos bioactivos de subproductos del olivo

El proceso de extracción de compuestos fenólicos de hoja de olivo se realizó por extracción sólido-líquido bajo un diseño experimental factorial 22 “compuesto central más punto axial” de 12 tratamientos (Figura 1), utilizando como variables independientes: 1) la composición del disolvente (utilizando disolventes de grado alimentario etanol y agua), y 2) la temperatura de extracción. Las variables dependientes utilizadas fueron: 1) el contenido de fenoles totales, 2) la capacidad antioxidante medida por el método FRAP y 3) la capacidad antiinflamatoria mediante el análisis de COX-2. Se realizó una optimización de las variables analizadas maximizando las variables respuesta de manera conjunta por metodología de superficie respuesta (MSR).

Los resultados encontrados en cuanto a rendimiento y eficiencia de encapsulación variaron en función del extracto y del agente encapsulante utilizado. Las pruebas iniciales de microencapsulación por spray drying utilizaron los extractos HT20S y OE35S con 2 polímeros: Maltodextrina e inulina (Figura 2).



Figura 1. Fotografía de los distintos extractos del diseño experimental realizado para la optimización de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos de hoja de olivo.

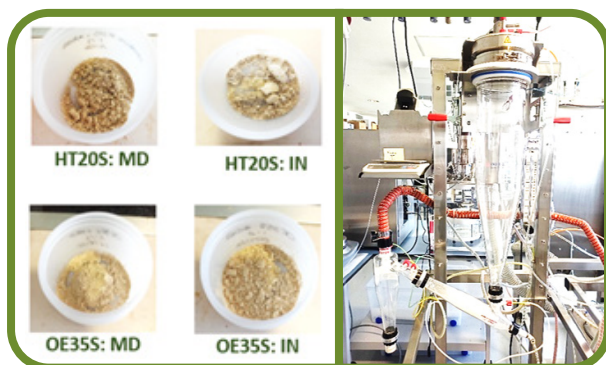


Figura 2. Imágenes de la encapsulación de los extractos con sus agentes encapsulantes.

• Evaluación del potencial antiinflamatorio in vitro de los extractos de subproductos del olivo

Para evaluar el potencial antiinflamatorio de los extractos se seleccionó el ensayo de inhibición de una de las principales enzimas involucradas en el proceso de inflamación (ciclooxigenasa-2 (COX-2) mediante un ensayo fluorimétrico. Se realizó empleando un kit comercial (Merck, MAK399), con ligeras modificaciones.

- **Caracterización cualitativa y cuantitativa de la composición de los extractos con mayor potencial bioactivo mediante HPLC-MS**

Se llevó a cabo la puesta a punto de un método de análisis apropiado para llevar a cabo la caracterización exhaustiva de los extractos generados en tareas anteriores, cuantificando los compuestos mayoritarios y en especial los compuestos bioactivos previamente descritos en bibliografía. Para realizar dicho análisis se utilizó la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF-MS). Se llevó a cabo la puesta a punto del método de análisis para la fracción fenólica y terpénica de los diferentes extractos de hoja de olivo, seleccionando las condiciones y parámetros cromatográficos y de detección idóneos para el análisis de dichos analitos.

- **Selección de las condiciones óptimas de extracción y microencapsulación para el escalado de la producción**

Una vez evaluadas todas las variables respuesta en cada uno de los puntos del diseño, se llevó a cabo la optimización de las condiciones de extracción. Se analizó la adecuación del modelo propuesto mediante análisis de varianza (ANDEVA) en un intervalo de confianza del 95%. Los resultados obtenidos demuestran que las condiciones de extracción optimizadas permiten extraer los compuestos fenólicos desde las hojas de olivo con un uso potencial para el desarrollo de nutracéuticos/farmacéuticos con efecto funcional. Su obtención es posible bajo un método simple y escalable, utilizando solventes GRAS (Etanol y agua), y a bajo coste de obtención.

Escalado piloto de la producción y microencapsulación del ingrediente bioactivo (DERETIL + CIDAF)

Pruebas de extracción hoja de olivo a escala piloto para producción del extracto HT20S. Se llevó a cabo una extracción por percolación, empleando agua acidificada como disolvente de extracción. Se escalaron las condiciones experimentales optimizadas en el laboratorio, adecuando los parámetros industriales a los equipos de escala piloto (Figura 3). Se utilizó una temperatura de 80°C y un tiempo de 2 horas de extracción con relaciones muestra/disolvente de 1/10, 1/15 y 1/20, donde finalmente la relación 1/10 fue la más óptima.



Figura 3. Escalado de las condiciones preindustriales para pruebas de extracción de hojas de olivo con el fin de producir extracto HT20S.

Obtención del ingrediente bioactivo a escala industrial y formulación del nutracéutico (DERETIL + CIDAF)

A partir de la información y datos operacionales obtenidos en la fase de planta piloto de la actividad anterior, se elaborará toda la documentación técnica y estudios necesarios para la realización de un lote de demostración industrial. Para ello se parte de la reproducción del proceso completo de extracción y purificación del extracto en el laboratorio de I+D de Deretil, aplicando los parámetros esperados en la planta de producción, por su tamaño y configuración, y se comprueba que las especificaciones del proyecto se mantienen o se reajustan, según sea procedente (Figura 4).

Se implementarán los análisis y controles requeridos en el proceso, para llevar a cabo el control de la producción, y se preparará toda la documentación técnica requerida de seguridad y calidad:

- Análisis de tareas, análisis de seguridad del proceso y HAZOP.
- Elaboración de ficha técnica del producto según normativa.
- Revisión del APPCC.
- Revisión del Plan General de Higiene de la Planta de fabricación de extractos.
- Formación del personal de fabricación.



Figura 4. Desarrollo de Deretil Nature de NaturOlive HT, extracto obtenido de hojas de olivo con alta concentración de polifenoles, estandarizado entre 1,5% - 20% de Hidroxitirosol (Izquierda). Desarrollo de NaturOlive OE35S, un extracto de hoja de olivo que contiene elevada pureza en oleuropeína (derecha).



Grupo “Bioactive Ingredients” AGR274

El grupo de investigación “Bioactive Ingredientes” del Dpto. de Química Analítica de la Universidad de Granada ha participado en varias actividades del grupo operativo Operativo. En primer lugar, este grupo ha sido encargado de liderar el ensayo de intervención nutricional realizado en voluntarios humanos sanos con el objetivo de evaluar el efecto que ejerce el consumo prolongado del suplemento de hoja de olivo desarrollado en el proyecto.

Para ello, tras recibir la aprobación del estudio en humanos por el Portal del Bioética de la Junta de Andalucía (PEIBA), se reclutaron más de 80 voluntarios. Los participantes del estudio fueron seleccionados por medio de los criterios de inclusión y exclusión definidos donde destaca tener una edad comprendida entre 45 y 65 años, un peso corporal estable, un índice de masa corporal inferior a 25 kg/m² y por no padecer ninguna patología crónica ni estar sometidos a tratamientos farmacológicos prolongados.

Una vez los voluntarios fueron reclutados, se organizó una reunión informativa y tras la firma del consentimiento informado, se dio inicio al ensayo de intervención. Los voluntarios tuvieron que acudir en 4 ocasiones a la Escuela de Análisis Clínicos de la UGR donde se tomaron muestras sanguíneas, entregaron muestras biológicas de orina y heces, y realizaron varias actividades en una app desarrollada por Fidesol para la evaluación de las capacidades cognitivas.

En los períodos de dos meses comprendidos entre las visitas 1 y 2, y 3 y 4, los voluntarios tuvieron que tomar dos cápsulas diarias del suplemento asignado en cada periodo (olivo o placebo). Entre las visitas 2 y 3 se estableció un período de lavado donde los voluntarios no tuvieron que tomar ningún suplemento. Todas las muestras biológicas una vez recogidas, fueron pre-procesadas el mismo día de las vistas, y conservadas a una temperatura de -80 °C hasta el momento de los análisis.

Además, el grupo ha participado activamente en las actividades asociadas a los análisis de las muestras por diferentes enfoques ómicos. Entre ellos, destaca el análisis microbiómicos en las muestras de heces recogidas. Para ello, se ha realizado la extracción de ADN bacteriano de las muestras fecales de los voluntarios en los diferentes puntos del estudio. Una vez que tenemos el ADN, se ha usen unos primers específicos (V1-V2) del gen 16S rRNA para amplificar el ADN bacteriano de interés (mediante PCR). Mediante una segunda PCR se preparan las librerías (se añaden índices o “barcodes” específicos para identificar múltiples muestras en un solo experimento “multiplexado”).

Por último, las muestras se normalizan equimolarmente y purifican. Se realiza la secuenciación del ADN a través de la plataforma Illumina

donde se generan lecturas de nucleótidos. Esta plataforma nos genera un archivo por cada muestra de voluntario en formato FASTQ ("demultiplexación"). Mediante diferentes softwares (como QIIME o Rstudio) o plataformas web (Microbiome Analyst), y con la ayuda del supercomputador Albaicín para una ejecución más rápida y eficaz, se realizará el análisis de la biodiversidad microbiana y se evaluará el cambio de la abundancia de diferentes taxones a lo largo del estudio de intervención.

Los resultados esperados tras la ingesta del extracto de la hoja de olivo son una modulación favorable de la microbiota intestinal, ya que los compuestos bioactivos presentes en el extracto, como los polifenoles (especialmente la oleuropeína e hidroxitirosol), tienen propiedades antioxidantes y antimicrobianas; estas pueden favorecer el equilibrio del ecosistema intestinal, promoviendo el crecimiento de bacterias beneficiosas, como los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, mientras inhiben la proliferación de microorganismos patógenos. Estos géneros producen Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC) como el acetato, propionato y butirato al fermentar fibras y otros compuestos no digeribles en el intestino. Estos metabolitos fortalecen la barrera intestinal, reducen la inflamación y sirven como fuente de energía para las células del colon.

Por otra parte, se han llevado a cabo las actividades asociadas al tratamiento de datos de metabolómica no dirigida de las muestras analizadas de plasma sanguíneo por el CIDAF. Estas metodologías se han llevado a cabo a través de software de acceso libre (MZMine, "notame", etc.). Una vez, los datos han sido procesados y asegurado la calidad de estos, se han iniciado los análisis estadísticos para la identificación de cambios metabólicos asociados a la ingesta de los suplementos. Hasta el momento, utilizando análisis univariantes de manera preliminar, se han detectado en plasma metabolitos derivados de la ingesta de los suplementos como es el caso del ácido homovanílico, pero hasta el momento no se han identificado rutas metabólicas endógenas alteradas significativamente a nivel estadístico.

Se espera que en los próximos meses se pueda profundizar en los resultados y mecanismos biológicos por medio de empleo de herramientas estadísticas más sofisticadas como análisis estadísticos multivariantes o la integración de datos a nivel ómico. Para ello, el grupo de investigación ha participado durante el desarrollo del proyecto en la creación de una plataforma bioinformática Biomix (<https://ixi-97.github.io/>) que permite la integración estadística de datos obtenidos por diferentes ómicas. Una vez obtenidos los datos finales de microbiómica y metabolómica, serán integrados por medio de dicha plataforma bioinformática.

Por último, el grupo de investigación AGR-274 de la Universidad de Granada ha participado en diferentes actividades de divulgación, destacando entre ellas la Noche Europea de los Investigadores de 2023, donde se dio difusión a los objetivos del proyecto.





UNIÓN EUROPEA
Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural



Junta de Andalucía
Consejería de Agricultura,
Pesca, Agua y Desarrollo Rural