



1. DATOS BÁSICOS DEL TFG:

Título: Optimización y aplicación de una metodología de hidrólisis enzimática selectiva para el estudio de metabolitos plasmáticos derivados de extractos vegetales

Descripción general (resumen y metodología):

Los extractos de matrices vegetales constituyen una fuente relevante de compuestos fenólicos bioactivos, entre los que destacan secoiridoides, flavonoides y derivados fenólicos simples. Tras su ingesta, estos compuestos pueden experimentar procesos de absorción, degradación y biotransformación que dan lugar a metabolitos circulantes, especialmente conjugados de fase II, como glucurónidos y sulfatos [1-6].

Este TFG parte de un análisis metabolómico no dirigido previo de muestras de plasma humano procedentes de un ensayo de intervención nutricional basado en suplementación con extractos vegetales, en el que ya se detectaron y anotaron metabolitos circulantes asociados a la ingesta de estos extractos, y siendo los derivados glucuronizados y sulfatados los de mayor abundancia [7]. A partir de estos resultados previos, el presente trabajo plantea una estrategia complementaria orientada a corroborar y reforzar las anotaciones propuestas, especialmente aquellas correspondientes a metabolitos conjugados de fase II.

La metodología se desarrollará en varias etapas:

1. 1. Preparación y acondicionamiento de muestras de plasma.

Se emplearán muestras de plasma del ensayo nutricional seleccionadas para el proceso de optimización.

Inicialmente, se evaluarán diferentes estrategias de preparación de muestra, incluyendo protocolos con y sin evaporación previa, así como distintas condiciones de precipitación proteica, con el fin de seleccionar el procedimiento más adecuado para preservar la estabilidad de los metabolitos y favorecer la eficacia del tratamiento enzimático.

2. 2. Optimización del tratamiento enzimático.

Se optimizarán diferentes condiciones de hidrólisis enzimática selectiva, evaluando distintos ratios muestra/enzima y condiciones experimentales adecuadas para la escisión de conjugados glucurónidos y sulfatados mediante el uso de muestras seleccionadas de plasma. Para ello, se emplearán enzimas específicas dirigidas a metabolitos de fase II, junto con controles desnaturalizados que permitan diferenciar los cambios producidos por actividad enzimática real de posibles variaciones asociadas al tratamiento de muestra.

3. 3. Análisis metabolómico mediante HPLC-ESI-qTOF-MS.

Las muestras tratadas y sus controles serán analizadas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución. La comparación de los perfiles metabolómicos antes y después del tratamiento enzimático permitirá detectar señales que desaparecen tras la hidrólisis.

4. 4. Aplicación del método optimizado a muestras procedentes de intervención nutricional.

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas, el método se aplicará a todas las muestras de plasma procedentes del ensayo de intervención con extractos vegetales. Los datos obtenidos serán procesados mediante herramientas de acceso libre, comparando muestras tratadas, controles y muestras del ensayo de intervención. Se evaluarán cambios en intensidad, presencia/ausencia de señales y patrones compatibles con metabolitos glucuronizados o sulfatados, con el objetivo de apoyar la identificación de posibles biomarcadores plasmáticos de exposición a extractos de matrices vegetales.

5. 5. Integración de los resultados obtenidos con el análisis metabolómico previo: mejorar la caracterización de metabolitos circulantes derivados de la ingesta de los extractos y ampliar el

conocimiento sobre su biodisponibilidad y biotransformación en humanos.

Tipología: Trabajos experimentales, de toma de datos de campo o de laboratorio.

Objetivos planteados:

- 1. Objetivo general:
Optimizar y aplicar una metodología de hidrólisis enzimática selectiva acoplada a HPLC-ESI-qTOF-MS para mejorar la caracterización de metabolitos conjugados derivados de la ingesta de extractos vegetales en muestras de plasma humano.
- 2. Objetivos específicos:
 1. - Optimizar la preparación de muestras de plasma previa al tratamiento enzimático, evaluando diferentes protocolos de acondicionamiento, incluyendo estrategias con y sin evaporación previa.
 2. - Evaluar diferentes condiciones de hidrólisis enzimática selectiva, estudiando distintos ratios muestra/enzima y condiciones de incubación.
 3. - Analizar el efecto del tratamiento enzimático mediante HPLC-ESI-qTOF-MS, comparando los perfiles metabolómicos de muestras tratadas y controles para detectar señales compatibles con metabolitos de fase II y productos derivados de su hidrólisis.
 4. - Aplicar el método optimizado a todas las muestras de plasma procedentes del ensayo de intervención nutricional.
 5. - Contribuir a la identificación y confirmación de posibles biomarcadores plasmáticos de fase II tras la ingesta de extractos vegetales.

Bibliografía básica:

- [1] Ballet, C., Correia, M. S. P., Conway, L. P., Locher, T. L., Lehmann, L. C., Garg, N., Vujasinovic, M., Deindl, S., Löhr, J.-M., & Globisch, D. (2018). New enzymatic and mass spectrometric methodology for the selective investigation of gut microbiota-derived metabolites. *Chemical Science*, 9, 6233–6239. <https://doi.org/10.1039/C8SC01502C>
- [2] Correia, M. S. P., Rao, M., Ballet, C., & Globisch, D. (2019). Coupled enzymatic treatment and mass spectrometric analysis for identification of glucuronidated metabolites in human samples. *ChemBioChem*, 20(13), 1678–1683. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900065>
- [3] Fareed, Y., Tsiara, I., Correia, M. S. P., et al. (2022). A broad, exposome-type evaluation of xenobiotic phase II biotransformation in human biofluids by LC-MS/MS. *Exposome*, 2(1), osac008. <https://doi.org/10.1093/exposome/osac008>
- [4] Tsiara, I., Riemer, A., Correia, M. S. P., Rodriguez-Mateos, A., & Globisch, D. (2023). Immobilized enzymes on magnetic beads for separate mass spectrometric investigation of human phase II metabolite classes. *Analytical Chemistry*, 95(33), 12565–12571. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02988>
- [5] Tsiara, I., Hervás Povo, B., Alotaibi, W., Young Tie Yang, P., Correia, M. S. P., Rodriguez-Mateos, A., & Globisch, D. (2025). Characterizing the sulfated and glucuronidated (poly)phenol metabolome for dietary biomarker discovery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 73(11), 6702–6710. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c12596>
- [6] Tsiara, I., et al. (2025). Global metabolomics profiling of glucuronides in human plasma, fecal and cerebrospinal fluid samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-025-06082-w>
- [7] Villegas-Aguilar, M. C., et al. (2024). The application of untargeted metabolomic approaches for the search of common bioavailable metabolites in human plasma samples from *Lippia citriodora* and *Olea europaea* extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(44), 24879–24893. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c05325>

Recomendaciones y orientaciones para el estudiante:

Se recomienda que el estudiante demuestre interés por la investigación experimental de laboratorio y posea habilidades en el manejo de ordenadores. Durante el trabajo, será importante

mantener una actitud organizada y rigurosa, tanto en la preparación de muestras como en el tratamiento e interpretación de los datos obtenidos. Asimismo, se valorará positivamente la capacidad para realizar búsquedas bibliográficas en bases de datos científicas y consultar literatura científica en inglés. No es necesaria experiencia previa específica en este tipo de ensayos, ya que la metodología será explicada y supervisada durante el desarrollo del TFG.

Plazas: 1

2. DATOS DEL TUTOR/A:

Nombre y apellidos: ANTONIO SEGURA CARRETERO

Ámbito de conocimiento/Departamento: QUÍMICA ANALÍTICA

Correo electrónico: ansegura@ugr.es

3. COTUTOR/A DE LA UGR (en su caso):

Nombre y apellidos: PATRICIA FERNÁNDEZ MORENO

Ámbito de conocimiento/Departamento: QUÍMICA ANALÍTICA

Correo electrónico: patrifdez@ugr.es

4. COTUTOR/A EXTERNO/A (en su caso):

Nombre y apellidos:

Correo electrónico:

Nombre de la empresa o institución:

Dirección postal:

Puesto del tutor en la empresa o institución:

Centro de convenio Externo:

5. DATOS DEL ESTUDIANTE:

Nombre y apellidos:

Correo electrónico: