

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas

**DIGESTIBILIDAD, BIODISPONIBILIDAD Y  
NUTRIGENÓMICA DE COMPUESTOS  
BIOACTIVOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD  
ANTIDIABÉTICA**

**Marianela Belén Finos**

Director de Tesis: Dr. Adrián A. Perez

Co-directora de Tesis: Dra. Patricia G. Burns

Lugar de realización: Área de Biocoloides y Nanotecnología

Instituto de Tecnología de Alimentos - Facultad de Ingeniería Química - UNL

**-2025-**

## AGRADECIMIENTOS

A mi director, Adrián Perez, por confiar una vez más en mí al integrarme a su excelente grupo de trabajo, por su respaldo constante, su compromiso incondicional y, especialmente, por su acompañamiento afectuoso y empático a lo largo de este camino.

A mi co-directora, Patricia Burns, por su buena predisposición y por la valiosa ayuda brindada durante el desarrollo de esta tesis.

Al financiamiento de los siguientes proyectos:

- PICT-2017-1823 (2018-2021): “Impacto de la matriz alimentaria y la nanoencapsulación sobre la bioaccesibilidad y actividad antidiabética de compuestos bioactivos”. Organismo Financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina (ANPCyT). Investigador Responsable: Mg. Liliana G. Santiago.
- CAI+D 50620190100100LI (2020): “Efecto de la matriz alimentaria sobre la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos”. Organismo Financiador: Universidad Nacional del Litoral (UNL). Investigador Responsable: Dr. Adrián A. Perez.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina (ANPCyT) por el otorgamiento de la Beca Doctoral y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET) por el otorgamiento de la Beca de finalización de Doctorado.

Al Instituto de Tecnología de Alimentos, especialmente al Área de Biocoloides y Nanotecnología, y a la Facultad de Ingeniería Química (UNL), por brindarme el espacio y los recursos para la realización de la presente tesis.

A la querida Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por la formación de posgrado recibida, que no solo enriqueció mi conocimiento científico, sino que reafirmó mi convicción en la educación pública, gratuita y de calidad como pilar fundamental de la soberanía nacional.

Al Área de Cereales y Oleaginosos (ITA, FIQ-UNL), en especial al Dr. Raúl Cian; a la Dra. María Inés Isla y a la Dra. María Eugenia Orqueda (INBIOFIV, CONICET-UNT); a la Dra. Flavia Visentini (ITA, FIQ-UNL); al Dr. José Luis Fernández (PRELINE, FIQ-UNL); al Dr. Pablo Pérez y a la Dra. Ayelén Hugo (CIDCA, CONICET-UNLP-CIC); al Dr. Federico Ariel y al Dr. Johan Rodríguez (IAL, CONICET-UNL); al Mg. Carlos Osella (ITA, FIQ-UNL); al Área de Conservación de Alimentos (ITA, FIQ-UNL), en especial a la Mg. Andrea Piagentini y a la Dra. Cecilia Fenoglio; al Departamento de Análisis Sensorial (FIQ-UNL), en especial al Dr. Facundo Cuffia; y a Marcelo Schmidt (LaMoFIQ), por su generosa disposición, colaboración y acompañamiento a lo largo del desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros Osvaldo, Flavia, Laura, Sergio, Evangelina y Agustina, por el interés genuino en mis proyectos y por estar siempre dispuestos a brindarme su tiempo y ayuda para que se concreten y, especialmente, por los agradables momentos compartidos, los enriquecedores intercambios de ideas y los consejos oportunos, tanto profesionales como personales, que han hecho de esta etapa una vivencia aún más gratificante.

A mi familia y amigos, por estar a mi lado de forma incondicional, por celebrar mis logros como propios y sostenerme con amor en los momentos difíciles.

A mi Reina querida, por enseñarme cada día la belleza de lo simple y del amor desinteresado, y por recordarme la importancia de regalarnos tiempo para habitar el presente.

A mis padres Mariela y Mario, por haber incentivado mis intereses desde niña, brindándome todas las herramientas y oportunidades para hacer realidad mis sueños más anhelados.

## **APORTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS**

Finos MB, Visentini FF, Cian R, Fernández JL, Santiago LG, Perez AA. Nanosupplements based on protein-polysaccharide coacervates loaded with essential oils: Evaluation of antioxidant and antidiabetic properties. Food Hydrocoll. 2024;110248.



## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>16</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>17</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>18</b>
1.1. Diabetes mellitus .....	19
1.1.1. Factores de riesgo y fisiopatología de DM2 .....	19
1.1.2. Complicaciones asociadas a DM2 .....	21
1.1.3. Diagnóstico médico y tratamiento farmacológico de la DM2 .....	23
1.2. Compuestos bioactivos .....	25
1.2.1. Vitaminas .....	26
1.2.2. Ácidos grasos.....	26
1.2.3. Péptidos bioactivos .....	27
1.2.4. Fitoquímicos .....	27
1.3. Encapsulación de compuestos bioactivos .....	28
1.3.1. Métodos de encapsulación .....	28
1.3.2. Sistemas de encapsulación .....	31
1.3.3. Encapsulación en biopolímeros.....	34
1.4. Tracto gastrointestinal humano y biodisponibilidad .....	36
1.5. Nutrigenómica y diabetes mellitus tipo 2 .....	38
1.5.1. Genes relacionados con diabetes mellitus tipo 2 .....	39
1.5.2. Perspectiva y objetivos estratégicos .....	40
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
2.1. Objetivo general .....	43
2.2. Objetivos específicos .....	43
<b>3. CAPÍTULO 1.....</b>	<b>44</b>
3.1. INTRODUCCIÓN.....	45
3.1.1. Aceites esenciales .....	45
3.1.1.1. Potenciales aplicaciones de los aceites esenciales en la industria .....	49
3.1.2. Encapsulación de aceites esenciales.....	50
3.1.2.1. Sistemas de encapsulación proteicos .....	51
3.1.3. Caracterización de sistemas de encapsulación proteicos .....	57
3.1.4. Actividad biológica de aceites esenciales encapsulados.....	60
3.1.4.1. Actividad antioxidante .....	60
3.1.4.2. Actividad antidiabética.....	63
3.1.4.3. Actividad antiinflamatoria.....	65
3.1.5. Elección de aceites esenciales.....	66

3.2.	OBJETIVOS.....	66
3.3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	66
3.3.1.	Materiales .....	66
3.3.2.	Caracterización de aceites esenciales .....	67
3.3.2.1.	Contenido fenólico total .....	67
3.3.2.2.	Análisis GC-FID/MS.....	67
3.3.3.	Obtención de nanopartículas EWPn.....	68
3.3.4.	Formación de complejos EWPn-AE.....	68
3.3.5.	Caracterización de complejos EWPn-AE.....	69
3.3.5.1.	Distribución de tamaño de partícula y potencial $\zeta$ .....	69
3.3.5.2.	Espectroscopía de fluorescencia intrínseca y extrínseca.....	69
3.3.5.3.	Eficiencia de encapsulación .....	70
3.3.6.	Actividad antioxidante de complejos EWPn-AE.....	71
3.3.6.1.	Actividad de captación de radical ABTS <sup>+</sup> .....	71
3.3.6.2.	Actividad de poder reductor .....	72
3.3.6.3.	Actividad quelante de hierro .....	72
3.3.7.	Actividad antidiabética de complejos EWPn-AE .....	73
3.3.7.1.	Actividad inhibitoria de $\alpha$ -amilasa .....	73
3.3.7.2.	Actividad inhibitoria de $\alpha$ -glucosidasa.....	74
3.3.7.3.	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática.....	75
3.3.8.	Actividad inhibitoria de lipooxigenasa de complejos EWPn-AE .....	76
3.3.9.	Análisis estadístico .....	76
3.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	77
3.4.1.	Caracterización de aceites esenciales .....	77
3.4.1.1.	Contenido fenólico total .....	77
3.4.1.2.	Análisis GC-FID/MS.....	79
3.4.2.	Caracterización de complejos EWPn-AE.....	85
3.4.2.1.	Distribución de tamaño de partícula y potencial $\zeta$ .....	85
3.4.2.2.	Espectroscopía de fluorescencia intrínseca y extrínseca.....	91
3.4.2.3.	Eficiencia de encapsulación .....	97
3.4.3.	Actividad antioxidante de nanocomplejos EWPn-AE .....	100
3.4.3.1.	Actividad de captación de radical ABTS <sup>+</sup> .....	101
3.4.3.2.	Actividad de poder reductor .....	103
3.4.3.3.	Actividad quelante de hierro .....	104
3.4.4.	Actividad antidiabética de nanocomplejos EWPn-AE .....	106
3.4.4.1.	Actividad inhibitoria de $\alpha$ -amilasa .....	106
3.4.4.2.	Actividad inhibitoria de $\alpha$ -glucosidasa.....	108

3.4.4.3.	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática.....	110
3.4.5.	Actividad inhibitoria de lipooxigenasa de nanocomplejos EWPn-AE.....	112
3.5.	CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 1 .....	114
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>116</b>
4.1.	INTRODUCCIÓN.....	117
4.1.1.	Interacciones proteína-polisacárido.....	117
4.1.1.1.	Características generales de las pectinas .....	121
4.1.1.2.	Aceites esenciales encapsulados en coacervados complejos .....	123
4.1.2.	Métodos <i>in vitro</i> basados en cultivos celulares para la evaluación de la actividad antidiabética .....	124
4.1.2.1.	Expresión génica de SGLT1 y GLUT2 en células Caco-2.....	127
4.1.3.	Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de coacervados complejos .....	129
4.1.3.1.	Actividad biológica de digestos.....	132
4.2.	OBJETIVOS.....	134
4.3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	135
4.3.1.	Materiales .....	135
4.3.2.	Obtención de coacervados EWPn-AE-PAM.....	135
4.3.3.	Caracterización de coacervados EWPn-AE-PAM.....	135
4.3.3.1.	Comportamiento de fase.....	135
4.3.3.2.	Microscopía.....	136
4.3.4.	Modulación de la expresión génica en células Caco-2.....	136
4.3.4.1.	Cultivo celular.....	136
4.3.4.2.	Viabilidad celular .....	137
4.3.4.3.	Tratamiento de las células .....	138
4.3.4.4.	Expresión génica de SGLT1 y GLUT2.....	138
4.3.5.	Obtención de polvos EWPn-AE-PAM <sub>Iiof</sub> .....	139
4.3.5.1.	Recuperación de sólidos.....	140
4.3.6.	Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de polvos EWPn-AE-PAM <sub>Iiof</sub> .....	140
4.3.6.1.	Actividad enzimática.....	140
4.3.6.2.	Método estático consenso.....	142
4.3.6.3.	Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE .....	144
4.3.6.4.	Distribución de tamaño de partícula y potencial $\zeta$ .....	144
4.3.6.5.	Estabilidad y bioaccesibilidad de AE .....	145
4.3.6.6.	Actividad antioxidante .....	146
4.3.6.6.1.	Capacidad de captación de radical ABTS <sup>+</sup> .....	146
4.3.6.6.2.	Poder reductor .....	147
4.3.6.7.	Actividad antidiabética.....	147
4.3.6.7.1.	Actividad inhibitoria de $\alpha$ -amilasa.....	147

4.3.6.7.2.	Actividad inhibitoria de $\alpha$ -glucosidasa .....	148
4.3.7.	Análisis estadístico .....	149
4.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	150
4.4.1.	Caracterización de coacervados EWPn–AE–PAM.....	150
4.4.1.1.	Comportamiento de fase.....	150
4.4.1.2.	Microscopía.....	153
4.4.2.	Modulación de la expresión génica en células Caco-2.....	155
4.4.2.1.	Viabilidad celular .....	155
4.4.2.2.	Expresión génica de SGLT1 y GLUT2.....	157
4.4.3.	Obtención de polvos EWPn–AE–PAM <sub>liof</sub> .....	160
4.4.3.1.	Recuperación de sólidos.....	160
4.4.4.	Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de polvos EWPn–AE–PAM <sub>liof</sub> .....	160
4.4.4.1.	SDS-PAGE.....	160
4.4.4.2.	Distribución de tamaño de partícula y potencial $\zeta$ .....	163
4.4.4.3.	Estabilidad y bioaccesibilidad de AE .....	170
4.4.4.4.	Actividad antioxidante .....	172
4.4.4.4.1.	Capacidad de captación de radical ABTS <sup>+</sup> .....	172
4.4.4.4.2.	Poder reductor .....	175
4.4.4.5.	Actividad antidiabética.....	176
4.4.4.5.1.	Actividad inhibitoria de $\alpha$ -amilasa y $\alpha$ -glucosidasa .....	176
4.5.	CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 2 .....	181
<b>5.</b>	<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>183</b>
5.1.	INTRODUCCIÓN.....	184
5.1.1.	Alimentos funcionales .....	184
5.1.2.	Generalidades del pan.....	186
5.1.2.1.	Composición y valor nutricional .....	188
5.1.3.	Caracterización de panes.....	189
5.1.4.	Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de panes.....	192
5.2.	OBJETIVOS.....	192
5.3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	192
5.3.1.	Materiales .....	192
5.3.2.	Análisis termogravimétrico de polvos EWPn–AE–PAM <sub>liof</sub> .....	193
5.3.3.	Obtención de panes que incorporan EWPn–AE–PAM <sub>liof</sub> .....	193
5.3.4.	Caracterización de panes que incorporan EWPn–AE–PAM <sub>liof</sub> .....	194
5.3.4.1.	Humedad y actividad acuosa.....	194
5.3.4.2.	Perfil de textura y color .....	194
5.3.4.3.	Análisis sensorial .....	195

5.3.5.	Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de panes que incorporan EWPn-AE-PAM <sub>liof</sub> .....	196
5.3.5.1.	Actividad enzimática.....	196
5.3.5.2.	Método estático consenso.....	198
5.3.5.3.	Liberación de AE.....	199
5.3.5.4.	Actividad antioxidante .....	199
5.3.5.4.1.	Capacidad de captación de radical ABTS <sup>+</sup> .....	199
5.3.5.4.2.	Poder reductor .....	200
5.3.5.5.	Liberación de glucosa.....	200
5.3.6.	Análisis estadístico .....	201
5.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	202
5.4.1.	Análisis termogravimétrico de polvos EWPn-AE-PAM <sub>liof</sub> .....	202
5.4.2.	Caracterización de panes que incorporan EWPn-AE-PAM <sub>liof</sub> .....	205
5.4.2.1.	Humedad y actividad acuosa.....	205
5.4.2.2.	Perfil de textura y color.....	208
5.4.2.3.	Análisis sensorial .....	213
5.4.3.	Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de panes que incorporan EWPn-AE-PAM <sub>liof</sub> .....	215
5.4.3.1.	Liberación de AE.....	215
5.4.3.2.	Actividad antioxidante .....	216
5.4.3.3.	Liberación de glucosa.....	217
5.5.	CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 3 .....	219
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>221</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>224</b>

---

**ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS**

$a^*$	Parámetro de color (verde a rojo)
$A_{ABTS^+}$	Actividad de captación de radical $ABTS^+$ , $IC_{50}$ expresado como mg proteína $g^{-1}$ sistema
$A_{ami}$	Actividad inhibitoria de $\alpha$ -amilasa, $IC_{50}$ expresado como $\mu g$ AE $mL^{-1}$
ABS	Absorbancia
$ABS_{blanco}$	Absorbancia correspondiente al blanco
$ABS_{BM}$	Absorbancia correspondiente al blanco de muestra
$ABS_{BR}$	Absorbancia correspondiente al blanco de reactivo
$ABS_C$	Absorbancia correspondiente a las diferentes concentraciones de enzima
$ABS_{control}$	Absorbancia correspondiente al control
$ABS_E$	Absorbancia correspondiente a la enzima
$ABS_M$	Absorbancia correspondiente a la muestra
$ABS_{muestra}$	Absorbancia correspondiente a la muestra
$ABS_{PB}$	Pendiente correspondiente a la ecuación lineal del blanco
$ABS_{PE}$	Pendiente correspondiente a la ecuación lineal de la enzima
$ABS_{standard}$	Absorbancia correspondiente al <i>standard</i>
ABTS	Ácido 2,2'azinobis-(3 etilbenzotiazolina)-6-sulfónico
$ABTS^+$	Ácido 2,2'azinobis-(3 etilbenzotiazolina)-6-sulfónico catiónico
AE	Aceite esencial
$AE_E$	Cantidad de aceite esencial encapsulado
AEs	Aceites esenciales
$AE_S$	Cantidad de aceite esencial determinada en sobrenadante
$AE_T$	Cantidad total de aceite esencial inicialmente adicionada en la formación del nanocomplejo
AFM	Microscopía de fuerza atómica
$A_{glu}$	Actividad inhibitoria de $\alpha$ -glucosidasa, $IC_{50}$ expresado como $\mu g$ AE $mL^{-1}$
$A_{lip}$	Actividad inhibitoria de lipasa pancreática, $IC_{50}$ expresado como $\mu g$ AE $mL^{-1}$

$A_{\text{lox}}$	Actividad inhibitoria de lipooxigenasa, $IC_{50}$ expresado como $\mu\text{g AE mL}^{-1}$
ANDG	Ácido nordihidroguaiarético
ANS	Ácido 1-anilino-8-naftaleno sulfónico
$A_{\text{PR}}$	Actividad de poder reductor, expresada como g sistema $\text{g}^{-1}$ proteína
$a_w$	Actividad acuosa
$B^*$	Bioaccesibilidad, expresada como %
$b^*$	Parámetro de color (azul a amarillo)
BE	Bioaccesibilidad efectiva, expresada como %
$C_{\text{ABTS}^+}$	Captación de radical $\text{ABTS}^+$ , expresada como %
CAN	Aceite esencial de canela
CB	Compuesto bioactivo
CBs	Compuestos bioactivos
$C_{\text{Digesto}}$	Concentración de AE en el digesto total
$C_{\text{Fe}}$	Captación de hierro, expresada como %
$C_{\text{glucosa}}$	Concentración de glucosa, expresada como $\text{g L}^{-1}$
$C_{\text{Inicial}}$	Concentración de AE en la muestra inicial
$C_{\text{Micelar}}$	Concentración de AE en la fracción micelar
COM	Aceite esencial de comino
COX	Ciclooxigenasa
CR	Contenido relativo, expresado en %
$d_H$	Diámetro hidrodinámico de partícula, expresado en nm
DLS	Dispersión de luz dinámica
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido

---

DO <sub>blanco</sub>	Densidad óptica del blanco
DO <sub>muestra</sub>	Densidad óptica de la muestra
DTG	Termogravimetría derivada
E*	Estabilidad, expresada en %
EAA	Equivalente de ácido ascórbico
EAG	Equivalente de ácido gálico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Eficiencia de encapsulación, expresada en %
EW	Clara de huevo
EWP	Proteína de clara de huevo
EWPn	Nanopartícula de proteína de clara de huevo
EWPn-AE	Nanocomplejo de nanopartícula de proteína de clara de huevo y aceite esencial
EWPn-AE-PAM	Coacervado de nanopartícula de proteína de clara de huevo, aceite esencial y pectina de alto metoxilo
EWPn-AE-PAM <sub>ltof</sub>	Polvo de nanopartícula de proteína de clara de huevo, aceite esencial y pectina de alto metoxilo
EWPn-CAN	Nanocomplejo de nanopartícula de proteína de clara de huevo y aceite esencial de canela
EWPn-COM	Nanocomplejo de nanopartícula de proteína de clara de huevo y aceite esencial de comino
EWPn-LIM	Nanocomplejo de nanopartícula de proteína de clara de huevo y aceite esencial de limón
EWPn-ORE	Nanocomplejo de nanopartícula de proteína de clara de huevo y aceite esencial de orégano
EWPn-ORE-PAM	Coacervado de nanopartícula de proteína de clara de huevo, aceite esencial de orégano y pectina de alto metoxilo
EWPn-ORE-PAM <sub>ltof</sub>	Polvo de nanopartícula de proteína de clara de huevo, aceite esencial de orégano y pectina de alto metoxilo
EWPn-PAM	Coacervado de nanopartícula de proteína de clara de huevo y pectina de alto metoxilo
EWPn-PAM <sub>ltof</sub>	Polvo de nanopartícula de proteína de clara de huevo y pectina de alto metoxilo
EWPn-TOM	Nanocomplejo de nanopartícula de proteína de clara de huevo y aceite esencial de tomillo



EWPn–TOM–PAM Coacervado de nanopartícula de proteína de clara de huevo, aceite esencial de tomillo y pectina de alto metoxilo

EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub> Polvo de nanopartícula de proteína de clara de huevo, aceite esencial de tomillo y pectina de alto metoxilo

FDA *Food and Drug Administration*

FEMA *Flavor and Extract Manufacturers Association*

FGS Fluido gástrico simulado

FID Detector de ionización de llama

FIS Fluido intestinal simulado

FRAP Capacidad para reducir el hierro férrico

FSS Fluido salival simulado

GC Cromatografía de gases

GC–FID/MS Cromatografía de gases con detección por ionización de llama y espectrometría de masas

GRAS Generalmente reconocida como segura

HAT Transferencia del átomo de hidrógeno

HPLC Cromatografía líquida de alto rendimiento

I<sub>ami</sub> Inhibición de  $\alpha$ -amilasa, expresada como %

IC<sub>50</sub> Concentración inhibitoria del 50%

ICA Actividad quelante de hierro, IC<sub>50</sub> expresado como mg proteína g<sup>-1</sup>

IF<sub>max-ANS</sub> Intensidad de fluorescencia máxima debida al ANS, expresada en u.a.

IF<sub>max-Trp</sub> Intensidad de fluorescencia máxima debida al Trp, expresada en u.a.

I<sub>glu</sub> Inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa, expresada como %

I<sub>lip</sub> Inhibición de lipasa pancreática, expresada en %

I<sub>lox</sub> Inhibición de lipooxigenasa, expresada en %

L\* Parámetro de color (negro a blanco)

LIM Aceite esencial de limón

LOX Lipooxigenasa

---

M <sub>P</sub>	Masa de polvo
MPM	Marcador de peso molecular
M <sub>ST</sub>	Masa de sólidos totales
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro
ORE	Aceite esencial de orégano
ORE-0,5	Pan con 0,5% de polvo EWPn-ORE-PAM <sub>liof</sub> (0,5 g cada 100 g de harina)
ORE-1	Pan con 1,0% de polvo EWPn-ORE-PAM <sub>liof</sub> (1,0 g cada 100 g de harina)
OVA	Ovoalbúmina
PAM	Pectina de alto metoxilo
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P <sub>f</sub>	Peso final, expresado en g
P <sub>i</sub>	Peso inicial, expresado en g
pI	Punto isoelectrico
PM	Peso molecular, expresado en kDa
PMs	Pesos moleculares
pNPG	4-nitrofenil $\alpha$ -D-glucopiranosido
PR	Poder reductor, expresado en g sistema g <sup>-1</sup> proteína
PS	Polisacárido
PSD	Distribución de tamaño de partícula
PSDi	Distribución de tamaño de partícula basada en intensidad, expresada en %
PSDv	Distribución de tamaño de partícula basada en volumen, expresada en %
PSs	Polisacáridos
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RI	Resistencia a la insulina
RNS	Especies reactivas de nitrógeno

---

ROS	Especies reactivas de oxígeno
RS	Recuperación de sólidos, expresada como %
SB	Sales biliares
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SET	Transferencia de electrón
SGLT	Co-transportadores de sodio y glucosa
TAME	<i>p</i> -toluensulfonil-L-arginina metil éster
TCA	Ácido tricloroacético
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TGA	Análisis termogravimétrico
TGI	Tracto gastrointestinal
TNF	Factor de necrosis tumoral
TOM	Aceite esencial de tomillo
TOM-0,5	Pan con 0,5% de polvo EWPn-TOM-PAM <sub>iof</sub> (0,5 g cada 100 g de harina)
TOM-1	Pan con 1,0% de polvo EWPn-TOM-PAM <sub>iof</sub> (1,0 g cada 100 g de harina)
TPA	Análisis de perfil de textura
TPC	Contenido fenólico total, expresado en mg EAG g <sup>-1</sup> AE
TPTZ	2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina
t <sub>r</sub>	Tiempo de retención, expresado en min
Trp	Triptófano
Δa*	Diferencia entre valores del parámetro a*
Δb*	Diferencia entre valores del parámetro b*
ΔE*	Diferencia total de color
ΔL*	Diferencia entre valores del parámetro L*

$\lambda_{ex}$	Longitud de onda de excitación, expresada en nm
$\lambda_{max-ANS}$	Longitud de onda correspondiente a la intensidad de fluorescencia máxima debida al ANS, expresada en nm
$\lambda_{max-Trp}$	Longitud de onda correspondiente a la intensidad de fluorescencia máxima debida al Trp, expresada en nm

## RESUMEN

La presente tesis doctoral se propuso estudiar de forma integral la influencia de un sistema de encapsulación y de una matriz alimentaria sobre la digestibilidad, bioaccesibilidad y actividad antidiabética de compuestos bioactivos (CBs) derivados de plantas aromáticas y especias culinarias, con el objetivo de contribuir al desarrollo de estrategias alimentarias innovadoras para la prevención y/o el control de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Para ello, se diseñó una secuencia experimental basada en siete objetivos específicos, abordados a lo largo de tres capítulos, que permitieron avanzar desde la síntesis y caracterización de sistemas nanoestructurados hasta su aplicación en un alimento modelo: pan blanco de molde.

En primer lugar, se desarrollaron nanopartículas proteicas a base de clara de huevo (EWPn) capaces de vehiculizar aceites esenciales (AEs) con actividad biológica comprobada. Estas nanopartículas cargadas con AEs demostraron estabilidad fisicoquímica, eficiencia de encapsulación adecuada y efecto inhibitorio significativo sobre enzimas clave en la fisiopatología de la DM2, validando su potencial como sistemas funcionales. Posteriormente, mediante la formación de coacervados con pectina de alto metoxilo (PAM), se mejoró la estabilidad y funcionalidad de los sistemas, lográndose una reducción significativa en la expresión de genes que codifican transportadores de glucosa (SGLT1 y GLUT2) en células Caco-2, sin comprometer la bioaccesibilidad de los compuestos.

Finalmente, los sistemas de encapsulación diseñados fueron incorporados en una matriz panificada, cuyo análisis demostró que su adición no alteró significativamente sus propiedades tecnológicas ni su aceptabilidad sensorial. A nivel funcional, los panes desarrollados conservaron parcialmente su actividad antioxidante tras la digestión *in vitro*, y en algunos casos se observó una modulación favorable de la liberación de glucosa.

Se concluye que esta tesis proporciona evidencia científica sólida sobre el uso de tecnologías de encapsulación proteína-polisacárido para mejorar la estabilidad y funcionalidad de CBs susceptibles a la degradación química, y demuestra la viabilidad de su aplicación en matrices panificadas como vehículos alimentarios. Estos hallazgos abren nuevas perspectivas en el diseño de alimentos funcionales dirigidos al abordaje de enfermedades metabólicas como la DM2, y sientan las bases para estudios futuros en modelos *in vivo* y aplicaciones clínicas.

**ABSTRACT**

This doctoral thesis aimed to comprehensively investigate the influence of a encapsulation system and a food matrix on the digestibility, bioaccessibility, and antidiabetic activity of bioactive compounds (CBs) derived from aromatic plants and culinary spices, with the goal of contributing to the development of innovative dietary strategies for the prevention and/or management of type 2 diabetes mellitus (DM2). To this end, an experimental sequence was designed based on seven specific objectives, addressed across three chapters, which enabled progress from the synthesis and characterization of nanostructured systems to their application in a model functional food: white sandwich bread.

First, protein-based nanoparticles derived from egg white protein (EWPn) were developed as carriers for essential oils (AEs) with well-documented biological activity. These nanoparticles containing AEs exhibited suitable physicochemical stability, appropriate encapsulation efficiency, and significant inhibitory activity against key enzymes involved in the pathophysiology of DM2, supporting their potential as functional platforms. Subsequently, the formation of coacervates with high methoxyl pectin (PAM) enhanced the systems' stability and functionality, resulting in a significant downregulation of the glucose transporter genes SGLT1 and GLUT2 in Caco-2 cells, without compromising the bioaccessibility of the encapsulated compounds.

Finally, the designed encapsulation systems were incorporated into breads, whose analysis showed that their addition did not significantly alter the technological properties or sensory acceptability of the product. Functionally, post-digestion extracts retained partial antioxidant activity, and in some cases, a favorable modulation of glucose release was observed.

In conclusion, this thesis provides relevant scientific evidence supporting the use of protein–polysaccharide encapsulation technologies to improve the stability and bioactivity of sensitive CBs, and demonstrates the feasibility of their application in baked food matrices as effective delivery systems. These findings open new avenues in the design of functional foods aimed at dietary management of metabolic diseases such as DM2, and lay the groundwork for future *in vivo* studies and clinical applications.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### 1.1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades epidémicas crónicas con mayor prevalencia en todo el mundo. En 2019, la DM afectó globalmente a más de 500 millones de personas de 20 a 79 años, y se espera que este número aumente a 700 millones en 2045. Hasta el momento, el costo asociado a esta enfermedad se ha estimado en 1.000 billones de dólares y podría alcanzar los 1.054 billones de dólares en 2045 (1).

La DM se define como un conjunto de alteraciones metabólicas caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia sostenida) debido a defectos en la secreción de insulina o en su acción a nivel periférico en el organismo (o ambas deficiencias a la vez). A su vez, la DM provoca anomalías en el metabolismo de grasas y proteínas. La DM se puede clasificar principalmente en DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2) y DM gestacional:

La **DM1** se considera una enfermedad autoinmune, donde el sistema inmune ataca y destruye células pancreáticas y, como resultado, este órgano no es capaz de producir insulina. Entre el 5 y 10% de los pacientes con DM son afectados por DM1 (2).

La **DM2** se considera una enfermedad prevenible mediante cambios en la dieta, y en el estilo de vida en general, que ayuden a controlar los niveles de glucosa en plasma. Este tipo de DM está relacionado con una respuesta inadecuada a la insulina (sensibilidad reducida a insulina) y con la resistencia a la insulina (RI) en tejidos periféricos, provocando que la glucosa se acumule en la sangre. Además, esta patología se asocia con complicaciones a largo plazo, tales como enfermedades cardiovasculares y nefropatía. Para controlar la DM2 se estimula la secreción de insulina a través de medicamentos y/o una dieta apropiada interrumpiendo o disminuyendo la digestión de almidón, con el propósito de disminuir la velocidad de absorción de azúcar en sangre desde el intestino delgado. Entre el 90 y 95% de los pacientes con DM son afectados por DM2 (3).

La **DM gestacional** puede manifestarse en mujeres embarazadas debido a desequilibrios hormonales que ocurren durante el estado gestacional (3).

Otras formas de DM son la diabetes juvenil, que es una forma genética de diabetes, la diabetes autoinmune latente en adultos y la diabetes secundaria resultante de otras patologías como la pancreatitis o el uso prolongado de algunos medicamentos tales como los corticoides (3).

#### 1.1.1. Factores de riesgo y fisiopatología de DM2

Diversos factores de riesgo se relacionan con el desarrollo de DM2, conformando una compleja combinación de factores genéticos, metabólicos y ambientales que interactúan unos con otros contribuyendo a la prevalencia de la enfermedad. Aunque la predisposición de un individuo a padecer DM2



debido a factores no modificables (*e.g.*, genéticos, étnicos, etc.) juega cierto rol en el desarrollo de la enfermedad, la evidencia presentada en estudios epidemiológicos sugiere que la mayoría de los casos de pacientes con DM2 pueden ser prevenidos atendiendo a los principales factores de riesgo modificables asociados, tales como obesidad, sedentarismo y dietas no saludables (4). En primer lugar, la obesidad se asocia con anomalías metabólicas que resultan en RI. Sin embargo, el mecanismo por el cual este factor induce RI y DM2 no ha sido completamente elucidado hasta el momento. Por otro lado, se han señalado tres beneficios principales de una actividad física sostenida en el tiempo frente al desarrollo de DM2: (i) la contracción de células del músculo esquelético induciría el incremento del flujo sanguíneo dentro del músculo, aumentando de este modo la captación de glucosa desde el plasma; (ii) la reducción de grasa intrabdominal evitaría o retardaría la condición de RI; y (iii) la reversión (debido a la actividad física) de las condiciones de inflamación y estrés oxidativo disminuiría la predisposición para el desarrollo de DM2 (4). Finalmente, una dieta rica en fibras, ácidos grasos omega-3 y pigmentos vegetales (*e.g.*, resveratrol, cianidina, curcumina, etc.) y la disminución del consumo de grasas trans, grasas saturadas y colesterol puede ser beneficioso para la prevención o control de DM2 (5).

En el organismo, los niveles altos de glucosa en sangre son ocasionados por anomalías en la acción y/o secreción de insulina. La insulina es una hormona producida y secretada por las células  $\beta$  pancreáticas y su función principal es mantener la homeostasis de la glucosa a través de la estimulación de la absorción de glucosa en tejidos sensibles a insulina (tales como músculo esquelético y tejido adiposo), y de la inhibición de la producción de glucosa en el hígado. A su vez, la glucosa es el principal regulador de la secreción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas, lo que se lleva a cabo mediante el desencadenamiento de una cascada de eventos de estímulo-respuesta. Las células  $\beta$  poseen la capacidad de censar los niveles de glucosa circulante y secretar la cantidad apropiada de insulina para mantener la glucosa de la sangre en un rango normal. Cuando estos niveles aumentan (por ejemplo, luego de la ingesta de alimentos), la glucosa es transportada dentro de las células  $\beta$  mediante difusión facilitada a través de un transportador de glucosa denominado GLUT2 (6).

Existen dos mecanismos generales relacionados con niveles altos de glucosa en sangre que desembocan en el desarrollo de DM2: (i) cuando se produce la disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas, la secreción de insulina se reduce y se limita la capacidad de homeostasis de la glucosa; y (ii) cuando se induce la RI, la producción de glucosa por parte del hígado se ve aumentada mientras que la absorción de glucosa por parte del músculo, hígado y tejido adiposo disminuye (4). La disfunción de células  $\beta$  pancreáticas se ha asociado con la muerte celular. Sin embargo, estudios recientes han sugerido que este fenómeno podría deberse a una red más compleja de interacciones entre el medioambiente y diferentes vías moleculares implicadas en biología celular. En un estado nutricional excesivo, como puede ser en condiciones de obesidad, puede generarse una situación de hiperglucemia e hiperlipidemia, favoreciendo la RI y la inflamación crónica. Bajo estas circunstancias, las células  $\beta$  se encuentran afectadas por estrés inflamatorio, estrés metabólico/oxidativo, estrés por acumulación de amiloide, etc., lo que podría, en última instancia,

conducir a la pérdida de la integridad de los islotes de Langerhans (donde se encuentran estas células) (4). Por otra parte, la RI refiere a la disminución de la sensibilidad y de la capacidad de respuesta metabólica por parte de las células sensibles a la insulina ante niveles normales de esta hormona en circulación. Esta situación no sólo conlleva a una captación de glucosa deficiente, sino que también provoca la secreción de insulina en exceso por parte de las células  $\beta$  con el fin de compensar la resistencia a la hormona. Dado que estas células no son capaces de sostener indefinidamente la sobreproducción de insulina (hiperinsulinemia), se induce su disfunción, en primer lugar, y posterior muerte. Al alcanzar esta última instancia, la patología adquiere la clasificación de DM1. La RI se asocia con estados de adiposidad visceral, intolerancia a la glucosa, hipertensión, dislipidemia, disfunción endotelial, estrés oxidativo y niveles elevados de marcadores de la inflamación. Generalmente, la RI ocurre en adultos mayores, aunque la prevalencia de esta condición se ha incrementado en individuos de todas las edades, incluyendo niños y jóvenes con sobrepeso y estilo de vida sedentario (7).

### **1.1.2. Complicaciones asociadas a DM2**

Está sólidamente sustentado que la DM puede conducir a diversas complicaciones que afectan múltiples órganos (riñones, hígado, corazón, ojos, etc.) y sistemas (fundamentalmente, nervioso y cardiovascular).

Las complicaciones macrovasculares asociadas a DM incrementan el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, las cuales representan la causa más frecuente de muerte en pacientes diabéticos. Entre ellas, la aterosclerosis es una enfermedad en la que aparecen depósitos de lípidos sobre las paredes internas de las arterias conduciendo, en última instancia, a la obstrucción del flujo sanguíneo. Esta situación favorece la incidencia de enfermedades derivadas (enfermedades cerebrovasculares, enfermedad de las arterias coronarias y enfermedad vascular periférica, entre otras). Particularmente, la hiperglucemia crónica induce la disfunción endotelial a través de diversos mecanismos tales como reducción de la vasodilatación, incremento de la vasoconstricción, incremento de la exposición a radicales libres y alteración de la función de las células endoteliales, facilitando las condiciones proaterogénicas. La hiperglucemia sostenida en el tiempo incrementa la circulación de citoquinas responsables de la inflamación, lo que favorece la evolución de la aterosclerosis. Además, la dislipidemia que se induce en pacientes diabéticos (caracterizada por elevados niveles de triglicéridos, de lipoproteínas ricas en triglicéridos y de colesterol LDL pequeño y denso, y reducidos niveles de colesterol HDL) aumenta el riesgo de padecer aterosclerosis (4).

Ciertas enfermedades derivadas de DM, como la retinopatía, nefropatía y neuropatía, reflejan disfunciones microvasculares sistémicas. La retinopatía diabética es una complicación relacionada con DM que provoca daños en los vasos sanguíneos de la retina, afectando a los ojos. Es una de las principales causas de discapacidad visual entre personas de 20 a 74 años y ocupa el quinto lugar como causa más

frecuente de ceguera evitable en todo el mundo. La hiperglucemia es central en el deterioro de capilares retinianos, provocando daños endoteliales y la aparición de microaneurismas. Al mismo tiempo, los niveles alterados de citocinas inflamatorias ante una condición de DM provocan inflamación crónica y mayor permeabilidad vascular, contribuyendo a la generación de edema macular diabético. A medida que la afección progresa, la isquemia sostenida provoca la liberación de factores proangiogénicos que promueven la neovascularización y tienen el potencial de desencadenar complicaciones graves, como hemorragia vítrea o desprendimiento de retina en la retinopatía proliferativa (8).

La nefropatía diabética es otra complicación derivada de la DM que afecta al 30-50% de las personas con DM2. Se caracteriza por un aumento de la excreción de albúmina en orina o una disminución de la tasa de filtración glomerular, y presión arterial elevada. Implica alteraciones en la función glomerular, desequilibrio hormonal y glicosilación de proteínas. Niveles elevados de glucosa en sangre inducen la glicosilación de las proteínas glomerulares, favoreciendo la proliferación de células mesangiales, la expansión de la matriz mesangial y el deterioro del endotelio vascular. La progresión de la enfermedad se caracteriza por el engrosamiento de la membrana basal glomerular y la aparición de lesiones características, y puede conducir a una enfermedad renal crónica (8).

La neuropatía diabética consiste en la pérdida progresiva de las fibras nerviosas, lo que resulta en una serie de manifestaciones clínicas como dolor, parestesia y disminución de la sensación. Las alteraciones vasculares, y la consiguiente pérdida de fibras nerviosas distales, pueden comenzar incluso en individuos con tolerancia a la glucosa alterada antes de afectar a las fibras nerviosas en las extremidades inferiores. El mecanismo subyacente a esta enfermedad involucra cascadas de señalización metabólicas impulsadas por una hiperglucemia prolongada, en las cuales se favorece la formación de productos finales de glicosilación avanzada, la liberación de citoquinas, el estrés oxidativo, entre otros factores. De este modo, las alteraciones metabólicas contribuyen al daño del nervio periférico y provocan predominantemente la degeneración de las fibras nerviosas distales (8).

La enfermedad de hígado graso no alcohólico es altamente prevalente en pacientes diabéticos, la cual parece estar condicionada, fundamentalmente, por la RI desencadenada a partir de la DM2. En primer lugar, las alteraciones en el metabolismo de lípidos y la inflamación del tejido adiposo y del depósito de grasa ectópica conducen a una situación de RI en el organismo. Consecuentemente, la lipólisis del tejido adiposo disminuye (debido a fallas en las vías de señalización de insulina), generando elevados niveles de ácidos grasos libres en la circulación. Así, aumenta el transporte de estos ácidos grasos libres hacia el hígado, donde se estimula la síntesis de triglicéridos. Además, la acumulación de grasa hepática en exceso se intensifica debido a la oxidación deficiente de los ácidos grasos (9).

Por otro lado, la DM es considerada como un factor de riesgo para enfermedades neurodegenerativas. El estrés oxidativo que se genera en el organismo de pacientes diabéticos puede dañar casi todas las moléculas de una célula, lo que conduce a disfunción y posterior muerte celular. Cuando esto ocurre en la

célula dopaminérgica, es posible que se desarrolle la enfermedad de Parkinson. Además, la hiperglucemia conduce a la disfunción de la glicosilación y agregaciones de proteínas. La glicosilación anormal de proteínas tales como la  $\alpha$ -sinucleína provoca la activación exacerbada de la microglía, lo que desencadena el aumento de citoquinas proinflamatorias. A su vez, estas citoquinas alteran la actividad de receptores tipo Toll, los cuales pueden aumentar la inflamación y permeabilidad intestinal, impulsando la agregación de  $\alpha$ -sinucleína en el intestino o el cerebro. Adicionalmente, la RI favorece la progresión de la enfermedad de Parkinson mediante el impacto negativo que genera sobre la función mitocondrial (10).

La DM2 se asocia con cambios en la cognición y la disfunción cognitiva, representando un alto riesgo de desarrollar cualquier tipo de trastorno neurocognitivo, incluyendo la enfermedad de Alzheimer. La RI disminuye la disponibilidad de glucosa necesaria para las transmisiones sinápticas neuronales, debido a la deficiencia de ciertos metabolitos producidos en la vía glucolítica, como la coenzima A y la succinil coenzima A, precursores claves para la síntesis del principal neurotransmisor relacionado a la cognición (acetilcolina). Además, la disfunción en las vías de señalización de insulina afecta principalmente la eficiencia de fosfatidilinositol-3-quinasa, lo que conduce a la degeneración del tejido nervioso. El cerebro es particularmente vulnerable al daño oxidativo y a la disfunción mitocondrial debido a la alta tasa metabólica de las neuronas, su dependencia de las mitocondrias para obtener energía y su baja capacidad antioxidante (11).

Existe una alta prevalencia de trastornos depresivos graves en pacientes diabéticos. Una de las causas más importantes es la adaptación a un nuevo estilo de vida que estos individuos deben afrontar al momento de comenzar el tratamiento para la DM, modificando su dieta y actividades cotidianas. El estrés que puede causar el diagnóstico de DM conlleva a que el organismo libere un exceso de catecolaminas y cortisol al torrente sanguíneo, hormonas claves en el posterior desarrollo de trastornos depresivos (12).

En síntesis, directa o indirectamente, la DM2 puede generar trastornos en diversos sistemas, tales como el sistema cardiovascular, digestivo, hepático y musculoesquelético, así como también alterar la función cognitiva y afectar la salud mental.

### **1.1.3. Diagnóstico médico y tratamiento farmacológico de la DM2**

Por lo general, la etapa temprana de la DM2 suele ser asintomática o presentar síntomas leves que pueden no ser percibidos. Por este motivo, el diagnóstico médico de la DM2 en un paciente puede llevarse a cabo muchos años después de la aparición de la enfermedad. Esta situación dificulta la estimación exacta de la cantidad de personas que padecen DM2. En ausencia de síntomas, la DM2 se diagnostica cuando la glucosa plasmática en ayunas es mayor o igual a  $126 \text{ mg dL}^{-1}$ , cuando la prueba de tolerancia oral a la glucosa resulta mayor o igual a  $200 \text{ mg dL}^{-1}$  o cuando la hemoglobina glicosilada es mayor o igual a  $48 \text{ mmol mol}^{-1}$ . Los síntomas de la DM2 incluyen poliuria, sed y hambre excesivos, fatiga, visión borrosa,

hormigueo, dolor o entumecimiento de manos y pies y curación lenta de las heridas. Si estos síntomas están presentes, la DM2 se diagnostica cuando la glucosa en sangre es mayor o igual a 200 mg dL<sup>-1</sup> (13).

En primer lugar, la intervención sobre los factores de riesgo modificables (*e.g.*, obesidad, sedentarismo, dieta, tabaquismo, etc.) suele ser extremadamente eficaz para evitar o contrarrestar los efectos de la DM2. Para el caso de personas con DM2 avanzada, es posible retrasar la progresión de la enfermedad y, a la vez, mejorar la calidad de vida (13).

Hasta el momento, no se dispone de fármacos capaces de curar la DM2. Sin embargo, existen medicamentos que ejercen efectos clínicos a través de diferentes mecanismos: (i) biguanidas, como la metformina, que disminuyen la gluconeogénesis en el hígado; (ii) secretagogos de insulina, como las sulfonilureas, que estimulan al páncreas a segregar insulina; (iii) sensibilizadores de la insulina, como las tiazolidinedionas, que mejoran la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina; (iv) inhibidores de enzimas, como la acarbosa, que inhiben la actividad de enzimas clave en el metabolismo de los carbohidratos; y (v) la hormona insulina o sus análogos, proporcionando al organismo insulina recombinante de forma exógena, entre otros (13). La metformina forma parte de la farmacoterapia de primera línea para el tratamiento de DM2. Además de reducir los niveles de glucosa, tiene un efecto de sensibilización a la insulina con múltiples acciones en órganos y tejidos, tales como el hígado, ovario, músculo esquelético, endotelio y tejido adiposo. Lamentablemente, esta droga posee varios efectos secundarios (desde leves a graves) y la mayoría de los pacientes son reacios a continuar con el tratamiento. Las sulfonilureas disminuyen el nivel de glucosa en sangre al aumentar la secreción de insulina en el páncreas mediante el bloqueo de los canales de potasio sensibles al ATP. También limitan la gluconeogénesis y la eliminación de insulina en el hígado, y disminuyen la descomposición de los lípidos en ácidos grasos. El principal efecto secundario de las sulfonilureas es la hipoglucemia, pero también es común que el paciente presente dolor de cabeza, mareo, náuseas, reacciones de hipersensibilidad y aumento de peso. Por otro lado, las tiazolidinedionas mejoran la acción de la insulina y facilitan la absorción de glucosa en numerosos tejidos. Los mecanismos de acción incluyen disminución de la acumulación de ácidos grasos libres, reducción de las citoquinas inflamatorias, aumento de los niveles de adiponectina y preservación de la integridad y función de las células  $\beta$  pancreáticas. Sin embargo, las tiazolidinedionas no son administradas como terapia de primera línea y se debe considerar la relación riesgo-beneficio ya que, combinadas con insulina, provocan insuficiencia cardíaca (14). La acarbosa, como otros inhibidores enzimáticos, reduce la digestión de polisacáridos (PSs) en el intestino delgado mediante la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa. Esta droga presenta efectos adversos a nivel gastrointestinal, tales como hinchazón y dolor abdominal, diarrea, etc., los cuales se deben a la fermentación de la maltosa acumulada debido a la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa (15). Finalmente, la terapia con insulina se lleva a cabo en pacientes diabéticos recientemente identificados y con claros análisis clínicos y/o síntomas de la enfermedad (*e.g.*, pérdida de peso, cetosis, hiperglucemia, poliuria, polidipsia, etc.). Las inyecciones de insulina pueden causar pérdida o aumento de peso y su administración provoca el ingreso de potasio dentro de las células,

por lo que puede causar hipopotasemia. Adicionalmente, los componentes que se utilizan en la preparación de este medicamento son potencialmente alérgenos (14).

Además, no se han obtenido resultados satisfactorios mediante la monoterapia al intentar controlar los niveles de glucosa en sangre de los pacientes y, por lo tanto, el abordaje de la DM2 requiere un enfoque terapéutico combinado mediante la administración de un conjunto de drogas que abarquen diferentes mecanismos de acción. Esta estrategia presenta importantes desventajas, tales como numerosos efectos secundarios, elevada toxicidad en el organismo e interacciones no deseadas entre fármacos. En los últimos años, se ha centrado la atención en el diseño de fármacos que sean capaces de ejercer múltiples acciones fisiológicas. Para ello, es crucial seleccionar y caracterizar los objetivos adecuados para el tratamiento, los cuales deben implicar, preferentemente, diferentes vías de señalización (13).

Ante el contexto epidemiológico descrito y la carencia de fármacos que abarquen (de forma individual) diferentes mecanismos de acción con escasos y leves efectos adversos asociados, la comunidad científica ha dirigido la atención hacia la búsqueda de compuestos naturales potencialmente eficientes para la prevención y/o el control de la DM2. Diversos medicamentos de origen vegetal se han propuesto hasta el momento para el tratamiento de la DM, los cuales presentan aceptable eficacia, poseen menos efectos secundarios que las drogas sintéticas y costos relativamente bajos. La mayoría de los compuestos naturales con potencial efecto antidiabético se analizan en función de su capacidad de inhibir las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa (2).

## **1.2. Compuestos bioactivos**

Según lo expuesto previamente, la prevención y/o el control de la DM2 puede abordarse mediante la administración de compuestos bioactivos (CBs). Un compuesto bioactivo (CB) es una molécula biológica que tiene la capacidad de interactuar con uno o más componentes de células y/o tejidos vivos, influyendo en funciones fisiológicas y procesos metabólicos de un organismo y presentando, de este modo, uno o varios efectos benéficos sobre la salud humana y/o animal. Los CBs pueden provenir de una fuente vegetal, animal, fúngica, microbiana, etc., y se pueden clasificar dentro de grandes grupos tales como vitaminas (*e.g.*, ácido fólico, colecalfiferol, etc.), ácidos grasos (*e.g.*,  $\alpha$ -linolénico, ácido linoleico, etc.), péptidos bioactivos y fitoquímicos (*e.g.*, fenoles, carotenoides, fitoesteroles, alcaloides, terpenoides, etc.) (16). Entre los posibles orígenes de los CBs, las plantas representan una fuente atractiva y promisoría para la extracción de estas biomoléculas funcionales. Por tal motivo, una extensa variedad de frutos, granos, vegetales, raíces y especias ha sido estudiada en función de sus CBs, derivando en un área de gran interés para investigadores, productores de diversas industrias y consumidores alrededor del mundo debido a las excepcionales propiedades funcionales que poseen sobre la salud humana y animal. Los CBs se destacan principalmente como antitumorales, antimicrobianos, antivirales, cardioprotectores, antioxidantes, antiinflamatorios y antidiabéticos (17).

Los CBs pueden ser hidrofílicos o hidrofóbicos y, en general, son susceptibles a las altas temperaturas, radiación lumínica y oxígeno del aire. Además, cuando son administrados de forma oral en el organismo, los CBs son sometidos a los procesos metabólicos que tienen lugar en el intestino e hígado, donde se transforma la estructura química y se modifica su actividad biológica (18).

### 1.2.1. Vitaminas

Las vitaminas son sustancias requeridas para la correcta función celular, el crecimiento y el desarrollo normal de un organismo. Las vitaminas hidrosolubles (vitamina B y C) no son almacenadas en el cuerpo y deben ser ingeridas en la dieta. Por otro lado, las vitaminas A, D, E y K son liposolubles y son almacenadas en el hígado, músculo y tejido adiposo. Aunque los carotenoides no son estrictamente vitaminas liposolubles, son incluidos en este grupo debido a que 50 de los 600 carotenoides fueron identificados como pro-vitamina A (19). Algunas vitaminas son sintetizadas en el organismo en pequeñas cantidades, mientras que otras deben ser suministradas a partir de productos alimenticios o suplementos.

Las vitaminas se encuentran naturalmente en alimentos o son utilizadas como ingredientes funcionales en diferentes industrias (*e.g.*, industria farmacéutica, cosmética, alimentaria, etc.). En general, son extremadamente sensibles frente a las altas temperaturas, radiación lumínica y oxígeno del aire, por lo que pierden significativamente su eficacia durante el procesamiento de los productos, el transporte y almacenamiento (20). Algunas de sus funciones biológicas son potenciar el sistema inmunitario, disminuir los estados de ansiedad y depresión, reducir el riesgo de accidente cerebrovascular y los trastornos neurológicos, reducir los niveles de colesterol, regular el nivel de glucosa en sangre, etc. (20).

### 1.2.2. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son moléculas conformadas por cadenas hidrocarbonadas que presentan un grupo carboxilo en un extremo y un grupo metilo en el otro. Las propiedades fisicoquímicas y biológicas están determinadas por la longitud de la cadena hidrocarbonada y por el número y posición de sus dobles enlaces. Los ácidos grasos saturados no contienen doble enlaces formando parte de su cadena, mientras que los ácidos grasos insaturados presentan al menos un doble enlace. Los ácidos grasos de mayor interés tecnológico y funcional corresponden a los ácidos grasos poliinsaturados, es decir, aquellos que presentan más de un doble enlace en su cadena hidrocarbonada (21). A su vez, el cuerpo humano es capaz de producir todos los ácidos grasos que requiere, con excepción del ácido  $\alpha$ -linolénico y el ácido linoleico, ambos poliinsaturados. Por este motivo, a dichos ácidos grasos se los denomina esenciales (22).

Las moléculas de ácidos grasos poliinsaturados son anfifílicas, fundamentalmente de naturaleza lipídica, formadas por una larga cadena de hidrocarburos lineales (cola hidrofóbica) cuyo extremo presenta un grupo carboxilo (cabeza hidrofílica). Las colas hidrofóbicas les confieren a estas moléculas una muy

baja solubilidad en agua. Los doble enlaces que forman parte de los ácidos grasos son altamente susceptibles a reacciones iniciadas por radicales libres. Cuando estas reacciones ocurren, los ácidos grasos insaturados son degradados y, consecuentemente, aparecen moléculas tóxicas altamente reactivas (23). El consumo de aceites vegetales con elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados está asociado, fundamentalmente, con una baja incidencia de enfermedades cardiovasculares, trastornos neurológicos y cáncer (22).

### 1.2.3. Péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos son fragmentos derivados de proteínas capaces de provocar efectos positivos sobre la salud al ser consumidos. En el organismo, son liberados a partir de la proteólisis enzimática durante la digestión gastrointestinal. Además, se pueden obtener *in vitro* mediante el uso de proteasas de grado alimenticio, o durante el procesamiento de los alimentos (24).

La actividad biológica de los péptidos evaluada *in vitro* resulta diferente a lo observado *in vivo* debido a que son altamente susceptibles a la descomposición por acción de enzimas fisiológicas. Cuando esto sucede, se obtienen fragmentos inactivos que condicionan la biodisponibilidad y absorción de las moléculas iniciales. Por lo tanto, para evitar la pérdida de la capacidad biológica de estos CBs es necesario garantizar su resistencia frente a las proteasas gastrointestinales y asegurar la correcta absorción en el intestino (24).

Los péptidos bioactivos han demostrado capacidad neuroprotectora, antitumoral, antimicrobiana, antihipertensiva, antioxidante, entre otras. Alimentos que naturalmente contienen estos péptidos bioactivos pueden potencialmente ayudar a prevenir enfermedades cardiovasculares, cáncer, DM2, etc. (24).

### 1.2.4. Fitoquímicos

Los fitoquímicos son una de las clases más importantes de CBs debido a la gran heterogeneidad de las moléculas que comprende dicha clasificación. Se encuentran ampliamente distribuidos en plantas, donde son producidos como metabolitos secundarios. Algunos de ellos son responsables del color y aroma que presentan los diferentes órganos vegetales, mientras que otros cumplen la función de otorgar protección y resistencia frente a factores externos (25). En particular, los compuestos fenólicos son fitoquímicos de gran interés científico y tecnológico que poseen una estructura química general caracterizada por la presencia de al menos un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo, y su actividad biológica depende fuertemente de esta estructura. Los principales grupos de compuestos fenólicos corresponden a flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos y lignanos (26). Por otro lado, los carotenoides constituyen un grupo de pigmentos naturales que, cuando se encuentran en grandes cantidades, otorgan color intenso a frutos y vegetales (*e.g.*, pimiento, tomate, zanahoria, mango, espinaca, etc.) (27).



Los fitoquímicos se han utilizado como agentes antimicrobianos, antitumorales, antiinflamatorios, antioxidantes, antidiabéticos, entre otros. Sin embargo, el empleo de estos CBs en la producción de fármacos, cosméticos y alimentos es limitada debido a su baja solubilidad en agua, baja estabilidad frente a los cambios de pH y las altas temperaturas, elevada sensibilidad a la radiación y baja biodisponibilidad (28).

### 1.3. Encapsulación de compuestos bioactivos

Como se mencionó previamente, los CBs son extremadamente inestables cuando se exponen a temperaturas elevadas, radiación UV, oxígeno, cambios de pH, radicales libres y enzimas digestivas. Adicionalmente, algunos de ellos son volátiles a temperatura ambiente y presentan baja solubilidad en agua. Esta problemática afecta las propiedades químicas y biológicas de los CBs, limitando su empleo en la industria o exigiendo la incorporación de mayores cantidades para alcanzar el efecto deseado en un producto u organismo (29).

La encapsulación es una estrategia que permite proteger, estabilizar y/o inmovilizar CBs con el objetivo de preservar sus propiedades químicas y biológicas. Por definición, es un proceso tecnológico en el cual una sustancia de interés (denominada molécula huésped, núcleo o ligando) es recubierta, atrapada y/o vehiculizada en otra sustancia (material de pared, cubierta, vehículo o *carrier*), produciendo partículas (sistemas de encapsulación o de *delivery*) de tamaño micrométrico (microencapsulación) o nanométrico (nanoencapsulación). Tras el proceso de encapsulación, la liberación de la sustancia de interés puede ser modulada, dirigiendo su acción hacia un sitio específico y/o prolongando la duración del efecto deseado (30).

#### 1.3.1. Métodos de encapsulación

Existen numerosos métodos de encapsulación que pueden clasificarse en dos grandes grupos dependiendo del enfoque fisicoquímico involucrado: métodos de arriba hacia abajo (*top-down*) y métodos de abajo hacia arriba (*bottom-up*) (31). Algunos de ellos se representan en la Fig. 1.

Dentro de los **métodos *top-down*** se encuentran la molienda, homogeneización y extrusión. Consisten en romper un material sólido o líquido en partículas de menor tamaño. Por lo general, estos enfoques se basan en tres tipos de fuerzas disruptivas para descomponer las partículas: cizallamiento, impacto y compresión. La principal desventaja que presenta es la dificultad para obtener partículas con tamaño y propiedades estructurales bien definidas (31).

En la molienda, se coloca una carga de polvo conveniente en un molino de alta energía, junto con un medio de molienda adecuado, con el objetivo de reducir el tamaño de las partículas e incorporarlas en

diferentes fases (32). Por otro lado, la homogeneización implica, en primer lugar, la obtención de una emulsión mezclando dos líquidos inmiscibles. Posteriormente, la fase interna es gelificada mediante tratamiento térmico o el empleo de agentes gelificantes. Existen distintos tipos de emulsión tales como agua en agua, donde se mezclan dos soluciones de polímeros y agua en aceite, donde se mezcla una fase oleosa con una fase acuosa que posee el polímero en solución (31). Por último, la extrusión consiste en tomar una la solución de polímero con una jeringa y forzarla a pasar a través de una aguja goteando sobre una solución gelificante (31).

Por otro lado, dentro de los **métodos *bottom-up*** se encuentran la precipitación por desolvatación, coacervación, formación de complejos de inclusión, formación de partículas de gel fluido, etc. Consisten en la construcción de partículas por autoensamblado de las moléculas individuales, inducida por cambios en las condiciones del medio (*e.g.*, pH, fuerza iónica, temperatura, concentración, etc.). La energía requerida para estos métodos es menor que para los métodos *top-down* y permiten controlar diferentes propiedades de las partículas obtenidas, tales como tamaño, morfología y estado físico (31).

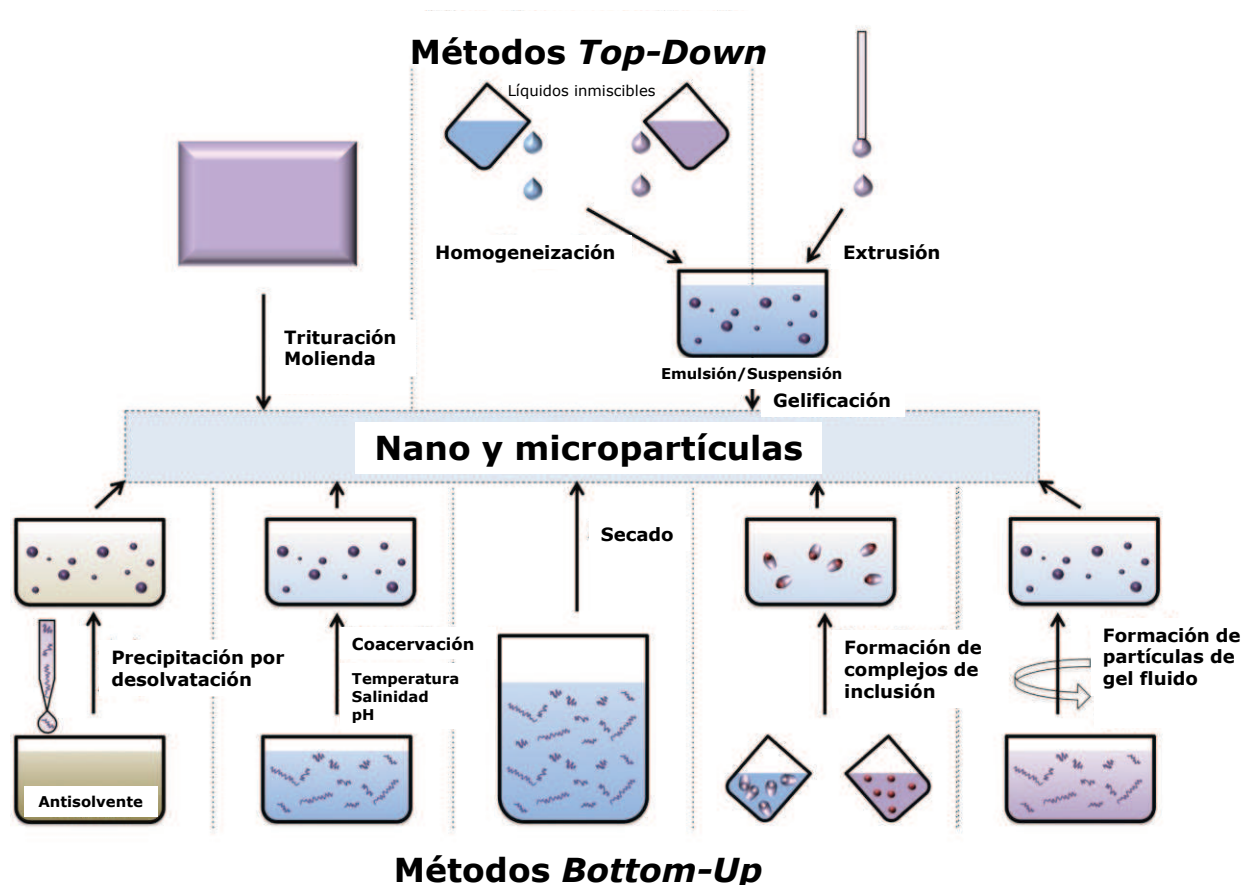
La precipitación por desolvatación consiste en la agregación de moléculas de un polímero (solute) en solución, inducida por una disminución de la polaridad del solvente que rodea a las moléculas de dicho polímero, de modo tal que se induce una sobresaturación, lo que constituye la fuerza impulsora para la agregación y posterior precipitación del soluto. Comúnmente, esto se logra mediante la adición de un alcohol a una solución acuosa (en caso de polímeros polares) o viceversa (para polímeros no polares). Cuando se alcanza cierto contenido crítico de alcohol, las moléculas de soluto tienden a autoensamblarse espontáneamente conduciendo a la formación de agregados. Los solventes deben ser miscibles en el rango de concentraciones utilizadas para la obtención de las partículas. Posteriormente a la formación de las partículas, debe existir una repulsión suficientemente fuerte entre ellas para evitar la agregación excesiva. Es una técnica ampliamente utilizada en la producción de nanopartículas para la industria farmacéutica (33).

La coacervación implica la obtención de partículas empleando dos polímeros con cargas opuestas que interactúan entre sí a través de atracciones electrostáticas, principalmente, aunque también pueden ocurrir otras interacciones, tales como interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Una vez formadas estas partículas, se lleva a cabo el proceso de separación de fases mediante la modificación controlada de las condiciones del medio (*e.g.*, pH, fuerza iónica, temperatura, solubilidad, etc.). De este modo, en una de las fases precipitan la mayoría de las partículas (coacervados), mientras que en la otra fase permanecen pequeñas cantidades en solución (34).

La formación de complejos de inclusión consiste en la obtención de un vehículo o *carrier* que contenga cavidades donde, a través de puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o interacciones hidrofóbicas, pueda asociarse la sustancia de interés (huésped). Los polímeros que comúnmente se utilizan son PSs y oligosacáridos, tales como amilosa, ciclodextrinas y sus derivados (35).

La formación de partículas de gel fluido implica la aplicación de fuerzas de corte en una solución de polímero que se somete a gelificación, lo que dificulta su clasificación como un método exclusivamente de *top-down* o *bottom-up*. El proceso de gelificación debe ocurrir de manera uniforme en todo el sistema para producir partículas con distribución de tamaño angosta. Las partículas obtenidas pueden deformarse fácilmente y manifestar forma irregular. Las suspensiones de partículas resultantes encuentran aplicación como sustitutos de grasa debido a sus propiedades reológicas específicas (31).

Por último, entre las estrategias utilizadas para obtener partículas en estado sólido, se destacan dos técnicas de secado ampliamente empleadas en la industria alimentaria y farmacéutica: el secado *spray* y la liofilización. En primer lugar, el secado *spray* (*spray-drying*) consiste en la atomización de una solución o suspensión de partículas en finas gotas que se introducen en una corriente de aire caliente, generando la evaporación rápida del solvente. Como resultado, se obtienen microesferas o microgeles con diámetros que varían entre 1 y 10  $\mu\text{m}$ . Las propiedades de las partículas pueden controlarse mediante la especificación de la velocidad del flujo de aire, concentración de soluto, temperatura y método de atomización. Esta técnica utiliza dispersiones acuosas y, por lo tanto, evita el uso de solventes orgánicos. El secado *spray* es ampliamente utilizado en la industria alimentaria para la encapsulación de vitaminas, minerales, aceites y compuestos que otorgan color y sabor (36). Por otro lado, el secado mediante la técnica de liofilización (*freeze-drying*) conlleva varias etapas que implican la congelación, sublimación y desorción de la solución o suspensión de partículas. En general, las muestras liofilizadas son fáciles de reconstituir y tienen una larga vida útil. Sin embargo, esta técnica presenta algunas desventajas tales como la gran cantidad de energía requerida, el tiempo de secado prolongado y los costos elevados. En particular, la liofilización es adecuada para el secado de compuestos que presentan elevada volatilidad (37).



**Figura 1.** Representación esquemática de diferentes métodos de encapsulación *top-down* y *bottom-up* utilizados en la producción de micro y nanopartículas (Figura modificada de Joye y McClements (2014) (31)).

### 1.3.2. Sistemas de encapsulación

Los sistemas de encapsulación pueden clasificarse según la naturaleza química del material de pared utilizado, que puede corresponder a lípidos, surfactantes, PSs o proteínas (Fig. 2).

Los sistemas de encapsulación que emplean lípidos y surfactantes comprenden una variedad de estructuras como liposomas, nanoemulsiones, nanopartículas lipídicas sólidas, lípidos nanoestructurados, micelas y suspensiones, cuyas características particulares permiten incorporar y proteger CBs, especialmente aquellos de naturaleza lipofílica.

Los liposomas son vesículas concéntricas que consisten en bicapas lipídicas y su estructura se asemeja a la de las membranas celulares. Los liposomas pueden incorporar compuestos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. Los compuestos hidrofílicos pueden quedar atrapados en el espacio acuoso interno, mientras que los compuestos hidrofóbicos pueden incorporarse entre las bicapas lipídicas. El diámetro de estos sistemas varía considerablemente entre valores nanométricos y micrométricos (38).

Las nanoemulsiones son dispersiones coloidales termodinámicamente inestables formadas a partir de agua, aceite y un surfactante. Las nanoemulsiones aceite en agua consisten en partículas lipídicas esféricas dispersadas en el seno de un medio acuoso que presentan una estructura de tipo núcleo-cubierta (*core-shell*). El núcleo hidrofóbico está conformado por las moléculas de lípidos y el segmento no polar del surfactante, mientras que la cubierta hidrofílica corresponde al segmento polar del surfactante. Típicamente, las sustancias de interés hidrofóbicas se mezclan con la fase oleosa previo a la homogeneización, aunque también pueden ser incorporadas luego de la formación de la nanoemulsión (38).

Las nanopartículas sólidas lipídicas son sistemas que contienen gotas de lípido completamente cristalizadas y poseen una estructura cristalina altamente ordenada con la sustancia de interés formando parte de esta. Las nanopartículas sólidas lipídicas son producidas a partir de un lípido o una mezcla de lípidos sólidos. La liberación de la sustancia de interés puede ser controlada a través del estado físico de la matriz lipídica (38).

Los lípidos nanoestructurados son nanopartículas sólidas lipídicas modificadas en las que la fase lipídica contiene tanto lípidos sólidos (grasa) como líquidos (aceite) a temperatura ambiente. El aceite se incorpora en el centro de un lípido sólido. En general, este tipo de sistema puede incorporar grandes cantidades de moléculas de interés y promover su liberación controlada. La matriz sólida constituye una barrera que puede proteger a las sustancias sensibles a factores de deterioro de la fase acuosa (38).

Las micelas son sistemas termodinámicamente estables que se forman espontáneamente cuando un surfactante y otros componentes son agregados a un medio acuoso bajo condiciones adecuadas. Las micelas están compuestas solo de surfactantes y presentan diámetros menores a 20 nm (39).

Las suspensiones son partículas libres de sustancias *carrier*, formadas sólo por cristales del CB puro y cantidades mínimas de polímero o surfactante que cumplen la función de estabilizar el sistema. Mediante su obtención es posible mejorar la solubilidad y velocidad de disolución de CBs, aumentar la cantidad de moléculas de interés que pueden ser incorporadas y aumentar su estabilidad en estado sólido. De este modo, se incrementa la adsorción oral, la resistencia a la hidrólisis y a la oxidación y, consecuentemente, aumenta la biodisponibilidad (39).

En el caso de los sistemas basados en PSs, se pueden distinguir diferentes configuraciones estructurales tales como partículas poliméricas, micelas poliméricas y complejos de inclusión, cuyas propiedades fisicoquímicas y funcionales dependen de la naturaleza y el comportamiento del biopolímero utilizado.

Las partículas poliméricas están formadas por polímeros que pueden ser biodegradables (*e.g.*, alginato, celulosa, quitosano, dextrano, pectinas, etc.) o no biodegradables (*e.g.*, políácido láctico, políácido glutámico, etc.). En general, estos sistemas son capaces de encapsular mayor cantidad de moléculas que los

sistemas compuestos por lípidos, además de presentar mayor estabilidad y permitir una mejor liberación controlada (39).

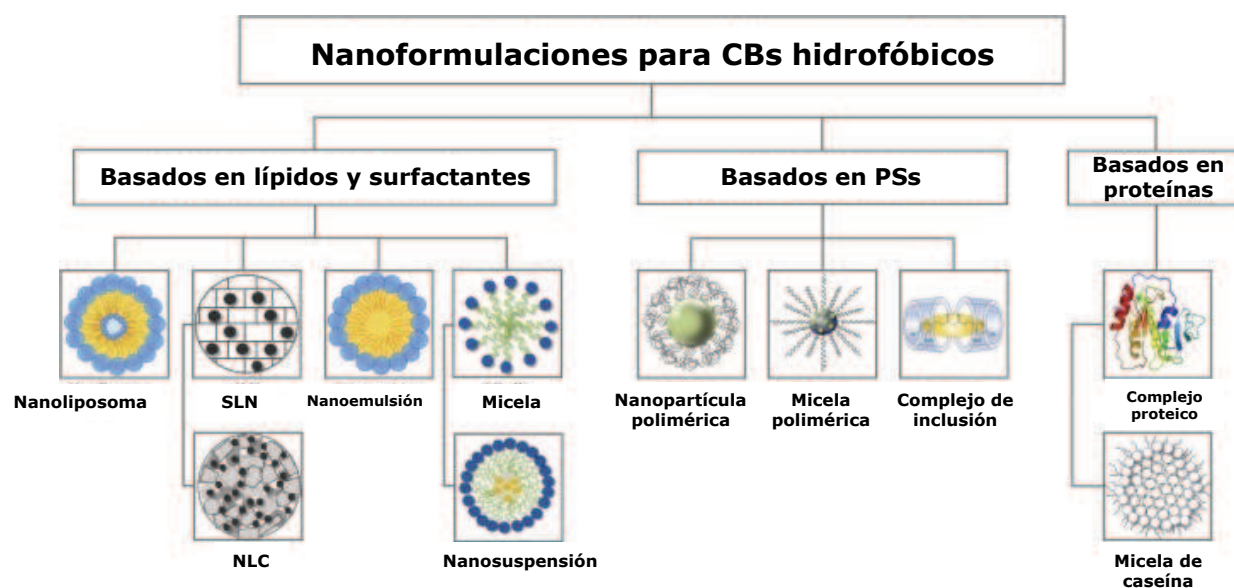
Las micelas poliméricas se forman a partir del autoensamblaje de polímeros anfífilicos a concentraciones superiores a la concentración micelar crítica, produciendo partículas capaces de encapsular grandes cantidades de moléculas de interés que presenten baja solubilidad en agua. Además, poseen baja toxicidad y tamaño pequeño apropiado para aplicaciones farmacológicas (39).

Los complejos de inclusión implican la encapsulación de una molécula “huésped” (ligando) en una cavidad o sitio de una macromolécula “hospedadora” que cumple la función de soporte o vehículo. Las interacciones pueden ser tanto específicas como no específicas, siendo los puentes de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals y las interacciones hidrofóbicas las principales involucradas. Estos sistemas son apropiados para la preservación de moléculas orgánicas volátiles y el enmascaramiento de olores y sabores en productos farmacéuticos, cosméticos y alimenticios (40).

Dentro de los sistemas de encapsulación basados en proteínas, se destacan las micelas de caseína y una amplia variedad de complejos proteicos formados por gelatina, proteínas del suero, proteínas de soja, proteínas de la leche, zeína o albúminas, cuyas propiedades estructurales permiten vehicular CBs mediante diversas interacciones específicas.

Las caseínas, especialmente la  $\beta$ -caseína, son polipéptidos anfífilicos que forman micelas espontáneamente, las cuales son capaces de disolver CBs lipofílicos en medios acuosos (39).

Los complejos de proteína son obtenidos gracias a la propiedad intrínseca de varias proteínas de unir ligandos y actuar como *carriers* naturales de CBs. Las proteínas pueden unir espontáneamente, con diferentes afinidades, diversos tipos de moléculas de interés a través de interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, atracciones electrostáticas y fuerzas de van der Waal para dar lugar a la formación de complejos. Además, muchas proteínas (*e.g.*, globulinas, albúminas, etc.) presentan múltiples sitios de unión para moléculas específicas, permitiendo la incorporación de ligandos de diferente estructura química en una sola molécula polipeptídica (41).



**Figura 2.** Clasificación de sistemas de encapsulación (Figura modificada de Shin y col. (2015) (39)).

### 1.3.3. Encapsulación en biopolímeros

La selección del material o la combinación de materiales para la obtención de sistemas de encapsulación depende de varios factores: (i) la capacidad de los componentes para ensamblarse y formar partículas; (ii) el requerimiento de ciertas características fisicoquímicas y funcionales de las partículas (*e.g.*, tamaño, carga, estabilidad frente a determinadas condiciones ambientales, etc.); (iii) las regulaciones que aplican a las diferentes industrias; y (iv) la evaluación de las diversas ventajas que pueden presentar frente a otros materiales (*e.g.*, metodología sencilla, bajo costo, baja toxicidad, alta disponibilidad, etc.) (31).

Por otro lado, el diseño de sistemas de encapsulación destinados a la incorporación en fármacos y alimentos exige que todos sus componentes y operaciones de proceso sean seguros e inocuos según la reglamentación correspondiente. La encapsulación de CBs que permita su incorporación en productos destinados a la prevención y/o el control de la DM2 es factible mediante la utilización de biopolímeros (42).

Los biopolímeros son macromoléculas (formadas por la unión de monómeros) de origen natural, biocompatibles, biodegradables y de baja inmunogenicidad. Entre ellos, los PSs y las proteínas presentan excelentes propiedades que los convierten en materiales adecuados para la encapsulación de CBs (42).

Los PSs son biopolímeros formados por monosacáridos unidos mediante distintos enlaces glucosídicos. La mayoría de los PSs naturales poseen cientos y hasta miles de unidades monoméricas y su estructura molecular depende de la secuencia monomérica. Los homopolisacáridos poseen un solo tipo de monómero mientras que los heteropolisacáridos están formados por diferentes tipos de monosacáridos (43).

Cada polisacárido (PS) presenta propiedades moleculares y fisicoquímicas específicas, definidas por el de tipo, número y secuencia de monosacáridos, y por los enlaces de la cadena polimérica. Dichas

propiedades, entre las cuales se puede mencionar el peso molecular (PM), grado de ramificación, estructura, flexibilidad, carga eléctrica y posibilidad de interacción con otras moléculas, determinan las características funcionales de los PSs (*e.g.*, solubilidad, espesamiento o viscosidad, gelificación, capacidad de retención de agua, actividad superficial, emulsificación, digestibilidad, etc.). De este modo, un PS puede ser considerablemente diferente a otro en cuanto a su estructura y funcionalidad (aún estando conformados por el mismo monosacárido), por lo que estos biopolímeros conforman un grupo ampliamente diverso (43).

Algunos de los PSs más empleados en la obtención de sistemas de encapsulación de CBs son quitosano, alginato, almidones, derivados de celulosa, gomas y pectinas. Estos biopolímeros se utilizan masivamente ya que son abundantes en la naturaleza, se adquieren a bajo costo y son seguros y fáciles de manipular. Además, algunos de ellos presentan actividad antimicrobiana y antioxidante (31).

Por otro lado, las proteínas son biopolímeros lineales compuestos de aminoácidos en configuración  $\alpha$ -L unidos entre sí por enlaces peptídicos. En la naturaleza, se encuentran comúnmente 20 aminoácidos diferentes que se pueden clasificar de acuerdo con las propiedades del grupo lateral como alifáticos, aromáticos, cargados (positivos o negativos) o polares. La estructura molecular de una proteína dependerá de la secuencia de aminoácidos y de las condiciones del medio, tales como exposición a diferentes temperaturas, presión, presencia de solventes, pH y fuerza iónica. Además, las proteínas tienden a adoptar una estructura tal que minimice la energía libre global del sistema (44).

Para la utilización de proteínas en la producción de sistemas de encapsulación, se deben conocer algunas características fisicoquímicas, tales como su temperatura de desnaturalización, punto isoeléctrico (pI), perfil de potencial  $\zeta$  en función del pH, sensibilidad a iones mono o multivalentes y susceptibilidad frente a diferentes enzimas. Estas características permiten establecer condiciones que promuevan la asociación de moléculas proteicas entre sí y/o con otras moléculas no proteicas (43).

En la obtención de sistemas de encapsulación, las proteínas pueden ser utilizadas en forma nativa o modificada física, química o enzimáticamente para modular sus atributos funcionales. Las mismas pueden provenir de fuentes animales o vegetales. Dentro del primer grupo se destacan las proteínas de suero lácteo, caseína, gelatina y albúminas, mientras que entre las principales proteínas de origen vegetal se encuentran las gliadinas, zeínas y proteínas de la soja. Estos biopolímeros son ampliamente utilizados para encapsular CBs debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja inmunogenicidad, abundancia y bajo costo. Además, su carácter anfílico (resultado de la distribución de los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos en su secuencia), le permite formar complejos con CBs hidrofóbicos, permitiendo que estos sean vehiculizados en medios acuosos. De este modo, un ligando poco soluble en agua puede ser atrapado mediante interacciones hidrofóbicas en cavidades o sitios hidrofóbicos de la proteína, mientras que los dominios hidrofílicos del biopolímero permanecen en contacto con las moléculas de agua (31).



En este sentido, el estudio integral de la encapsulación en biopolímeros se vincula directamente con los objetivos centrales de la presente investigación, orientados a optimizar la funcionalidad y el desempeño fisiológico de ingredientes bioactivos en estrategias de prevención y/o control de la DM2.

#### 1.4. Tracto gastrointestinal humano y biodisponibilidad

El tracto gastrointestinal (TGI) humano representa una de las interfaces más grandes entre el organismo y el medioambiente. Bajo su correcto funcionamiento, absorbe nutrientes y, a su vez, brinda protección contra componentes peligrosos para la salud. Según la definición más amplia, el TGI se extiende desde la boca hasta el ano y puede dividirse en los trectos superior e inferior. El TGI superior consiste en la cavidad oral, el esófago, el estómago y el intestino delgado que se divide en tres partes: duodeno, yeyuno e íleon. El TGI inferior comprende el intestino grueso que consiste en el ciego, el colon (que se divide en ascendente, transversal y descendente), el recto y el conducto anal. En el proceso de la digestión, también son importantes las secreciones de las glándulas salivales, el páncreas y el sistema biliar hepático. En la Fig. 3 se representan esquemáticamente los diferentes órganos que componen el TGI humano (45).

La boca es responsable de la masticación y la mezcla de los alimentos con la saliva, que contiene una variedad compleja de componentes, incluida la amilasa, una enzima que cataliza la hidrólisis de almidón en azúcares. Después de la formación del bolo alimenticio, la comida es transportada a través del esófago hacia el estómago, donde continúa su proceso de digestión. El bolo alimenticio se mezcla con enzimas como la pepsina y la lipasa, que descomponen proteínas y lípidos, respectivamente (46). Además, en el estómago se secreta jugo gástrico que disminuye gradualmente el pH del contenido y ayuda a la hidrólisis del bolo alimenticio. Durante la digestión gástrica, el pH estomacal puede aumentar de 1,5 a 4,0 debido a la capacidad *buffer* de los alimentos. De este modo, el bolo alimenticio se descompone en quimo, que es transportado gradualmente al intestino delgado (46). En el duodeno, el pH bajo del estómago es neutralizado por el bicarbonato y los jugos digestivos del páncreas (enzimas digestivas como tripsina, quimotripsina y lipasa) y de la vesícula biliar, que aporta sales biliares (SB). Normalmente, el pH en el duodeno es de 5,0-5,5 llegando a 7,5 en el íleon. Las enzimas digestivas descomponen aún más las proteínas, los lípidos y el almidón, mientras que las SB ayudan a emulsionar los productos de la hidrólisis lipídica para formar micelas mixtas (entre los lípidos de la digestión, las SB y el colesterol). La etapa final de la digestión de carbohidratos y proteínas de la dieta ocurre directamente sobre la superficie de los enterocitos del intestino delgado involucrando enzimas presentes en las microvellosidades. Estas enzimas, que incluyen maltasa, sacarosa-isomaltasa, lactasa y peptidasas, son proteínas integrales de membrana que están presentes en los enterocitos. Los nutrientes producidos son absorbidos principalmente por las células epiteliales del yeyuno y, en menor medida, del íleon (46).

Una de las funciones principales del intestino grueso es la absorción de agua. Además, aunque todo el TGI contiene una gran población microbiana, la concentración de esta población es mayor en el intestino

grueso. Muchos de estos microorganismos contribuyen a la digestión de componentes de los alimentos mediante sus propias enzimas, incluidos prebióticos y PS complejos que no pueden ser digeridos por las enzimas del organismo humano (46).

Luego de la absorción de nutrientes por parte de los enterocitos, los compuestos (especialmente los péptidos) pueden ser degradados aún más a través de las proteasas intracelulares antes de que ingresen al torrente sanguíneo o al sistema linfático. Los nutrientes solubles en agua se liberan principalmente en el torrente sanguíneo y llegan hasta el hígado a través de la vena porta hepática, mientras que los nutrientes solubles en lípidos son transportados hacia la linfa después del ensamblaje en quilomicrones. Posteriormente, los quilomicrones son procesados y sus compuestos también llegan a la sangre (47).

Cuando se requiere que un CB ejerza su función en el organismo luego de ser ingerido, es importante estudiar su biodisponibilidad a través del TGI. La biodisponibilidad de los CBs puede definirse en base a su bioaccesibilidad, absorción y transformación dentro del TGI (48).

El término bioaccesibilidad conforma un grupo de factores limitantes relacionado con la accesibilidad del CB dentro de los fluidos del TGI, dado que éstos deben estar presentes en una forma física adecuada para su absorción. Los principales factores que limitan la bioaccesibilidad son: (i) la liberación del CB a partir del sistema de encapsulación y/o de la matriz alimentaria en la que se encuentra, (ii) la solubilidad en los fluidos gastrointestinales (un CB hidrofóbico debe ser incorporado en micelas mixtas en el intestino delgado antes de que pueda absorberse); y (iii) la interacción con otros componentes en los fluidos gastrointestinales (48).

Por su parte, el término absorción engloba los factores relacionados con la absorción del CB a partir del fluido gastrointestinal, es decir, la fracción que es transportada a través de la mucosa, de las células epiteliales y dentro de la circulación sistémica. Existen diferentes mecanismos de absorción: (i) transporte a través de la mucosa (las células epiteliales que revisten el TGI están cubiertas por una capa de moco con poros de 400 nm, aproximadamente, que sirve como protección limitando el paso de determinadas sustancias); (ii) permeabilidad de la bicapa lipídica (uno de los principales factores que influye en el transporte pasivo de los CBs a través de las células epiteliales es su habilidad para pasar a través de la bicapa de fosfolípidos no polares que es relativamente hidrofóbica y, por ello, cuanto mayor sea la hidrofobicidad del CB, mayor será la permeabilidad a la membrana); (iii) transporte a través de las uniones estrechas (estas uniones ocurren en la región que une células epiteliales vecinas y consiste en canales angostos, con diámetros menores a 60 nm, que permiten que las moléculas suficientemente pequeñas pasen a través de ellas; y (iv) transporte activo (consiste en una única proteína o conjunto de proteínas insertadas en la membrana de las células epiteliales que son capaces de transportar tipos específicos de moléculas) (48).

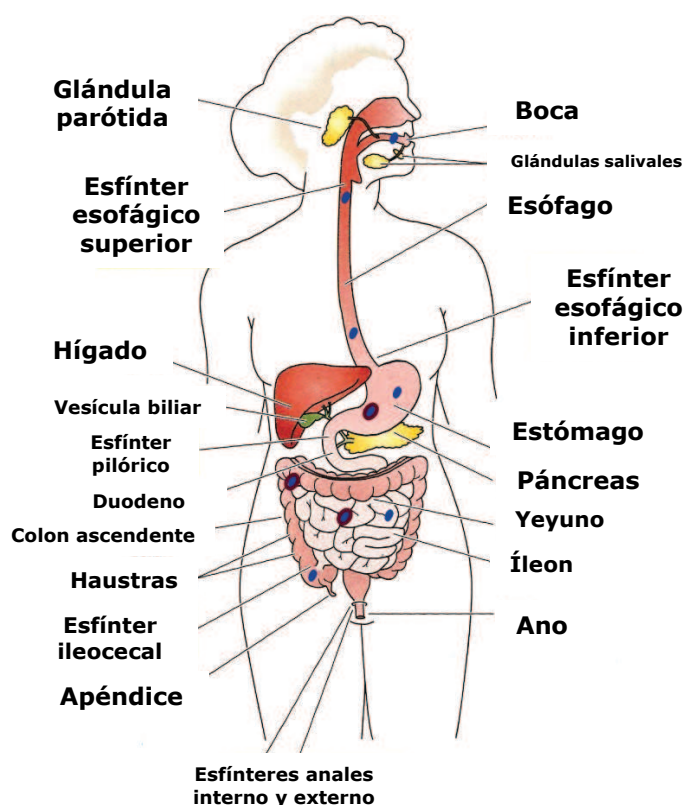
Por último, el término transformación hace referencia a la forma inactiva que pueden adquirir los CBs dentro del TGI debido a diferentes mecanismos: (i) degradación química (algunos CBs pueden sufrir

transformaciones químicas dentro de la matriz alimentaria y/o luego de ser ingeridos, alterando su actividad biológica por oxidación, reducción o reacciones de hidrólisis); y (ii) algunos CBs son metabolizados por sistemas enzimáticos específicos dentro del TGI (48).

De este modo, la biodisponibilidad oral de un CB, definida como la fracción del CB ingerido que realmente alcanza la circulación sistémica en forma activa, puede estimarse como:

$$\text{biodisponibilidad} = \text{bioaccesibilidad} \times \text{absorción} \times \text{transformación} \quad (\text{Ecuación 1}),$$

donde bioaccesibilidad es la fracción del CB ingerido que resiste el paso a través del TGI y que es liberada en los fluidos gastrointestinales, absorción es la fracción del CB bioaccesible que es realmente absorbido por el enterocito y transformación es la fracción del CB absorbido que está en forma activa luego del metabolismo (48).



**Figura 3.** Representación esquemática de los órganos que componen el TGI humano (Figura modificada de [Bellmann y col. \(2015\) \(45\)](#)).

### 1.5. Nutrigenómica y diabetes mellitus tipo 2

Algunos nutrientes, tales como los CBs, son capaces de modular la expresión génica de las células de un organismo, a la vez que la respuesta a una dieta puede verse influenciada de diferentes maneras según

ciertas variaciones genéticas del individuo. La nutrigenómica es la ciencia que estudia la relación que existe entre un nutriente y un gen o conjunto de genes específicos, y ofrece un enfoque novedoso para el control de trastornos metabólicos complejos. Específicamente, la nutrigenómica analiza el efecto de los componentes de la dieta sobre la expresión génica inducido a través de mecanismos epigenéticos tales como la metilación del ADN, la modificación de histonas y la regulación de ARN no codificante (49).

### 1.5.1. Genes relacionados con diabetes mellitus tipo 2

El correcto metabolismo de la glucosa que conduce a la homeostasis del organismo se establece a través de complejos mecanismos. En primer lugar, los genes *PCK1* y *PCK2* codifican proteínas involucradas en la síntesis de glucosa, y su expresión se encuentra aumentada en pacientes diabéticos (49). Por otro lado, los genes *SLC2A1* y *SLC2A2* codifican proteínas denominadas GLUT1 y GLUT2, respectivamente, las cuales transportan glucosa hacia el interior de las células, favoreciendo la reducción de los niveles de azúcar en sangre. Particularmente, los genes *SLC5A1* y *SLC5A2* son los más destacados en cuanto al proceso de reabsorción renal de glucosa y al transporte de glucosa desde la luz intestinal hacia el enterocito, y están claramente asociados a la DM2. Ambos codifican importantes proteínas transportadoras de glucosa denominadas SGLT1 y SGLT2 (50).

La activación del gen de la proteína quinasa B (*AKT*) inducida por insulina regula la absorción de glucosa en varios tejidos (*e.g.*, hígado, tejido adiposo, músculo esquelético, etc.) debido a que provoca la translocación de GLUT4 (proteína transportadora de glucosa expresada principalmente en tejido adiposo y músculo esquelético) desde las vesículas del citoplasma hacia la membrana celular. Adicionalmente, disminuye la producción hepática de glucosa y aumenta la síntesis de glucógeno (51).

Por otra parte, diversos genes están relacionados con la síntesis, activación y señalización de la insulina. Entre ellos, los genes *PI3KR1*, *IRS1*, *FFAR1*, *HNF4A* y *ENPP1* codifican para la enzima fosfoinositol 3-cinasa (importante en la vía de señalización de insulina), receptores de insulina, proteína del receptor 1 de ácidos grasos libres (mediante la cual es posible amplificar la secreción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas y controlar los niveles de glucosa en sangre), factor nuclear de hepatocitos 4 alfa (mediante el cual se activa la expresión del gen que codifica para la insulina) y la proteína ectonucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasa 1 (relacionada con la RI cuando aumenta su expresión), respectivamente (49).

La regulación de la homeostasis de glucosa también es controlada por la insulina mediante la activación de los genes *MTOR* y *RPS6KB1*. El primero de ellos codifica para la quinasa *target* de rapamicina en mamíferos (mTOR), mientras que el segundo codifica para la quinasa beta-1 de la proteína ribosomal S6 (S6K1), correspondiente a una serina/treonina quinasa activada por mTOR (51). Cuando se activa la vía de señalización mTOR/S6K1, aumenta la absorción de glucosa mediante GLUT4 y la glucólisis.

Algunos genes están directamente relacionados con las células  $\beta$  pancreáticas. La desregulación del gen *IGF2BP2* se asocia con la RI, mientras que la sobreexpresión del gen *PARP1* se asocia con el daño de tejidos y la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas, siendo un factor relevante en la disfunción endotelial de pacientes diabéticos (49).

La disminución de la expresión del gen *TCF7L2* está asociada con el incremento de apoptosis de las células  $\beta$  pancreáticas, el incremento de la síntesis de glucosa hepática y la disminución de la secreción de insulina. Por otro lado, el gen *PRKAA2* desempeña un rol fundamental en la síntesis de glucosa, colesterol y triglicéridos, activando el gen *SIRT1* que, a su vez, modula otros genes capaces de controlar la síntesis de glucosa hepática, el metabolismo de lípidos y la síntesis y sensibilidad a la insulina (49).

Por su parte, los estrógenos son capaces de controlar los niveles de glucosa y regular su transporte en tejido adiposo y músculo, por lo que el gen que codifica el receptor de estas hormonas (*ESR1*) también es considerado en la prevención y tratamiento de DM2. Adicionalmente, genes involucrados en procesos inflamatorios y estrés oxidativo cumple un rol importante en el desarrollo de DM2 y sus complicaciones. En primer lugar, genes tales como *NFE2* y *NFE2L2* poseen un rol regulatorio en la expresión de proteínas antioxidantes y, por lo tanto, su modulación puede ser importante para la protección contra el estrés oxidativo comúnmente asociado a DM2. Además, la inhibición de los genes *NFKB1* y *NFKB2* disminuye el proceso inflamatorio y, consecuentemente, mejora los efectos de la vasoconstricción e hipertensión inducidos en pacientes diabéticos (49).

Aunque la relación entre algunos genes y el desarrollo de DM2 y sus complicaciones no está completamente dilucidada, su desregulación está claramente asociada a esta enfermedad. Particularmente, la sobreexpresión del gen *G6PC* está relacionada con la intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia, mientras que la expresión del gen *FTO* también se ve incrementada en pacientes diabéticos, por lo que se estima que participa en el metabolismo oxidativo, la lipogénesis y el estrés oxidativo (49).

### **1.5.2. Perspectiva y objetivos estratégicos**

En las últimas décadas, el estudio de la nutrición humana y animal ha modificado su enfoque reconociendo que un trastorno metabólico no puede ser comprendido en su totalidad sin un profundo análisis de la acción de los nutrientes a nivel molecular. En primer lugar, el desarrollo de nuevas tecnologías permite centrar la atención en genes importantes para diferentes vías metabólicas. A su vez, se proponen a los macro y micronutrientes como potenciales señales que modulan la expresión de esos genes importantes, controlando la homeostasis de los organismos. Adicionalmente, novedosos trabajos científicos sugieren a la predisposición genética como factor determinante en las principales causas de mortalidad asociadas a dietas inadecuadas desde el punto de vista de los requerimientos nutricionales (52).

La nutrigenómica intenta explicar el efecto que ejercen los nutrientes a nivel molecular sobre células, órganos y tejidos específicos y, de este modo, identificar los complejos mecanismos que favorecen la homeostasis. Para ello, el empleo de herramientas genómicas (*e.g.*, tecnologías de transcriptómica, proteómica, metabolómica, etc.) permite el reconocimiento de los genes modulados por nutrientes y de las vías regulatorias de las cuales forman parte. La disponibilidad de modelos de líneas celulares y ratones transgénicos resulta esencial en este tipo de análisis (52).

Una vez identificados los posibles genes *target* y los nutrientes capaces de modular su expresión de forma positiva, es posible desarrollar alimentos funcionales con el objetivo de prevenir y/o controlar ciertas enfermedades. Numerosos estudios han sugerido la interacción de CBs con genes involucrados fundamentalmente en el metabolismo de glucosa y lípidos, el control de la secreción y señalización de insulina, estrés oxidativo, procesos inflamatorios, apoptosis celular. Por lo tanto, la incorporación de estos CBs en alimentos funcionales es una novedosa estrategia para el tratamiento de la DM2 y sus complicaciones (52). Algunos genes, tales como *PRKAA* y *SIRT1*, han sido ampliamente estudiados y se ha propuesto su modulación para mejorar la calidad de vida de pacientes diabéticos o prevenir la enfermedad ya que, además de estar asociados entre sí, interfieren en la expresión de otros genes importantes. Por otro lado, ciertos genes identificados necesitan ser estudiados más detalladamente antes de que sean propuestos como genes *target* para el tratamiento de la DM2 (*e.g.*, *IRS1*, *TCF7L2*, *IGF2BP2*, *PI3KR1*, *PCK1*, *PCK2*, etc.), mientras que otros (por ejemplo, el gen *FTO*) están relacionados con la etiología de la enfermedad, pero no se han hallado hasta el momento CBs capaces de modular su expresión. Además, muchos estudios sólo evalúan cambios en la expresión de genes ante la presencia de un CB, pero no brindan información respecto al modo de acción de estos compuestos. Por último, la mayoría de los genes reportados están directamente relacionados con el metabolismo de la glucosa y de la insulina. Sin embargo, resulta indispensable el estudio de otros genes involucrados en procesos metabólicos importantes, tales como inflamación, apoptosis y estrés oxidativo, los cuales también podrían ser vinculados de forma indirecta con la prevención y tratamiento de la DM2. Adicionalmente, genes relacionados con otras enfermedades crónicas podrían favorecer la homeostasis en pacientes diabéticos (49).

Finalmente, es fundamental considerar las posibles variantes genéticas de cada gen entre individuos, como también la composición de la microbiota intestinal particular de cada organismo, ya que estos factores podrían conducir a respuestas metabólicas diferentes ante la exposición a un CB. Bajo esta perspectiva, uno de los mayores desafíos a futuro consiste en ampliar los conocimientos para posibilitar el diseño de dietas personalizadas en función del genotipo del individuo (53).

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1. Objetivo general

Reunir conocimientos científicos que permitan profundizar en la influencia de una estrategia de encapsulación y de una matriz alimentaria sobre la digestibilidad, bioaccesibilidad y actividad antidiabética de aceites esenciales, con el fin de poder contribuir en el control y/o prevención de la diabetes mellitus tipo 2 por medio del desarrollo de un producto panificado modelo.

## 2.2. Objetivos específicos

**Objetivo 1:** Caracterizar aceites esenciales con potencial actividad biológica según su composición química.

**Objetivo 2:** Estudiar y caracterizar la formación de complejos de partículas proteicas que encapsulan aceites esenciales y evaluar su actividad biológica.

**Objetivo 3:** Estudiar y caracterizar la formación de coacervados proteína-polisacárido que encapsulan aceites esenciales.

**Objetivo 4:** Evaluar la expresión de genes relacionados con diabetes mellitus tipo 2 en células Caco-2 incubadas en presencia de aceites esenciales encapsulados.

**Objetivo 5:** Analizar la digestibilidad y bioaccesibilidad de aceites esenciales encapsulados en coacervados proteína-polisacárido mediante un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* y evaluar el efecto de dicho proceso sobre su actividad biológica.

**Objetivo 6:** Obtener panes que incorporan aceites esenciales encapsulados y evaluar sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales.

**Objetivo 7:** Analizar la digestibilidad de panes que incorporan aceites esenciales encapsulados mediante un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* y evaluar el efecto de dicho proceso sobre su actividad biológica.



### **3. CAPÍTULO 1**

**Desarrollo, caracterización y actividad biológica de nanopartículas de proteína de clara de huevo que encapsulan aceites esenciales**

### 3.1. INTRODUCCIÓN

#### 3.1.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AEs) son mezclas naturales complejas de metabolitos secundarios de plantas, las cuales se caracterizan por poseer aroma intenso y por ser altamente volátiles e insolubles en medios acuosos (15). Generalmente, los AEs son incoloros, líquidos hidrofóbicos a temperatura ambiente, presentan baja densidad, algunos de ellos pueden presentar coloración (amarilla pálida, verdosa o color azul intenso, como el aceite esencial (AE) característico de la especie *Matricaria chamomilla*), ser sólidos o resinosos a temperatura ambiente (como el AE de la especie *Boswellia sacra*) y poseer densidad mayor a la del agua (como algunos AEs obtenidos a partir de la especie *Syzygium aromaticum*) (54,55).

Los AEs ya eran obtenidos en el siglo XII por egipcios, indios y persas, a partir de una técnica de destilación convencional que es utilizada aún en la actualidad. Anteriormente, los griegos y romanos practicaban variantes primitivas de dicha técnica para producir trementina y alcanfor. Sin embargo, el término AE fue propuesto recién a partir del siglo XVI por el suizo Paracelsus von Hohenheim, como un derivado de la denominación “Quinta Esencia”. Finalmente, la popularidad de los AEs aumentó notablemente a finales del siglo XX, cuando comenzaron a ser empleados en la práctica de la aromaterapia (56).

Los AEs se hallan en el citoplasma de ciertas células de plantas, son secretados por tricomas, glándulas epidérmicas, cavidades secretoras, etc., y cumplen la función de regular y controlar su propio entorno ambiental, aunque su propósito biológico hasta el momento no está completamente dilucidado. De esta manera, protegen a las plantas de pestes y estrés abiótico, atraen insectos benéficos y emiten señales químicas para la comunicación (56).

A diferencia de los metabolitos primarios de plantas (requeridos para procesos básicos tales como fotosíntesis, respiración, crecimiento y desarrollo), los metabolitos secundarios que componen los AEs son producidos en bajas cantidades y acumulados en órganos específicos, según la etapa particular de desarrollo o estadio fenológico (57). Estos metabolitos son compuestos químicos volátiles de bajo PM (menor a 1 kDa) y se clasifican en dos grandes grupos que resultan de diferentes vías biosintéticas. En primer lugar, el grupo más importante en los AEs corresponde a los terpenos, los cuales se caracterizan por poseer una estructura básica o unidad de isopreno. Dependiendo del número de unidades de isopreno, se derivan diferentes subgrupos tales como hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) y politerpenos (C5)<sub>n</sub> con n mayor a 8. Los monoterpenos son los más frecuentes en AEs, ya que los compuestos pertenecientes a este subgrupo suelen alcanzar el 90% del contenido total del AE. En segundo lugar, el grupo de compuestos alifáticos y aromáticos comprende alcoholes, aldehídos, cetonas, fenoles, heterocíclicos, entre otros. Los compuestos pertenecientes a este grupo son menos abundantes en AEs. Sin embargo, los compuestos fenólicos se

encuentran en numerosos AEs de diferentes especies de plantas, y son ampliamente estudiados debido a sus propiedades biológicas (58).

Los compuestos químicos presentes en los AEs se consideran CBs, ya que son capaces de interaccionar con componentes de tejidos vivos y ejercer diversos efectos sobre el organismo. En un AE, esta acción se lleva a cabo a través de sus compuestos mayoritarios (generalmente, entre 1 y 3 compuestos químicos que representan un 70-90% del AE) y de sus componentes minoritarios (numerosos compuestos de naturaleza química heterogénea presentes en cantidades traza) (59). Estos últimos pueden actuar potenciando o disminuyendo la bioactividad de un AE, respecto a los compuestos mayoritarios puros (60,61). Entre los efectos biológicos se destaca la capacidad antimicrobiana, antioxidante, antidiabética y antiinflamatoria, debida fundamentalmente a los compuestos fenólicos y aldehídos presentes en los AEs (62,63). Además, los AEs han sido propuestos como agentes antitumorales, antihipertensivos, neuroprotectores, cardioprotectores, antivirales, repelente de insectos, etc. (29).

Numerosos estudios han evidenciado actividad antibacteriana y antifúngica de AEs mediante diferentes ensayos *in vitro*, tales como difusión en agar, microdilución en caldo, etc. (64,65). En un trabajo reciente, Bagheri y col. (2020) (66) han informado que AEs de tomillo, canela, ajo y orégano fueron los más efectivos contra 24 especies de microorganismos patógenos, entre 38 AEs evaluados mediante ensayos de difusión en disco y microdilución en caldo. Por otro lado, De Clerck y col. (2020) (67) han determinado la actividad antibacteriana y antifúngica de 90 AEs comerciales contra 10 especies de microorganismos. Particularmente, los AEs de *Allium sativum*, *Corydorthymus capitatus*, *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon flexuosus*, *Eugenia caryophyllus* y *Litsea citrata* presentaron elevada actividad frente a la mayoría de los microorganismos evaluados.

Además, la mayoría de los AEs presentan capacidad antioxidante, la cual ha sido extensamente demostrada mediante ensayos químicos y biológicos (68). En un estudio previo, Pérez Rosés y col. (2016) (69) han evaluado la actividad antioxidante de 15 AEs obtenidos a partir de plantas de diferente género. Entre ellos, el AE de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) presentó el mejor perfil antioxidante, lo cual fue evidenciado utilizando diversos métodos analíticos. En otro estudio, se ha informado que el AE de *Thymus satureioides* presentó mayor actividad antioxidante que AE de *Mentha suaveolens*, *Achillea ageratum*, *Cotula cinerea* y *Salvia officinalis*, y este resultado fue consistente en todos los ensayos realizados (70).

La actividad antidiabética de AEs se ha demostrado en numerosos trabajos, en los cuales se ha expuesto su efecto antihiper glucémico, hipoglucémico o insulino trópico tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. En uno de ellos, Oboh y col. (2017) (71) han analizado la capacidad antidiabética de AE de naranja y limón mediante la evaluación del efecto inhibitorio de enzimas digestivas. Los autores informaron que ambos AEs presentaron potencial antidiabético, siendo el AE de limón el que presentó mayor capacidad. Por otro lado, Radünz y col. (2021) (72) han comparado el efecto inhibitorio de enzimas digestivas de 4 AEs obtenidos a partir de diferentes especies. Según estos ensayos, los autores reportaron que AE de naranja

y tomillo evidenciaron las mayores actividades inhibitorias entre los AEs evaluados. Además, efectos similares se han observado en ensayos *in vivo*, luego del tratamiento de ratas Wistar con diabetes inducida por aloxano con AE de *Salvia officinalis* (73).

La capacidad antiinflamatoria de AEs ha sido comprobada mediante métodos analíticos *in vitro* e *in vivo*, en tanto que la evidencia sobre eficacia terapéutica y efectos secundarios en ensayos clínicos todavía es insuficiente (74). Específicamente, Sharopov y col. (2015) (63) han comparado la actividad antiinflamatoria de 18 AEs evaluando el efecto inhibitorio sobre la enzima 5-lipooxigenasa, clave en vías metabólicas de la respuesta inflamatoria. De este modo, los autores reportaron que AE de *Galagania fragrantissima* resultó el más efectivo, seguido de AE de *Origanum tyttanthum*. Por otro lado, Amorim y col. (2016) (75) han evaluado el efecto antiinflamatorio de AEs obtenidos a partir de 4 especies del género *Citrus*, mediante un modelo experimental de inflamación inducida utilizando ratones. Los autores reportaron que los AEs de *Citrus limon*, *Citrus aurantifolia* y *Citrus limonia* fueron capaces de disminuir diferentes parámetros relacionados con la respuesta inflamatoria.

Sin embargo, el potencial terapéutico o tecnológico de un AE está vinculado directamente con el perfil de compuestos bioactivos que presenta. La calidad de un AE depende de innumerables factores que están relacionados con características intrínsecas de la planta que lo contiene y otros aspectos abióticos del entorno. De este modo, cada AE presenta una mezcla particular de metabolitos secundarios, que a su vez determina las propiedades fisicoquímicas de dicho AE. Además, la cantidad de AE que será posible obtener a partir del material vegetal (rendimiento) también es determinada por estos factores (76). Por ejemplo, se ha reportado que *Thymus munbyanus* presenta tres subespecies denominadas *ciliatus*, *coloratus* y *abylaeus*. El análisis de los AEs obtenidos a partir de ellas ha permitido corroborar la gran variabilidad que puede existir en la composición química dentro de una misma especie. La subespecie *ciliatus* presentó alta concentración de carvacrol (65,7%), mientras que el componente mayoritario en *coloratus* resultó alcanfor (25,9%) y *abylaeus* evidenció elevado contenido de acetato de  $\alpha$ -terpinilo (51,7%). Debido a que las subespecies difirieron no sólo en el componente principal del AE sino también en la composición química en general, se ha sugerido que esta variabilidad sería causada por factores genéticos (76).

Por otro lado, la etapa de desarrollo del material vegetal recolectado para la obtención de AEs puede afectar en gran medida sus características cualitativas y cuantitativas. Respecto a este factor, se han analizado AEs de frutos de comino (*Cuminum cyminum*) en diferentes estadios del proceso de maduración, y se ha informado una notable variabilidad de la composición química y del rendimiento entre las etapas (77). Asimismo, la edad de la planta es un factor determinante en el rendimiento y perfil de compuestos químicos de AEs (78). En particular, se han comparado AEs de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), obtenidos a partir de hojas de árboles con edades comprendidas entre los 3 y 100 años, y se ha informado que todas las muestras presentaron los mismos componentes mayoritarios, aunque uno de ellos (eucaliptol o

1,8-cineolo) fue detectado en mayor proporción en los árboles con más años de crecimiento. En cuanto al rendimiento, los valores resultaron mayores para los árboles más jóvenes (79).

Factores externos, tales como ubicación geográfica, cantidad de luz solar, temperatura, salinidad del suelo, precipitaciones, etc., también influyen sobre las características de los AEs obtenidos (59,80–82). Por ejemplo, se ha informado que AEs de plantas de romero (*Rosmarinus officinalis*) sometidas a estrés hídrico presentaron variaciones en la composición química respecto a AEs de plantas controles. Las principales diferencias se hallaron en el contenido de sesquiterpenos, cetonas e hidrocarburos (83).

Además, prácticas de cultivo (utilización de fertilizantes) y relacionadas con la cosecha (estación del año en la que se realiza) y postcosecha (condiciones y tiempo de secado y almacenado del material vegetal) pueden definir la calidad y rendimiento de los AEs (76,84). Por ejemplo, se ha observado gran variabilidad en el rendimiento y en los componentes mayoritarios de AE de *Mentha pulegium* y *Mentha piperita*, correspondientes a plantas cosechadas en el transcurso de un año. De este modo, se ha planteado la posibilidad de seleccionar la mejor estación para la cosecha y alcanzar una composición química óptima, según el uso al cual estará destinado el AE (76).

Finalmente, la parte de la planta y el método de extracción a partir del cual se obtiene un AE se encuentran entre los factores más determinantes en cuanto al rendimiento, la composición química y la pureza que presentará dicho AE. Aunque diferentes órganos y estructuras (semillas, flores, hojas, raíces, frutos, brotes, ramas, corteza) pueden utilizarse para la extracción de AE, algunos de ellos resultan más apropiados que otros, dependiendo de la especie, para la obtención de un AE de calidad (78).

En la actualidad, la obtención de AE puede realizarse mediante diferentes métodos, los cuales se clasifican en clásicos (o convencionales) e innovadores. Entre los métodos clásicos, se pueden mencionar la hidrodestilación, extracción Soxhlet, destilación por arrastre con vapor y extracción con solventes orgánicos. Estas técnicas utilizan equipos simples y de bajo costo, pero presentan algunas desventajas. Por ejemplo, la destilación puede generar la descomposición de compuestos termosensibles y la hidrólisis de compuestos susceptibles a esta reacción, mientras que la extracción con solventes puede dar lugar a AEs de baja pureza, además de ser una técnica potencialmente contaminante para el medioambiente (82). Por otro lado, los métodos innovadores han surgido como alternativas para mejorar la calidad y el rendimiento de los AEs. Este grupo incluye procesos tales como la extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por microondas, extracción por alta presión, extracción con líquidos presurizados, extracción asistida por cavitación con presión negativa, extracción con agua subcrítica, extracción con fluidos supercríticos, extracción asistida por enzimas, extracción asistida por campo eléctrico pulsado y extracción acelerada con disolventes (15,85). Los métodos mencionados presentan menores tiempos de extracción, mayor calidad y rendimiento de los AEs, menor consumo de energía y mayor cuidado del medioambiente que los métodos clásicos. Numerosos autores han comparado AEs obtenidos a partir de diferentes métodos de extracción,

tanto clásicos como innovadores, y han reportado gran variabilidad entre la composición química y el rendimiento de cada uno de ellos (86,87).

Debido a lo expuesto anteriormente, resulta imprescindible realizar una caracterización adecuada de los AEs que permita estimar sus posibles propiedades biológicas y aplicaciones. Para ello, existen técnicas instrumentales mediante las cuales se logra una buena separación de los componentes de la mezcla, logrando realizar un análisis cualitativo y cuantitativo apropiado del AE (88). La cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés *Gas Chromatography*) acoplada a espectrometría de masas es el método usualmente empleado para la separación y el análisis de componentes volátiles presentes en muestras de origen vegetal debido a su simplicidad, sensibilidad y eficacia. Esta herramienta permite detectar los principales compuestos, pero presenta dificultades para determinar los compuestos minoritarios de los extractos cuando se encuentran en bajas cantidades. Sin embargo, con la incorporación de un detector de ionización de llama (FID, por sus siglas en inglés *Flame Ionization Detector*) es posible determinar compuestos que estén presentes en muy bajas concentraciones y cuantificarlos de manera precisa (88).

### **3.1.1.1. Potenciales aplicaciones de los aceites esenciales en la industria**

Desde hace varias décadas, la comunidad científica ha comenzado a cuestionar el uso de ciertas sustancias sintéticas en el desarrollo de productos farmacológicos, cosméticos y alimenticios. En muchos casos, se ha sugerido la relación entre sustancias y diversos efectos adversos en el organismo y el medioambiente, mientras que en otros se ha comprobado fehacientemente su nocividad (89–91). La divulgación de estos conocimientos ha provocado un fuerte impacto en los consumidores que, informados y concientizados, comenzaron a demandar productos más naturales con menor cantidad de sustancias sintéticas en su composición (28,56). El creciente interés por alcanzar un estilo de vida saludable y sustentable exige actualmente nuevas estrategias por parte de la industria, tanto para el desarrollo de alimentos libres de compuestos químicos sintéticos como para el diseño de biofármacos que puedan reemplazar a las drogas sintéticas.

Como se mencionó previamente, los AEs son una interesante fuente de CBs que captan la atención de la industria ya que representan una alternativa natural frente a compuestos sintéticos en una gran variedad de productos y están regulados por la FDA (*Food and Drug Administration*) en Estados Unidos y por la Comisión Europea (92,93). Hasta el momento, se han propuesto para el desarrollo de pesticidas, biomateriales de recubrimiento, cosméticos, fármacos (antimicrobianos, antiinflamatorios, antidiabéticos, etc.), aditivos de alimentos (conservantes, antioxidantes, aromatizantes, etc.) y alimentos funcionales (82). Sin embargo, antes de que los AEs puedan ser empleados exitosamente por la industria se deben considerar algunos aspectos tales como sus características fisicoquímicas, la compatibilidad con la matriz, sus propiedades organolépticas, etc. (94). La incorporación directa de AEs en productos ha exhibido limitaciones tecnológicas debido, principalmente, a factores como: (i) elevada volatilidad; (ii) baja

solubilidad en agua; (iii) capacidad para descomponerse en presencia de oxígeno, radiación, temperatura elevada, etc. o para reaccionar con elementos de la matriz; y (iv) sabor y aroma invasivo. Esto puede provocar pérdida de la bioactividad, o la necesidad de incorporar mayores cantidades de CB para obtener el efecto deseado (aumentando los costos de producción), y disminución de la aceptabilidad sensorial por parte de los consumidores, entre otras cuestiones desfavorables (95). Frente a esta situación, se ha considerado la encapsulación de AEs como una estrategia para superar los inconvenientes mencionados.

### 3.1.2. Encapsulación de aceites esenciales

La encapsulación es una estrategia que se ha utilizado para impulsar el empleo de AEs en diversos productos y que presenta una serie de ventajas respecto a su posible aplicación directa, tales como: (i) disminución de la volatilidad; (ii) promoción de la solubilidad; (iii) protección de los CBs frente a factores externos; (iv) enmascaramiento de sabores y aromas; y (v) diseño de sistemas de liberación controlada y/o sitio-específica (22,96).

Los AEs han sido encapsulados utilizando una gran variedad de métodos y materiales de pared. En primer lugar, se han desarrollado diferentes *carriers* basados en lípidos, tales como liposomas, nanoemulsiones y nanopartículas sólidas lipídicas, etc., capaces de incorporar AEs. Por su parte, Cui y col. (2016) (97) encapsularon AE de canela en liposomas de lecitina de soja y colesterol, y reportaron que la inclusión en estos liposomas mejoró la capacidad antimicrobiana del AE contra *Staphylococcus aureus*. Por otro lado, Sampaio y col. (2022) (98) encapsularon AE de tomillo y AE de melisa en nanoemulsiones formadas a partir de aceite de girasol y Tween 80 como surfactante. En este caso, los autores informaron que los AEs libres (no encapsulados) presentaron mayor capacidad antimicrobiana y antioxidante que los AEs encapsulados. En otro estudio, se encapsuló AE de *Cymbopogon pendulus* en nanoemulsiones preparadas con Tween 20 y Tween 80, utilizando dodecil sulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés *Sodium Dodecyl Sulphate*) como surfactante y etanol como co-surfactante (99). Los autores reportaron elevada actividad antiinflamatoria, antibacteriana, antifúngica y antidiabética de las nanoemulsiones y sugirieron su empleo en cosméticos, alimentos y fármacos. Además, Nasseri y col. (2016) (100) obtuvieron nanopartículas sólidas lipídicas cargadas con AE de *Zataria multiflora*. La fase lipídica seleccionada para la formación de estas nanopartículas fue una mezcla de monoestearato de glicerilo y Precirol ATO 5, y los surfactantes utilizados fueron Tween 80 y Poloxamer 188. La homogeneización y el ultrasonido fueron las técnicas de encapsulación empleadas. A partir de los resultados obtenidos, se pudo concluir que el AE encapsulado presentó mayor eficacia antifúngica que el AE libre.

Diversos PSs y sus derivados han sido utilizados para encapsular AEs en sistemas tales como partículas poliméricas y complejos de inclusión, entre otros. Por ejemplo, Mohammadi y col. (2015) (101) utilizaron quitosano y Tween 80 como surfactante para encapsular AE de *Cinnamomum zeylanicum* mediante gelación iónica. Los autores informaron que el AE encapsulado presentó mayor efecto antifúngico

que el AE libre. Por otro lado, [Benavides y col. \(2016\) \(102\)](#) encapsularon AE de tomillo en microesferas de alginato a través del método de gelación iónica, y reportaron que la microencapsulación no afectó la elevada actividad antibacteriana del AE. Además, [Das y col. \(2019\) \(103\)](#) utilizaron  $\beta$ -ciclodextrina metilada para encapsular AEs de tomillo, melisa, lavanda y menta mediante sonicación. Los complejos de inclusión obtenidos evidenciaron considerable actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica, incluso en condiciones de baja concentración de AE.

### 3.1.2.1. *Sistemas de encapsulación proteicos*

Otro recurso importante para la encapsulación de AEs involucra el empleo de proteínas, a través de las cuales es posible obtener complejos. Cuando una proteína es seleccionada para el diseño de estos sistemas de encapsulación, se obtiene una matriz polimérica con características conformacionales particulares, que dependen fuertemente de su estructura y configuración molecular (factores intrínsecos) y de las condiciones del medio donde se encuentre (factores extrínsecos) [\(104\)](#).

Generalmente, las proteínas requieren de un proceso de desnaturalización para modificar su conformación molecular (el cual es llevado a cabo mediante el uso de ácidos, bases, solventes o energía térmica) y para poder interactuar con moléculas vecinas. Esta capacidad de unión intermolecular es responsable de la compleja composición y estructura de las proteínas que, a su vez, las convierte en biopolímeros con múltiples propiedades funcionales [\(105\)](#).

Hasta el momento, se han utilizado numerosas proteínas de diferente origen para obtener partículas capaces de encapsular AEs. En un estudio previo, [Silva y col. \(2019\) \(103\)](#) desarrollaron nanopartículas de gelatina con el objetivo de encapsular AE de *Piper aduncum* y *Piper hispidinervum*. El método de encapsulación empleado fue el de emulsificación, para lo cual también fue necesaria la incorporación de Tween 80 como surfactante, policaprolactona, Span 60, triglicéridos de ácido cáprico y la enzima transglutaminasa (que permite la estabilización de la matriz proteica mediante enlaces covalentes). Los autores informaron que las nanopartículas obtenidas presentaron capacidad insecticida y pesticida contra *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* y *Cerataphis lataniae*. Por otro lado, [Bilenler y col. \(2015\) \(106\)](#) encapsularon AE de tomillo en partículas de zeína mediante el método de dispersión líquido-líquido. A partir de los resultados, se pudo concluir que el AE encapsulado presentó considerable capacidad antioxidante, mientras que la actividad antimicrobiana resultó mayor cuando el AE se encontró libre respecto al AE encapsulado en las partículas de zeína. Además, [Liang y col. \(2022\) \(107\)](#) encapsularon AE de *Cinnamomum cassia* en una nanoemulsión de glicoproteína de suero. Posteriormente, evaluaron la actividad antioxidante y antibacteriana de la nanoemulsión y del AE en forma libre, obteniendo mejores resultados cuando el AE se encontró encapsulado en dicha nanoemulsión. En otro estudio, se utilizó  $\beta$ -lactoglobulina para encapsular AEs de orégano, romero y salvia mediante el método de emulsificación



seguido de liofilización (108). Los autores indicaron que las microcápsulas obtenidas presentaron considerable actividad antioxidante.

Otra clase de proteínas que ha sido propuesta para la encapsulación de AEs corresponde a las albúminas. Conforman una familia de proteínas globulares hidrosolubles, las cuales son de origen animal y se encuentran en diversos organismos, incluyendo el ser humano. Contienen comúnmente más de 500 aminoácidos, son moderadamente solubles en soluciones salinas y se desnaturalizan bajo tratamiento térmico (38).

Las albúminas se consideran un material interesante para la producción de complejos poliméricos debido a que están disponibles en grandes cantidades y con alto grado de pureza, son biodegradables, biocompatibles y no presentan toxicidad. Contienen grupos reactivos (ácidos carboxílicos, tioles y grupos amino) que permiten la unión (*binding*) de CBs sobre la superficie o en el interior de la matriz polimérica mediante técnicas relativamente sencillas. Dentro de este grupo, se pueden mencionar la albúmina sérica bovina, la albúmina sérica humana y la ovoalbúmina (OVA). En particular, la albúmina sérica humana cumple la función de mantener la presión oncótica y transportar sustancias tales como hormonas, ácidos grasos y fármacos (31). Gracias a estas propiedades funcionales, la albúmina sérica humana se ha podido utilizar para obtener nanopartículas y nanoemulsiones capaces de incorporar CBs tales como carvacrol, AE de eucalipto y AE de naranja (109,110). Por otro lado, la albúmina sérica bovina ha sido ampliamente estudiada debido a su similitud con la albúmina sérica humana. Es una proteína globular de 66,4 kDa, posee 583 aminoácidos y presenta la capacidad de transportar compuestos hidrofóbicos. Esta proteína ha sido capaz de unir moléculas de timol y citronelol a través de puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, principalmente, e interacciones hidrofóbicas en menor medida (111,112).

Finalmente, la OVA es la proteína más abundante de la clara de huevo y contribuye, principalmente, a sus propiedades funcionales. En el huevo de gallina constituye el 54% del total de proteínas de la clara, mientras que en pavo y pato el 40%. Es una fosfoglicoproteína monomérica y le confiere a la clara de huevo capacidad gelificante, espumante, emulsionante y de retención de agua. Esto se debe no solo a que la OVA es la proteína mayoritaria de la clara de huevo, sino a sus excepcionales propiedades térmicas y superficiales (113). La OVA es una proteína globular constituida por 385 aminoácidos, de los cuales la mitad son hidrofóbicos y la tercera parte son cargados, mayormente ácidos, confiriéndole un pI de 4,5. Posee un PM de 43 kDa y diámetro hidrodinámico medio de 6,4 nm. Además, posee 4 grupos sulfhidrilo ocluidos en el interior de la proteína globular y un enlace disulfuro por macromolécula. En su forma purificada está constituida por una mezcla con tres isoformas denominadas A1, A2 y A3, según el número de residuos fosfato unidos (dos, uno y cero, respectivamente). Los sitios de fosforilación son Ser<sub>68</sub> y Ser<sub>344</sub>. La proteína posee, además, una cadena hidrocarbonada simple que representa un 3% del peso y está covalentemente unida al nitrógeno amida de Asn<sub>292</sub>. Casi toda la cadena polipeptídica está implicada en una estructura

secundaria bien definida, con tres láminas  $\beta$ , nueve hélices  $\alpha$  y tres segmentos helicoidales cortos de tres a cuatro residuos (114).

Está bien establecido que la temperatura a la cual se desnaturaliza la OVA es 80,1°C. A partir de esta temperatura, la desnaturalización de la proteína es irreversible e involucra el desdoblamiento reversible de la proteína nativa (sin tratamiento térmico), seguido por la alteración irreversible del estado desplegado a un estado desnaturalizado (115). Un CB se puede unir eficientemente a OVA antes o después de la desnaturalización térmica.

A partir de proteínas globulares, tales como la OVA, se pueden formar partículas mediante el tratamiento térmico de las soluciones. Estas proteínas se despliegan cuando se encuentran por arriba de su temperatura de desnaturalización, exponiendo así los grupos hidrofóbicos normalmente ocluidos en su interior. Como resultado, las proteínas comienzan a agregarse a través de interacciones hidrofóbicas y formación de enlaces disulfuro. El proceso de agregación es irreversible y puede detenerse reduciendo rápidamente la temperatura. La fuerza iónica, el pH y la temperatura influyen fuertemente en la desnaturalización y agregación de las proteínas globulares y, por lo tanto, en el tamaño de las partículas producidas. El tamaño de partícula generalmente aumenta al aumentar la fuerza iónica, la concentración de proteínas, la temperatura y el tiempo de calentamiento. Además, las partículas tienden a ser más pequeñas cuando se producen a un pH alejado del pI de la proteína (116).

Cuando la OVA es desnaturalizada térmicamente, la cinética de desnaturalización (evaluada a través del tiempo medio de reacción) es independiente de la concentración de proteína (en el rango de 0,1 a 60 g L<sup>-1</sup>) y de la concentración de NaCl (en el rango de 3 a 100 mM), pero fuertemente dependiente de la temperatura. A 80°C, el 50% de la proteína se desnaturaliza y agrega en menos de 2 min, mientras que a 68,5°C este proceso tarda aproximadamente 6 h. Además, cuando la OVA fue sometida a largos tiempos de calentamiento, presentó aproximadamente un 20% de monómeros correspondientes a una fracción intermedia estable (monómeros desnaturalizados, pero no agregados), y la abundancia de esta fracción no dependió de la temperatura en el rango de 72 a 85°C. Por otra parte, la fracción intermedia estable puede variar con el tiempo de almacenamiento de la OVA (117).

Según las condiciones del medio, la agregación proteica inducida por tratamiento térmico puede dar lugar a la formación de un gel. Se ha observado que soluciones de OVA a pH 7,0 y baja fuerza iónica calentadas a 78°C durante 20 h gelificaron a una concentración mayor a 60 g L<sup>-1</sup>, mientras que en condiciones de elevada fuerza iónica gelificaron a una concentración mayor a 12 g L<sup>-1</sup>. Por otro lado, al calentar una solución cuya concentración se encuentre por debajo de la concentración de formación del gel, pueden formarse agregados de diferentes tamaños y morfologías, dependiendo de las condiciones del medio (118). De este modo, se ha observado que al calentar soluciones de OVA de 20 g L<sup>-1</sup> a 80°C durante 6 h a diferentes valores de pH y fuerza iónica se obtuvieron agregados con diferente morfología: (i) lineales, a pH 9,0 y concentración de NaCl de 0,03 M; (ii) lineales ramificados, a pH 7,0 y concentración de NaCl de

0,03 M; (iii) esféricos, a pH 7,0 y concentración de NaCl de 0,3 M; y (iv) esféricos aglomerados, a pH 5,0 y concentración de NaCl de 0,8 M. Este comportamiento se puede explicar considerando el efecto de la fuerza iónica y el pH sobre las interacciones electrostáticas y la carga neta, respectivamente. A valores de pH cercanos al pI de OVA, la carga neta se aproxima a cero por lo que se ve minimizada la repulsión electrostática y consecuentemente, predomina la agregación. Por el contrario, a valores de pH alejados de su pI predomina la repulsión y los agregados formados poseen menores tamaños (118).

Además, se han obtenido agregados de OVA a partir del tratamiento térmico de soluciones de 10 g L<sup>-1</sup> a pH 7,0 y concentración de NaCl de 50 mM, realizado a 80°C durante 5, 10, 20 y 40 min. Se pudo observar que al aumentar el tiempo de calentamiento se incrementó el tamaño de los agregados formados. En dichos agregados se verificó un aumento considerable en la hidrofobicidad superficial producto de la exposición de grupos hidrofóbicos ocultos en la estructura globular de la proteína nativa. Sin embargo, no hubo un aumento adicional de la hidrofobicidad superficial a partir de los 5 min de tratamiento (113).

Con respecto a los grupos sulfhidrilo libres de OVA, el 65% de ellos fueron expuestos luego de 5 min de tratamiento térmico, mientras que después de 40 min el porcentaje alcanzó un valor de 75%. Gracias a estos resultados se pudo concluir que la polimerización de las moléculas de OVA tratadas térmicamente es impulsada principalmente por reacciones de intercambio de grupos sulfhidrilo y enlaces disulfuro, las cuales conducen a grandes estructuras macromoleculares en comparación con las moléculas de OVA nativa (113). De forma consistente, se observó una disminución gradual de los grupos sulfhidrilo totales de OVA y un aumento gradual de los grupos sulfhidrilo superficiales a medida que aumentó el tiempo del tratamiento térmico a 80°C. Estos resultados sugieren que la exposición de grupos sulfhidrilo en la superficie de OVA y el posterior intercambio de grupos sulfhidrilo y enlaces disulfuro puede suceder simultáneamente durante el calentamiento, lo que resulta en una polimerización debido a la formación de puentes disulfuro junto con interacciones hidrofóbicas (115). Adicionalmente, se observó que el tamaño de los agregados de OVA aumentó tanto con el incremento del tiempo como con la temperatura de calentamiento. Cabe mencionar que cuando el tratamiento térmico se realizó a 60°C no se observó la formación de agregados para ningún tiempo de calentamiento en el rango evaluado (3 a 10 min) (119).

El pH del medio acuoso que presenta la solución durante el tratamiento térmico es un factor clave en el tamaño de partícula y en la morfología de los agregados proteicos, ya que modula la magnitud de las interacciones intermoleculares entre las proteínas (118). A pH 5,5 se observaron agregados de OVA con tamaño micrométrico, probablemente debido a que las macromoléculas están cercanas a su pI (4,5). Bajo esta condición, la carga neta de la OVA es baja y, en consecuencia, se reduce la repulsión electrostática entre las moléculas, promoviendo su acercamiento y la formación de agregados de gran tamaño. Contrariamente, a pH 6,5 se generaron agregados de OVA con tamaño nanométrico. En este caso, el pH está más alejado del pI de la proteína, por lo que la repulsión electrostática entre macromoléculas aumenta, favoreciendo la formación de agregados de menor tamaño (119).

Otra variable importante en la formación de agregados proteicos es la concentración de proteína. En general, se observó que un aumento en la concentración de proteína provocó la formación de agregados de mayor tamaño. Este resultado se atribuyó a que el tamaño del agregado proteico estaría influenciado por el número inicial de moléculas de proteína durante el tratamiento térmico (119).

Finalmente, se ha observado que agregados de OVA producidos a 80°C y 5 min de tratamiento térmico presentaron mayor hidrofobicidad superficial que la OVA nativa. Dado que la hidrofobicidad superficial está directamente relacionada con la capacidad de unir CBs hidrofóbicos, este comportamiento resalta la importancia del tratamiento térmico de OVA cuando se desea utilizar como *carrier* (120).

La proteína de clara de huevo (EWP, por sus siglas en inglés *Egg White Protein*) es un material interesante para el desarrollo de partículas capaces de encapsular AEs debido a que contiene una gran cantidad de OVA (54%) pero, a diferencia de la proteína pura, representa un insumo altamente disponible y de bajo costo. Sin embargo, es importante considerar que EWP contiene porcentajes relativamente altos de ovotransferrina (12%), ovomucoide (11%), lisozima (3,5%) y ovomucina (3,5%), y cantidades menores de ovoinhibidor (1,5%), ovoglicoproteína (1,0%), ovoflavoproteína (0,8%), ovomacroglobulina (0,5%), cistatina (0,05%) y avidina (0,05%) (121). En general, presentan una estructura globular y varias de ellas son glicoproteínas, es decir que están unidas covalentemente a una fracción de carbohidratos. El PM, pI y la estructura molecular de las principales proteínas de EWP se observan en la [Tabla 1](#).

**Tabla 1.** Peso molecular (PM, kDa), punto isoelectrico (pI) y estructura molecular de las principales proteínas de la clara de huevo (Tabla modificada de [Dong y Zhang \(2021\) \(122\)](#)).

Componente de EWP	PM (kDa)	pI	Estructura molecular
Ovoalbúmina	45	4,5	Glicoproteína, 385 residuos de aminoácidos y N-terminal acetilado, incluidas 6 cisteínas con un solo enlace disulfuro entre Cys <sub>74</sub> y Cys <sub>121</sub>
Ovotransferrina	76-77,7	6,1	Proteína fijadora de hierro, 686 residuos de aminoácidos, tiene 15 enlaces disulfuro y se encuentra glucosilada
Ovomucoide	28	4,1	Glicoproteína, contiene 9 enlaces disulfuro, es el componente alergénico más importante de EWP
Ovomucina	180-210 ( $\alpha$ ) 400-720 ( $\beta$ )	-	Complejo de glicoproteína sulfatada e insoluble que contiene $\alpha$ -ovomucina y $\beta$ -ovomucina. La $\beta$ -ovomucina es la principal responsable de las propiedades gelificantes de la ovomucina debido a su alto contenido de carbohidratos
Lisozima	14,3	10,7	Glucósido hidrolasa, 129 residuos de aminoácidos y 4 enlaces disulfuro

Hasta el momento, EWP ha sido utilizada para encapsular una gran variedad de CBs de distinta naturaleza química. En un trabajo previo, [Arzeni y col. \(2015\) \(123\)](#) obtuvieron nanopartículas de EWP mediante la técnica de ultrasonido de alta intensidad con y sin aplicación de calentamiento simultáneo (termosonicación a 85°C) con el objetivo de unir ácido fólico. En ambos casos, la cantidad de ácido fólico unida fue considerablemente alta. Por otro lado, [Sponton y col. \(2017\) \(124\)](#) obtuvieron nanopartículas a partir del tratamiento térmico controlado de EWP, evaluando el efecto del tiempo de calentamiento (0 a 20 min) y el pH de la solución (9,6 a 11,4) sobre la capacidad de unir ácido linoleico. En este caso, se determinó que el tratamiento térmico de EWP promovió un aumento en la capacidad de unir el CB. Además, cuando aumentó el pH se generó un mayor número de sitios de unión para ácido linoleico. De este modo, el pH representó el factor más influyente sobre la capacidad de las nanopartículas de incorporar ácido linoleico. Además, [Chang y col. \(2019\) \(125\)](#) encapsularon curcumina en nanopartículas de EWP obtenidas mediante tratamiento térmico a 90°C durante 30 min. Los autores informaron que la velocidad de degradación

disminuyó y la actividad antioxidante aumentó cuando el CB se encontró encapsulado en las nanopartículas de EWP.

Sin embargo, escasos trabajos científicos han reportado el empleo de EWP como matriz biopolimérica para la encapsulación de AEs. Por ejemplo, el desarrollo de películas para recubrimiento a partir de EWP y sorbitol ha permitido la incorporación de AE de salvia, melisa, naranja, cúrcuma y albahaca (126–129). A partir de estos estudios, se ha podido evaluar el efecto antibacteriano y antifúngico de las películas, con resultados variables según el AE incorporado y su concentración. Por otro lado, Rao y col. (2025) (130) obtuvieron nanogeles de EWP fosforilada y sin fosforilar utilizando los métodos de encapsulación de tratamiento con microondas seguido de homogeneización ultrasónica. Estos nanogeles fueron capaces de incorporar elevadas cantidades de AE de canela y presentaron mayor actividad antibacteriana que el AE libre.

### 3.1.3. Caracterización de sistemas de encapsulación proteicos

Las propiedades fisicoquímicas y morfológicas de las partículas proteicas determinan su comportamiento y estabilidad dentro de diferentes matrices y del TGI. Por lo tanto, un aspecto importante en el diseño y obtención de estas partículas biopoliméricas consiste en poder realizar una caracterización detallada de dichas propiedades para evaluar sus potenciales aplicaciones (31).

Existen diferentes métodos analíticos a través de los cuales se han podido caracterizar adecuadamente partículas obtenidas mediante diversos métodos de encapsulación. Dentro de las propiedades más importantes se pueden mencionar:

El **tamaño** es una característica fundamental de las partículas que debe ser evaluada, determinada a través de técnicas de dispersión de luz (estática o dinámica) y por diferentes técnicas de microscopía. En general, la dispersión de luz estática es adecuada para partículas relativamente grandes, mientras que la dispersión de luz dinámica se utiliza para analizar partículas de menor tamaño. Por otro lado, la microscopía óptica convencional es adecuada para la evaluación de partículas relativamente grandes (con diámetros mayores a 1  $\mu\text{m}$ ), mientras que la microscopía electrónica y la microscopía de fuerza atómica son herramientas útiles para analizar partículas de tamaño nanométrico (31).

Dentro de la microscopía electrónica existen dos variables ampliamente utilizadas: (i) microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscopy*), donde las muestras son comúnmente congeladas, secadas o fracturadas y recubiertas con una fina capa de metal; y (ii) microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés *Transmission Electron Microscopy*), donde la preparación de la muestra es generalmente más delicada, aunque los sistemas de biopolímeros deben ser tratados normalmente con un agente de contraste. En el caso de la microscopía de fuerza atómica,

es necesario que la preparación de la muestra sea delicada para evitar el daño o la alteración de las partículas (131).

La **carga eléctrica** de las partículas de biopolímeros es un parámetro crucial para predecir su estabilidad coloidal, y se informa comúnmente como un valor de potencial  $\zeta$ , el cual se determina mediante la aplicación de un campo eléctrico y el análisis de la movilidad electroforética resultante de las partículas cargadas. El potencial  $\zeta$  es altamente sensible al pH y a la fuerza iónica (43).

La carga eléctrica en macromoléculas individuales establece si se favorecerá la agregación de las partículas o si se mantendrán separadas. Si la carga es suficientemente grande, habrá una alta repulsión electrostática entre ellas que puede evitar su agregación (132). Además, la carga de las partículas influye sobre la interacción con otras especies cargadas en el medio circundante. Cuando una partícula de biopolímero tiene carga opuesta a la de otro biopolímero, entonces se puede formar un complejo electrostático capaz de precipitar y sedimentar (34). Finalmente, la carga eléctrica también determina la interacción de las partículas de biopolímeros con las diferentes superficies del TGI. Una partícula catiónica será capaz de unirse a la superficie aniónica de la lengua, causando así una sensación astringente que puede ser percibida por el consumidor (43).

Las macromoléculas pueden presentar, frecuentemente, más de una **conformación molecular**. Adicionalmente, la variación de ciertos parámetros (*e.g.*, pH, temperatura, fuerza iónica) y la unión de un compuesto a las partículas puede provocar cambios en dicha conformación. El estudio de la conformación molecular de estas partículas brinda información sustancial al momento de seleccionar las mejores condiciones para la incorporación de un CB o evaluar su unión. Las técnicas principalmente empleadas para este análisis son la espectroscopía de fluorescencia (intrínseca y extrínseca), la espectroscopía de dicroísmo circular y la espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés *Fourier Transform Infrared*) (110,133).

La **morfología** de las partículas y el grado de agregación generalmente se estudian empleando técnicas de microscopía. Las subestructuras de las partículas se pueden visualizar mediante tintes o sondas fluorescentes que se asocian selectivamente a ciertos componentes. La microscopía confocal de barrido láser también se puede utilizar en muestras fluorescentes y, generalmente, proporciona una imagen de mejor calidad respecto a las otras técnicas de microscopía. La técnica de SEM brinda información sobre las características superficiales de las partículas, como la composición y el relieve, mientras que la morfología interna puede ser evaluada empleando la técnica de TEM, posteriormente a la fijación, deshidratación y corte de la muestra. Por otro lado, mediante microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés *Atomic Force Microscopy*) es posible observar la topología superficial de micro y nanopartículas, con resolución en el rango de los nanómetros y la obtención de información tridimensional (31).

La determinación de la **composición** y del **estado físico** de las partículas y la distribución de CBs en su interior resulta desafiante debido a las dimensiones pequeñas con las cuales se debe trabajar. La

espectroscopia de fotoelectrones de rayos X se emplea para el análisis químico de la composición superficial de las partículas, mientras que el análisis elemental se utiliza para estudiar la composición global de las mismas y la capacidad de unión de ciertos compuestos. Otra técnica utilizada es la espectroscopía Raman, la cual puede proveer información acerca de la incorporación de CBs u otros componentes dentro de las partículas. Por otro lado, la calorimetría diferencial de barrido, la espectroscopía de infrarrojo y la espectroscopía Raman son técnicas que pueden ser utilizadas para detectar interacciones entre los biopolímeros. Finalmente, la cristalinidad de la matriz biopolimérica o de un compuesto incorporado en ella puede analizarse a través de la técnica de difracción de rayos X (31,110).

Las **propiedades ópticas** son atributos importantes cuando se considera la incorporación de partículas biopoliméricas en fármacos, cosméticos, alimentos, etc. Dado que las partículas de biopolímero suelen interactuar con la luz, pueden afectar las propiedades ópticas del producto donde se encuentren (134).

La apariencia general de una matriz se puede clasificar en dos atributos principales: (i) opacidad, que se determina principalmente por la dispersión de la luz; y (ii) color, que se determina principalmente por la absorción selectiva de determinadas longitudes de onda (135).

El impacto general de las partículas de biopolímero en las propiedades ópticas de un producto depende de su concentración, tamaño e índice de refracción. La turbidez u opacidad aumenta, comúnmente, a medida que aumenta el tamaño de las partículas en solución y a medida que aumenta el contraste del índice de refracción entre la partícula y su medio circundante. Al controlar el tamaño y el índice de refracción de las partículas de biopolímero, se pueden incorporar a un producto sin afectar las propiedades ópticas. Por lo tanto, productos que deben tener apariencia transparente deben incorporar partículas pequeñas ya que no dispersan la luz en gran medida. Por el contrario, productos opacos pueden incorporar partículas de gran tamaño ya que dispersan la luz en mayor medida (136).

Al evaluar la aptitud de un sistema de encapsulación frente a la potencial incorporación de un CB específico, los factores de interés que se deben considerar son la **capacidad de carga, eficiencia de encapsulación y retención**. La capacidad de carga se define como el porcentaje de masa de CB contenido en las partículas en relación con la masa total del sistema, mientras que la eficiencia de encapsulación se define como el porcentaje de masa de CB contenido en las partículas en relación con la masa total de CB en el sistema (dentro y fuera de las partículas) (31).

Por otro lado, la retención se define como el porcentaje de CB contenido en la partícula en un tiempo determinado en relación con el tiempo inicial o luego de someterlo a algún proceso como digestión enzimática. Los mecanismos más comunes por los cuales se produce la liberación del CB son: difusión, hinchamiento, disociación, erosión y/o degradación. Por lo general, las partículas se rompen o comienzan a desintegrarse bajo ciertos factores externos tales como cambios en el pH, fuerza iónica y temperatura, actividad enzimática o fuerzas mecánicas (31).



### 3.1.4. Actividad biológica de aceites esenciales encapsulados

#### 3.1.4.1. Actividad antioxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *Reactive Oxide Species*) y especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés *Reactive Nitrogen Species*) son generadas en el organismo a partir de procesos celulares, estrés ambiental o radiación UV. Bajo circunstancias normales, la velocidad de formación de ROS y RNS (potencialmente nocivas) se encuentra en equilibrio con la velocidad a la que son removidas o neutralizadas. Sin embargo, la pérdida del balance entre estas especies prooxidantes y compuestos antioxidantes endógenos conduce a un estado fisiológico de estrés oxidativo. Cuando esto ocurre, el exceso de ROS y RNS genera daños en las biomoléculas (tales como ácidos nucleicos, lípidos y proteínas) afectando gravemente la funcionalidad celular. En última instancia, el estrés oxidativo provoca la muerte celular por apoptosis o necrosis. Como se mencionó previamente, esta condición se asocia con procesos inflamatorios y con un gran número de enfermedades, incluyendo DM2 (137).

Los compuestos antioxidantes son categorizados en función de la línea de defensa en la cual actúan: (i) la primera línea de defensa evita la producción de radicales libres que conducen al estrés oxidativo a través de enzimas y cofactores; (ii) la segunda línea de defensa promueve la neutralización de radicales libres nocivos que causan las reacciones de oxidación; y (iii) la tercera línea de defensa se focaliza en reparar ácidos nucleicos, proteínas, peróxidos y lípidos oxidados, inhibiendo la propagación de las reacciones en cadena (138).

En este contexto, los AEs pueden actuar como agentes antioxidantes exógenos capaces de prevenir o revertir el estrés oxidativo. Fundamentalmente, el modo de acción puede involucrar la captación o neutralización de ROS, o la inhibición de diferentes vías de generación. Cuando se encapsula un AE con potencial capacidad antioxidante en una matriz biopolimérica, es posible que esta propiedad resulte afectada debido a las interacciones covalentes y no covalentes que suelen ocurrir entre los componentes del sistema (139). Por tal motivo, es necesario llevar a cabo ensayos experimentales adecuados para evaluar la actividad antioxidante de un AE luego de su encapsulación en partículas de biopolímeros. Estos ensayos pueden clasificarse como métodos *in vitro*, basados en líneas celulares o *in vivo*.

Un gran número de **métodos *in vitro*** ha sido empleado en estudios científicos para la medición directa de la transferencia del átomo de hidrógeno (HAT, por sus siglas en inglés *Hydrogen Atom Transfer*) o de la transferencia de electrón (SET, por sus siglas en inglés *Single Electron Transfer*) desde los compuestos antioxidantes hacia los radicales libres o especies prooxidantes. De este modo, la actividad antioxidante de un compuesto es constatada por su capacidad de captación de radicales libres, captación de ROS o reducción de iones prooxidantes a formas más estables. Además, puede evaluarse determinando su capacidad quelante de iones metálicos necesarios para la formación sitio-específica de radicales y su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica. Las reacciones involucradas en estas técnicas implican el

uso de radicales coloreados o especies no radicales oxidantes (tales como iones  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$ , generalmente formando parte de un complejo). Así, la actividad antioxidante de un AE libre o encapsulado puede determinarse empleando técnicas de espectroscopía, electroquímica o cromatografía. Los métodos *in vitro* son los más empleados debido a que requieren técnicas experimentales sencillas y económicas, proporcionan resultados confiables en poco tiempo y evitan la experimentación en animales. La principal desventaja es que, en la mayoría de los casos, los radicales empleados son sintéticos e irrelevantes desde el punto de vista biológico. Por lo tanto, estos métodos no reflejan la situación real de un organismo o alimento (140,141).

Si bien el método de captación de radical DPPH no fue empleado en la presente tesis, resulta oportuno mencionar su utilización en investigaciones recientes que evaluaron la actividad antioxidante de CBs encapsulados, particularmente AEs (141). En estos estudios, dicho método permitió evidenciar mejoras significativas en la capacidad antioxidante tras la encapsulación de los compuestos, tanto en nanocápsulas de zeína como en complejos de  $\beta$ -ciclodextrina metilada y microcápsulas de gelatina y goma arábiga entrecruzadas con ácido tánico, lo que respalda el potencial de estos sistemas para proteger y promover la funcionalidad de compuestos con posible actividad antidiabética (142–144).

El método de captación de radical catión ácido 2,2'azinobis-(3 etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) se utiliza para evaluar la capacidad de un compuesto antioxidante para estabilizar dicho radical catión mediante un mecanismo de transferencia electrónica. El radical catión ABTS es un cromóforo verde azulado que se obtiene a través de una reacción entre el ABTS y persulfato de potasio. Cuando esta especie es estabilizada en presencia de un agente antioxidante se decolora y la capacidad antioxidante puede ser determinada por espectroscopía a 734 nm. Este ensayo puede ser empleado para evaluar compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos (141). En un trabajo científico, se encapsuló AE de lavanda, árbol de té, bergamota y menta en perlas de alginato y se evaluó la actividad antioxidante mediante el método de captación de radical catión ABTS (145). Los autores informaron que la encapsulación permitió la retención de la capacidad antioxidante de todos los sistemas luego de 12 meses de almacenamiento, en porcentajes que se encontraron entre 33 y 80%, según el AE encapsulado. Por otro lado, Beigmohammadi y col. (2024) (146) encapsularon AE extraído a partir de la especie *Ferulago angulata* en emulsiones de concentrado de proteína de suero y maltodextrina, obteniendo finalmente micropartículas sólidas mediante secado *spray*. En este caso, la capacidad de captación de radical catión ABTS fue significativamente mayor cuando el AE se encontró en su forma libre. Sin embargo, la modificación del concentrado de proteína de suero por hidrólisis enzimática o ultrasonificación afectó la disponibilidad de los CBs, de manera que la actividad antioxidante de estas micropartículas mejoró considerablemente respecto a las micropartículas obtenidas con el material intacto. Los autores sugirieron que tales modificaciones permitirían la migración del AE hacia la superficie de las micropartículas.

Uno de los métodos utilizados para evaluar el poder reductor de compuestos antioxidantes se basa en la reducción del complejo  $\text{Fe}^{+3}$ -2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina ( $\text{Fe}^{+3}$ -TPTZ) a  $\text{Fe}^{+2}$ -TPTZ gracias a la capacidad de estos compuestos de donar electrones. El complejo reducido presenta color azul, y el poder reductor del agente antioxidante se determina mediante espectroscopía a 593 nm. La reacción mencionada se lleva a cabo a valores bajos de pH, los cuales no se corresponden con el pH fisiológico. Además, no tiene en cuenta todos los grupos antioxidantes (tales como el grupo sulfhidrilo) y, por lo tanto, puede reflejar una capacidad antioxidante menor a la que realmente presenta una muestra (141). Por otro lado, el poder reductor de un compuesto antioxidante también puede evaluarse según su capacidad de reaccionar con ferricianuro de potasio ( $\text{Fe}^{+3}$ ) para formar ferrocianuro de potasio ( $\text{Fe}^{+2}$ ). Posteriormente, el producto obtenido reacciona con  $\text{FeCl}_3$  dando lugar a la formación de ferrocianuro férrico (también denominado azul de Prusia), un complejo coloreado que puede determinarse por espectroscopía a 700 nm (147). En un trabajo reciente, Gonçalves da Rosa y col. (2020) (142) evaluaron el poder reductor de nanocápsulas de zeína cargadas con AE de tomillo y orégano determinando su capacidad de reducir el complejo  $\text{Fe}^{+3}$ -TPTZ. Los autores informaron que las nanocápsulas cargadas con AEs presentaron poder reductor significativamente mayor que las nanocápsulas sin AE evaluadas como control. Por otro lado, Damasceno y col. (2020) (148) encapsularon AE extraído a partir de la especie *Lippia origanoides* en nanogel de quitosano y ácido cafeico. Posteriormente, los autores compararon el poder reductor del nanogel conteniendo AE frente al nanogel sin AE y al AE en forma libre evaluando su capacidad de reducir el complejo  $\text{Fe}^{+3}$ -TPTZ. Los resultados permitieron concluir que la incorporación del AE en el nanogel afectó negativamente el poder reductor de los CBs debido, posiblemente, a que las interacciones con el polímero reducen su disponibilidad para la reducción de  $\text{Fe}^{+3}$ . Sin embargo, la encapsulación del AE en el nanogel provoca un aumento en el poder reductor respecto al nanogel sin AE incorporado.

La capacidad quelante de iones metálicos de un compuesto antioxidante puede evaluarse en función de la formación de quelatos ferrozina- $\text{Fe}^{+2}$ , el cual presenta color rojo. Esta reacción es limitada en presencia de otros agentes quelantes, lo que conlleva a una disminución de la coloración correspondiente al complejo ferrozina- $\text{Fe}^{+2}$ . La competencia entre ferrozina y otro compuesto quelante por  $\text{Fe}^{+2}$  puede ser determinada por espectroscopía a 562 nm (149). A diferencia de lo que ocurre con otros métodos *in vitro*, la capacidad quelante de iones metálicos de AEs encapsulados ha sido escasamente evaluada hasta el momento. En un trabajo científico, se comparó la capacidad quelante de  $\text{Fe}^{+2}$  de AE de limón antes y después de ser encapsulado en sílice porosa amorfa (150). Los autores observaron que no hubo diferencia significativa entre el AE en forma libre o encapsulado, y en ambos casos la capacidad quelante resultó significativamente menor que el compuesto de referencia ácido etilendiaminetetraacético (EDTA, por sus siglas en inglés *Ethylenediaminetetraacetic Acid*).

Los **métodos basados en líneas celulares** constituyen una herramienta valiosa para explorar, a nivel funcional y molecular, la actividad antioxidante de compuestos bioactivos y su posible implicancia en la regulación del estrés oxidativo celular, un proceso central en la fisiopatología de la DM2. Aunque estos

ensayos no fueron abordados experimentalmente en el presente trabajo, su inclusión resulta pertinente para contextualizar estudios recientes sobre AEs encapsulados. En este sentido, [Sousa Borges y col. \(2018\) \(151\)](#) reportaron que nanoemulsiones de Tween 20 cargadas con AE de romero mostraron capacidad antioxidante comparable a la quercetina en fibroblastos humanos, a partir de la medición de ROS. Por su parte, [Obeidnejad y col. \(2024\) \(152\)](#) observaron que el AE de *Satureja hortensis*, administrado a una línea de macrófagos, logró inhibir la expresión de NADH oxidasa y activar la expresión del factor de transcripción Nrf2, lo que sugiere un efecto protector frente al daño oxidativo. Estas evidencias destacan el potencial de estos métodos como herramientas complementarias para profundizar la comprensión de los mecanismos de acción de CBs con aplicaciones en estrategias de control de enfermedades crónicas como la DM2.

Aunque los **métodos *in vivo*** no fueron abordados en la parte metodológica de la presente tesis, su inclusión resulta pertinente a fin de contextualizar el uso de modelos animales en la evaluación del efecto antioxidante de CBs encapsulados. Estos ensayos permiten analizar biomarcadores clave vinculados al estrés oxidativo, como el malondialdehído o la actividad de enzimas antioxidantes, y aportan información relevante sobre la eficacia funcional de los sistemas evaluados en condiciones fisiológicas más complejas. En estudios recientes, se demostró que la administración de AEs encapsulados en nanoemulsiones o hidrogeles híbridos mejoró significativamente parámetros relacionados con la capacidad antioxidante plasmática y la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa en modelos murinos, respaldando el potencial de estos sistemas como estrategias de intervención frente al estrés oxidativo [\(153,154\)](#).

#### 3.1.4.2. Actividad antidiabética

La actividad antidiabética de AEs ha sido analizada a través de numerosos métodos *in vitro* e *in vivo*. Algunos de ellos son útiles para identificar alteraciones en el fenotipo celular relacionadas con la DM2, y se emplean como ensayos preliminares ya que no proporcionan información sobre el mecanismo de acción del CB. Dentro de este grupo se pueden mencionar: (i) ensayos de absorción de glucosa, en los cuales análogos de este carbohidrato se marcan radiactivamente o se miden los niveles de un fluoróforo como indicador del punto final de reacciones involucradas en la regulación de la absorción de glucosa; (ii) ensayos de expresión de genes reporteros, en los cuales se evalúa la regulación de genes candidatos relacionados con la DM2 (*e.g.*, *PPAR $\gamma$* , *KCNJ11*, *ABCC8*, etc.) a través de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*); (iii) ensayos de secreción de insulina, en los cuales se emplean la técnica ELISA o utilizan la enzima luciferasa para determinar los niveles de la hormona; (iv) ensayos de cuantificación de calcio, utilizando agentes quelantes cuyos complejos pueden determinarse por técnicas de espectroscopía; (v) ensayos de cuantificación de ATP intracelular, para los cuales se utiliza la enzima luciferasa; y (vi) ensayos de cuantificación de cAMP intracelular, para los cuales se emplean técnicas inmunoenzimáticas [\(155\)](#).

Por otro lado, algunos métodos permiten identificar el mecanismo de acción mediante el cual un CB ejerce un efecto antidiabético específico. Dentro de este grupo se pueden mencionar: (i) ensayos de expresión de genes que codifican transportadores de glucosa; y (ii) ensayos de actividad enzimática. Generalmente, se evalúa la expresión de genes que codifican para GLUT2 y GLUT4 mediante técnicas de PCR. El incremento de la expresión de estos genes favorece la absorción de glucosa en las células en las cuales cumplen su función. Además, es posible evaluar la actividad de enzimas clave para el metabolismo de carbohidratos, las cuales están directamente relacionadas con la DM2 (155). En el intestino, la  $\alpha$ -amilasa pancreática completa la digestión de PSs a disacáridos (iniciada en la boca por la  $\alpha$ -amilasa salival), mientras que la  $\alpha$ -glucosidasa presente en el borde en cepillo del intestino delgado digiere los disacáridos a monosacáridos. De este modo, la glucosa puede ser absorbida y secretada al torrente sanguíneo. La inhibición parcial de estas enzimas representa una estrategia para controlar la DM2, ya que retarda la absorción de glucosa en las células epiteliales, reduciendo la glucemia postprandial (72). Enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos pueden estar relacionadas indirectamente con la DM2. La inhibición de la enzima lipasa pancreática puede disminuir la cantidad de ácidos grasos libres en sangre, evitando un estado de estrés oxidativo, inflamación crónica y resistencia a la insulina (156). Finalmente, la enzima PTP1B puede provocar la desfosforilación de receptores de insulina activados, por lo que su inhibición contribuye al control de la DM2 (157).

En un estudio, Mohammed y col. (2020) (158) evaluaron el efecto de AE de canela encapsulado en concentrado de proteína de suero sobre parámetros bioquímicos relacionados con DM2 mediante diferentes ensayos *in vivo*, utilizando técnicas de espectroscopía. El nivel de glucosa y de enzima  $\alpha$ -amilasa en suero de ratas tratadas con AE encapsulado fue menor que el nivel en suero del grupo de ratas control. Además, el nivel de insulina en suero de ratas tratadas con AE encapsulado fue mayor que el nivel en suero del grupo de ratas control.

Por otro lado, la inhibición de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa por parte de AEs encapsulados ha sido evaluada fundamentalmente a través de métodos *in vitro*. En este sentido, nanofibras de zeína conteniendo AE extraído a partir de la especie *Ferula gummosa* fueron capaces de inhibir las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa y este efecto resultó dependiente de la concentración de AE (159). Diferentes AEs (extraídos a partir de las especies *Oliveria decumbens*, *Thymus kotschyianus*, *Trachyspermum ammi* y *Zataria multiflora*) fueron incorporados en partículas de gelatina y pectina. La inhibición de las enzimas digestivas por parte de estos AEs encapsulados fue mayor que la que presentó la partícula control sin AE, pero menor que el compuesto de referencia acarbosa (160).

### 3.1.4.3. Actividad antiinflamatoria

La inflamación crónica es una condición que puede desencadenar o exacerbar enfermedades, entre ellas la DM2. La actividad antiinflamatoria de AEs se ha evaluado a través de diversos métodos *in vitro* e *in vivo*.

Los **métodos *in vitro*** corresponden a ensayos simples, rápidos y de bajo costo. Algunos de ellos evalúan la actividad de enzimas proinflamatorias, tales como la lipooxigenasa (LOX), la ciclooxigenasa (COX) y la hialuronidasa, mediante técnicas manométricas o espectroscópicas. Además, el óxido nítrico cumple un rol clave en la regulación de la permeabilidad vascular y en la migración celular inducida por sustancias proinflamatorias. Por lo tanto, la cuantificación de óxido nítrico en cultivos celulares a través de técnicas de espectroscopía o GC permite estudiar la actividad antiinflamatoria de un CB. Finalmente, la producción de citoquinas proinflamatorias en cultivos celulares es un parámetro importante en el análisis de potenciales agentes antiinflamatorios. El factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés *Tumor Necrosis Factor*) es una citoquina mediadora de la respuesta inflamatoria que estimula la respuesta inmune innata activando células T y macrófagos que, a su vez, promueven la liberación de otras citoquinas inflamatorias. Además, TNF es un mediador de la inflamación inducida por carragenina y es capaz de estimular la liberación de quininas y leucotrienos. La determinación de TNF puede realizarse en cultivos celulares mediante técnicas de espectroscopía empleando el colorante cristal violeta. Las interleucinas son factores linfoides que median la interacción entre diversas células del sistema inmunitario. De este modo, cumplen una función importante en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. La determinación de las interleucinas se realiza, principalmente, mediante la técnica ELISA (161).

En un estudio, [Risaliti y col. \(2019\)](#) (162) evaluaron la inhibición enzimática de LOX por parte de AEs (extraídos a partir de las especies *Salvia triloba* y *Rosmarinus officinalis*) libres y cargados en liposomas. Los autores reportaron que los AEs en forma libre no fueron capaces de inhibir la enzima, mientras que los liposomas cargados con AE exhibieron moderada actividad inhibitoria, similar al compuesto de referencia ácido nordihidroguaiarético.

Diversos estudios han empleado **métodos *in vivo*** para evaluar el efecto de CBs encapsulados sobre el estrés oxidativo, proporcionando evidencia funcional bajo condiciones fisiológicas más representativas. Si bien este tipo de abordajes no fue incorporado en la metodología de la presente tesis, su mención resulta relevante para contextualizar hallazgos recientes. Al respecto, se ha observado que la administración de AEs vehiculizados en complejos de  $\beta$ -ciclodextrina a modelos murinos con estrés oxidativo inducido condujo a una mayor capacidad antioxidante plasmática y a una mayor actividad de enzimas clave como la superóxido dismutasa, en comparación con los controles (163). Estos resultados respaldan el potencial de los sistemas de encapsulación no solo para preservar la funcionalidad de los CBs, sino también para amplificar su eficacia biológica en condiciones fisiopatológicas relevantes.

### 3.1.5. Elección de aceites esenciales

En la presente tesis, la elección de cada AE se fundamentó en criterios científico-tecnológicos relacionados con su disponibilidad regional, su uso tradicional como condimentos y aditivos naturales, la evidencia previa de su actividad biológica y su potencial incorporación en matrices alimentarias. Adicionalmente, se consideró la conformación de un grupo de AEs heterogéneo en cuanto a su perfil químico que permitiera abarcar diversos mecanismos de acción en el contexto de su potencial bioactividad. La sumatoria de estos criterios posicionó a los aceites esenciales de canela, comino, limón, tomillo y orégano como candidatos particularmente adecuados para ser evaluados en profundidad, en el marco del desarrollo de estrategias innovadoras orientadas a la prevención y el abordaje de enfermedades crónicas.

## 3.2. OBJETIVOS

Los objetivos específicos del capítulo son:

**Objetivo 1:** Caracterizar aceites esenciales con potencial actividad biológica según su composición química.

**Objetivo 2:** Estudiar y caracterizar la formación de complejos de partículas proteicas que encapsulan aceites esenciales.

**Objetivo 3:** Evaluar la actividad biológica de aceites esenciales encapsulados en complejos de partículas proteicas.

## 3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.3.1. Materiales

Para los estudios desarrollados en el presente capítulo se utilizó clara de huevo (EW, por sus siglas en inglés *Egg White*) industrial, la cual fue adquirida en Compañía Avícola SA (Argentina) en forma de líquido pasteurizado, con composición de acuerdo con el fabricante de 10,50% de proteína, 0,40% de cenizas, 0,03% de grasa y 14,2° Brix de sólidos totales. La muestra de EW se mantuvo almacenada a -20°C hasta el momento de ser utilizada.

Por otro lado, el aceite esencial de canela extraído de corteza de *Cinnamomum cassia* (CAN, Número CAS: 8007-80-5), aceite esencial de comino extraído de semilla de *Cuminum cyminum* (COM, Número CAS: 8014-13-9), aceite esencial de limón extraído de cáscara de *Citrus limon* (LIM, Número CAS: 8008-56-8), aceite esencial de tomillo extraído de la parte aérea de *Thymus vulgaris* (TOM, Número CAS: 8007-46-3), aceite esencial de orégano extraído de la parte aérea de *Origanum vulgare* (ORE, Número CAS: 8007-11-2) fueron comprados en Sigma-Aldrich (Estados Unidos).

Los reactivos analíticos fueron suministrados por Cicarelli (Argentina), Biopack (Argentina) y Merck (Alemania).

### 3.3.2. Caracterización de aceites esenciales

#### 3.3.2.1. Contenido fenólico total

Los AEs seleccionados en la presente tesis para su estudio, CAN, COM, LIM, TOM y ORE, fueron evaluados según su Contenido Fenólico Total (TPC, por sus siglas en inglés *Total Phenolic Content*) siguiendo el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo con Bag y Chattopadhyay (2015) (164). Para ello, se adicionó 1 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (F9252, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) diluido 1:10 en agua desionizada a 500  $\mu$ L de muestra (solución de AE en etanol absoluto, concentración 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). Luego de 3 min de incubación, se adicionaron 3 mL de solución Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% m/v y la mezcla se agitó mecánicamente con vórtex. Se incubó durante 2 h a 25°C y, posteriormente, la absorbancia (ABS) fue determinada a 760 nm utilizando un equipo espectrofotómetro UV-vis Jenway 7305 (Reino Unido). El mismo volumen de etanol absoluto, en reemplazo de la muestra, fue adicionado para la obtención del blanco. El TPC fue calculado mediante la ecuación obtenida por regresión lineal ( $R^2$  adj. 0,997) correspondiente a la curva de calibrado obtenida a partir de soluciones de ácido gálico (G7384, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) como reactivo estándar. Las determinaciones fueron llevadas a cabo a 25°C y realizadas por triplicado. Los resultados fueron expresados como mg de equivalente de ácido gálico g<sup>-1</sup> AE (mg EAG g<sup>-1</sup> AE).

#### 3.3.2.2. Análisis GC-FID/MS

Los AEs seleccionados en la presente tesis para su estudio, CAN, COM, LIM, TOM y ORE, fueron analizados según su composición química mediante GC-FID/MS, utilizando un cromatógrafo de gases Thermo Trace 1300 (Thermo Fisher Scientific Inc., Estados Unidos) equipado con un detector de ionización de llama (FID, por sus siglas en inglés *Flame Ionization Detector*) y un espectrómetro de masas ISQ Series (Thermo Fisher Scientific Inc., Estados Unidos), siguiendo la metodología de Hanafi y col. (2014) (165) con algunas modificaciones. Para la separación de los componentes se empleó una columna capilar TR 5MS (30 m  $\times$  0,25 mm d. i., espesor de película 0,25  $\mu$ m). La temperatura del inyector y del detector fue 300°C. La temperatura inicial fue 40°C, la cual fue incrementada gradualmente a una velocidad de 5°C min<sup>-1</sup> hasta 200°C y mantenida en este valor durante 20 min. Se utilizó He como gas de arrastre y su velocidad lineal fue 1,5 mL min<sup>-1</sup>, en una relación de *split* de 100:1. Para el análisis, se inyectó un volumen de muestra de 1,0  $\mu$ L. La identificación de los componentes de los AEs fue llevada a cabo mediante la comparación del espectro de masas registrado con los espectros *standard* tomados de la biblioteca NIST MS utilizando el *software* Xcalibur. El análisis cuantitativo (expresado como porcentaje de área) se realizó



a partir de la normalización del área de los picos. Finalmente, se seleccionó el área del pico como señal analítica para la determinación del contenido relativo (CR, %) de los componentes identificados.

### 3.3.3. Obtención de nanopartículas EWPn

Las nanopartículas de proteína de clara de huevo (EWPn, por sus siglas en inglés *Egg White Protein Nanoparticles*) fueron obtenidas según Sponton y col. (2020) (166). Para ello, se preparó una solución *stock* de proteína de clara de huevo (EWP, por sus siglas en inglés *Egg White Protein*) diluyendo 1,0 L de EW industrial con 200 mL de agua desionizada (conductividad  $< 0,056 \text{ mS cm}^{-1}$ ). Luego de ajustar el pH a 6,0 utilizando HCl 2 N, la solución fue centrifugada a 2.000 g durante 20 min con el objetivo de separar la fracción proteica correspondiente a mucinas (167). Posteriormente, el sobrenadante fue recuperado y el pH fue ajustado a 11,4 utilizando NaOH 2 N. La concentración de proteína fue verificada por espectroscopía de absorción UV a 280 nm utilizando un espectrofotómetro Jenway 7305 (Reino Unido), considerando un coeficiente de extinción de  $0,835 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La concentración de proteína de la solución *stock* EWP fue 8,5% m/v. A partir de la solución *stock* se obtuvo una nueva solución de EWP al 5% m/v y el pH de esta fue corregido a 11,4 con NaOH 2 N. Finalmente, un volumen de 1,0 L de solución EWP 5% m/v (pH 11,4) fue colocado en un reactor *batch* y sometido a un tratamiento térmico de 85°C durante 5 min, bajo agitación magnética. Una vez finalizado el tratamiento térmico, la solución EWPn obtenida fue expuesta a circulación de agua fría (con el objetivo de detener el proceso de agregación proteica) y luego mantenida a 4°C hasta su posterior utilización.

### 3.3.4. Formación de complejos EWPn-AE

La concentración de proteína de solución EWPn obtenida previamente se ajustó a 4% m/v con agua desionizada y el pH de la solución fue corregido a 7,0, 9,0 y 11,4 con HCl 2 N o NaOH 2 N. La formación de complejos EWPn-AE fue llevada a cabo aplicando una técnica antisolvente (168). Para ello, soluciones de AE al 2% m/v en etanol absoluto fueron agregadas a las soluciones de EWPn 4% m/v a pH 7,0, 9,0 y 11,4 bajo agitación magnética en una relación 10:1 (EWPn:AE) en masa. Esta relación fue seleccionada según evaluaciones preliminares de estabilidad coloidal. Como control, la misma cantidad de etanol absoluto, en reemplazo de solución de AE, fue adicionada a las soluciones de EWPn 4% m/v a pH 7,0, 9,0 y 11,4. Los complejos EWPn-AE y los controles EWPn fueron mantenidos a 4°C durante toda la noche con el objetivo de alcanzar la estabilización.

### 3.3.5. Caracterización de complejos EWPn–AE

#### 3.3.5.1. Distribución de tamaño de partícula y potencial $\zeta$

Los complejos EWPn–AE y los controles EWPn obtenidos previamente fueron analizados según su distribución de tamaño de partícula (PSD, por sus siglas en inglés *Particle Size Distribution*) mediante dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés *Dynamic Light Scattering*) utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) conteniendo un láser de He-Ne de longitud de onda de salida de 632,8 nm y ángulo fijo 173°, ejecutado bajo el *software* Zetasizer versión 7.12 (166). El diámetro hidrodinámico de partícula ( $d_H$ , nm) fue obtenido a partir de la PSD basada en intensidad (PSDi, %). La PSD basada en volumen (PSDv, %) también fue considerada para el análisis. Las muestras fueron diluidas con agua desionizada y el pH fue reajustado a 7,0, 9,0 y 11,4, de manera de obtener una concentración final de proteína de 1% m/v. Las mediciones fueron llevadas a cabo a 25°C y los índices de refracción utilizados para el solvente (agua) y la proteína fueron 1,33 y 1,50, respectivamente. La viscosidad del solvente (agua) se consideró 0,8872 cP. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Por otro lado, el potencial  $\zeta$  (mV) de los complejos EWPn–AE y los controles EWPn fue evaluado utilizando el mismo equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) y su *software* (169). Los valores se obtuvieron a partir de la distribución de movilidad electroforética por medio de la técnica de velocidad Doppler láser, y fueron calculados según el modelo de Smoluchowski. Las muestras fueron diluidas con agua desionizada y reajustadas a pH 7,0, 9,0 y 11,4, de manera de obtener una concentración final de proteína de 0,1% m/v. Las mediciones fueron llevadas a cabo a 25°C y realizadas por triplicado.

#### 3.3.5.2. Espectroscopía de fluorescencia intrínseca y extrínseca

Los complejos EWPn–AE y los controles EWPn fueron caracterizados mediante espectroscopía de fluorescencia utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F-7000 (Japón) ejecutado bajo el *software* FL Solutions versión 4.2, según Visentini y col. (2019) (21). Las muestras fueron diluidas con agua desionizada y reajustadas a pH 7,0, 9,0 y 11,4, de manera de obtener una concentración final de proteína de 0,01% m/v. Las determinaciones de fluorescencia intrínseca (debida a la emisión del Trp) fueron realizadas a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) de 295 nm, y el espectro de emisión fue obtenido en el rango 320–420 nm. Los valores de intensidad de fluorescencia fueron reportados como intensidad de fluorescencia máxima debida al Trp ( $IF_{max-Trp}$ , u.a.). Además, se determinó la longitud de onda correspondiente a dicha intensidad máxima ( $\lambda_{max-Trp}$ , nm). Las determinaciones de fluorescencia extrínseca (debida a la sonda fluorescente ANS) fueron realizadas a una  $\lambda_{ex}$  de 390 nm, y el espectro de emisión fue obtenido en un rango de 420 a 600 nm. Para ello, se adicionaron 9  $\mu$ L de la sonda fluorescente ácido 1-anilino-8-naftaleno sulfónico (ANS, Número CAS: 82-76-8, Fluka Chemie AG, Suiza) 15 mM a 3 mL de muestra. Los valores de intensidad de fluorescencia fueron informados como intensidad de fluorescencia

máxima debida al ANS ( $IF_{\max-ANS}$ , u.a.). Además, se informó la longitud de onda correspondiente a dicha intensidad ( $\lambda_{\max-ANS}$ , nm). Las determinaciones de fluorescencia intrínseca y extrínseca fueron llevadas a cabo a 25°C y realizadas por triplicado.

### 3.3.5.3. Eficiencia de encapsulación

La fracción de AE encapsulado en nanopartículas EWPn, expresada como eficiencia de encapsulación (EE, %), fue determinada mediante espectroscopía de absorción UV-vis a 280 nm utilizando un espectrofotómetro Lambda 20 UV-Vis (Perkin Elmer, Estados Unidos) ejecutado bajo el *software* UV WinLab versión 5.1.5.0637, según la metodología propuesta por [Deseta y col. \(2021\) \(170\)](#) con algunas modificaciones. Para ello, las muestras de EWPn-AE a los valores de pH de 7,0, 9,0 y 11,4 fueron ajustadas a pH 4,6 con HCl 2 N (con el objetivo de precipitar los complejos proteicos) y centrifugadas a 10.000 g durante 10 min y a 25°C. Posteriormente, 300  $\mu$ L del sobrenadante se mezclaron con 3 mL de acetato de etilo, se agitó mecánicamente con vórtex durante 1 min y se centrifugó a 2.000 g durante 2 min y a 25°C. La fase superior correspondiente al acetato de etilo fue extraída y la ABS fue determinada a una longitud de onda específica según el espectro obtenido para cada AE, es decir, 282 nm para CAN, 258 nm para COM, 310 nm para LIM, 274 nm para TOM y 276 nm para ORE (datos no mostrados). Además, el mismo procedimiento fue realizado para los controles EWPn ajustados a pH 7,0, 9,0 y 11,4, y la ABS fue obtenida a 282, 258, 310, 274 y 276 nm, de manera que cada longitud de onda corresponda con el pico de ABS característico de cada AE. Por otro lado, se obtuvieron curvas de calibrado realizando diluciones seriadas a partir de una solución *stock* de AE en acetato de etilo de concentración 20 mg mL<sup>-1</sup>. Los rangos de concentración comprendidos fueron 0,00025 – 0,01000 mg mL<sup>-1</sup> para CAN, 0,0005 – 0,2000 mg mL<sup>-1</sup> para COM, 0,01 – 1,00 mg mL<sup>-1</sup> para LIM y 0,004 – 0,040 mg mL<sup>-1</sup> para TOM y ORE. Los coeficientes de correlación ( $R^2$  adj.) registrados se encontraron entre 0,915 (TOM) y 0,999 (ORE). Las mediciones fueron llevadas a cabo a 25°C y realizadas por triplicado. La cantidad de AE encapsulado ( $AE_E$ ) fue calculada como la diferencia entre la cantidad total de AE inicialmente adicionada en la formación de los complejos ( $AE_T$ ) y la cantidad de AE determinada en los sobrenadantes ( $AE_S$ , AE no encapsulado). La EE (%) fue determinada como sigue:

$$EE = \frac{AE_E}{AE_T} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2}),$$

donde  $AE_E$  y  $AE_T$  corresponden a la cantidad de AE encapsulado y total, respectivamente, expresada en mg.

### 3.3.6. Actividad antioxidante de complejos EWPn–AE

#### 3.3.6.1. Actividad de captación de radical ABTS<sup>+</sup>

La actividad de captación de radical ABTS<sup>+</sup> ( $A_{ABTS^+}$ ,  $IC_{50}$  expresado como mg proteína g<sup>-1</sup>) de los complejos EWPn–AE obtenidos a pH 11,4 fue determinada por espectroscopía, según [Cian y col. \(2014\) \(171\)](#). En primer lugar, la solución de radical ABTS<sup>+</sup> fue preparada haciendo reaccionar 10 mL de reactivo ácido 2,2'azinobis-(3 etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS, A1888, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 2 mM con 40 µL de persulfato de potasio 70 mM y mantenida por 16 h a 25°C y en oscuridad. Posteriormente y previo a realizar el ensayo, la solución de radical ABTS<sup>+</sup> fue diluida con solución salina tamponada con fosfato 0,01 M (PBS, por sus siglas en inglés *Phosphate-buffered Saline*, pH 7,4) de forma de obtener un valor de ABS de  $0,80 \pm 0,03$  a 734 nm. Luego, un volumen de 10 µL de una dilución de la muestra fue adicionado a 190 µL de solución de radical ABTS<sup>+</sup> y la mezcla fue incubada en oscuridad a 25°C durante 6 min. Luego de transcurrido el tiempo correspondiente, la ABS fue determinada a 734 nm utilizando un espectrofotómetro Biochrom Asys UVM–340 (Reino Unido). Además, el mismo procedimiento fue realizado para el control EWPn obtenido a pH 11,4. Por otro lado, el mismo volumen de PBS en reemplazo de la muestra fue adicionado para la preparación del blanco. Las determinaciones fueron llevadas a cabo a 25°C y realizadas por triplicado. El porcentaje de captación de radical ABTS<sup>+</sup> ( $C_{ABTS^+}$ , %) fue calculado como:

$$C_{ABTS^+} = \frac{ABS_{blanco} - ABS_{muestra}}{ABS_{blanco}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3}),$$

donde  $ABS_{blanco}$  y  $ABS_{muestra}$  corresponden a la ABS del blanco y de la muestra, respectivamente.

El ajuste de los datos obtenidos a partir de diluciones seriadas se realizó según la siguiente ecuación:

$$y = a - (b \times c^x) \quad (\text{Ecuación 4}),$$

donde  $y$  corresponde a la tasa de captación,  $a$ ,  $b$  y  $c$  corresponden a parámetros de regresión y  $x$  es la concentración expresada en mg proteína g<sup>-1</sup> sistema.

La concentración de proteína necesaria para la captación del 50% del radical ABTS<sup>+</sup> ( $IC_{50}$ , mg proteína g<sup>-1</sup>), es decir, la concentración de proteína que es capaz de decolorar el 50% del radical ABTS<sup>+</sup>, fue obtenida a partir de la siguiente ecuación:

$$IC_{50} = \ln[(a - 50)b^{-1}] / \ln c \quad (\text{Ecuación 5}),$$

donde  $IC_{50}$  es la concentración de proteína para la captación del 50% del radical ABTS<sup>+</sup>, expresada en mg proteína g<sup>-1</sup>, y  $a$ ,  $b$  y  $c$  corresponden a parámetros de regresión.

### 3.3.6.2. Actividad de poder reductor

La actividad de poder reductor ( $A_{PR}$ , g sistema  $g^{-1}$  proteína) de los complejos EWPn–AE obtenidos a pH 11,4 fue determinada por espectroscopía, según el método descrito en [Cian y col. \(2015\) \(172\)](#), con algunas modificaciones. Un volumen de 100  $\mu$ L de una dilución de la muestra fue adicionado a 100  $\mu$ L de *buffer* fosfato 0,2 M (pH 6,6) y 100  $\mu$ L de solución de ferricianuro de potasio 1% m/v. La mezcla fue incubada a 50°C durante 20 min y, posteriormente, 100  $\mu$ L de una solución de ácido tricloroacético al 10% m/v fue adicionada. Luego, se centrifugó a 8.000 g durante 5 min y a 25°C, y 100  $\mu$ L de sobrenadante fue mezclado con 20  $\mu$ L de  $FeCl_3$  0,1% m/v y 100  $\mu$ L de agua desionizada. La mezcla se mantuvo en oscuridad a 50°C durante 10 min y, una vez transcurrido el tiempo correspondiente, la ABS fue determinada a 700 nm utilizando un espectrofotómetro Biochrom Asys UVM–340 (Reino Unido). Además, el mismo procedimiento fue realizado para el control EWPn obtenido a pH 11,4. Por otro lado, el mismo volumen de agua desionizada en reemplazo de la muestra fue adicionado para la preparación del control negativo y el mismo volumen de agua desionizada en reemplazo de la muestra y en reemplazo del cloruro férrico fue adicionado para la preparación del blanco. Las determinaciones fueron llevadas a cabo a 25°C por triplicado.

La  $A_{PR}$  fue calculada obteniendo curvas de ABS en función de la concentración y registrando coeficientes de regresión lineal ( $R^2$  adj.) entre 0,97 y 0,99. Tras ajuste de los datos experimentales al modelo, las pendientes fueron consideradas como valores de  $A_{PR}$  y se expresaron como g sistema  $g^{-1}$  proteína.

### 3.3.6.3. Actividad quelante de hierro

La actividad quelante de hierro (ICA, por sus siglas en inglés *Iron-chelating Activity*,  $IC_{50}$  expresado como mg proteína  $g^{-1}$ ) de los complejos EWPn–AE obtenidos a pH 11,4 fue determinada por espectroscopía utilizando un kit comercial (Fer-color AA, Wiener Lab, Argentina), de acuerdo con [Cian y col. \(2016\) \(173\)](#). Para ello, un volumen de 25  $\mu$ L de una dilución de la muestra fue adicionado a 25  $\mu$ L de solución de hierro 8 mg  $L^{-1}$  y la mezcla fue incubada a 25°C durante 30 min. Luego de transcurrido el tiempo correspondiente, se agregó a la mezcla un volumen de 100  $\mu$ L de *buffer* acetato 150 mM (pH 4,5) conteniendo ácido ascórbico 0,03 mM y 25  $\mu$ L de solución de ferrozina 0,2 mM. La ABS fue determinada a 560 nm luego de 5 min de adicionada la ferrozina utilizando un espectrofotómetro Biochrom Asys UVM–340 (Reino Unido). Además, el mismo procedimiento fue realizado para el control EWPn obtenido a pH 11,4. Por otro lado, el mismo volumen de *buffer* acetato en reemplazo de la muestra y en reemplazo de la solución de hierro fue adicionado para la preparación del control negativo y del blanco, respectivamente. Las determinaciones fueron llevadas a cabo en oscuridad a 25°C y realizadas por triplicado.

El porcentaje de captación de hierro ( $C_{Fe}$ , %) fue calculado como:

$$C_{Fe} = \frac{ABS_{blanco} - ABS_{muestra}}{ABS_{blanco}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 6}),$$

donde  $ABS_{blanco}$  y  $ABS_{muestra}$  corresponden a la ABS del blanco y de la muestra, respectivamente.

El ajuste de los datos obtenidos a partir de diluciones seriadas se realizó según la siguiente ecuación:

$$y = a - (b \times c^x) \quad (\text{Ecuación 7}),$$

donde  $y$  corresponde a la tasa de quelación de hierro,  $a$ ,  $b$  y  $c$  corresponden a parámetros de regresión y  $x$  es la concentración expresada en mg proteína  $g^{-1}$ .

La concentración de proteína necesaria para la quelación del 50% de hierro ( $IC_{50}$ , mg proteína  $g^{-1}$ ), es decir, la concentración de proteína que es capaz de decolorar el 50% de la ferrozina, fue obtenida a partir de la siguiente ecuación:

$$IC_{50} = \ln[(a - 50)b^{-1}] / \ln c \quad (\text{Ecuación 8}),$$

donde  $IC_{50}$  es la concentración de proteína para la quelación del 50% de hierro, expresada en mg proteína  $g^{-1}$ , y  $a$ ,  $b$  y  $c$  corresponden a parámetros de regresión.

### 3.3.7. Actividad antidiabética de complejos EWPn-AE

#### 3.3.7.1. Actividad inhibitoria de $\alpha$ -amilasa

La actividad inhibitoria de  $\alpha$ -amilasa ( $A_{ami}$ ,  $IC_{50}$  expresado como  $\mu g$  AE  $mL^{-1}$ ) de los complejos EWPn-AE obtenidos a pH 11,4 fue determinada utilizando un kit comercial (Amilokit, Wiener Lab, Argentina), siguiendo la metodología de Costamagna y col. (2016) (174). En primer lugar, la mezcla de reacción conteniendo 800  $\mu L$  de *buffer* fosfato sódico 0,01 M (pH 7,4), 5  $\mu L$  de  $\alpha$ -amilasa (67688, Fluka Chemie AG, Suiza) ( $10 U mL^{-1}$ ) y 195  $\mu L$  de una dilución de la muestra fue incubada a  $4^{\circ}C$  durante 5 min. Luego, se inició la reacción enzimática mediante el agregado de 500  $\mu L$  de reactivo A (almidón) y la mezcla se incubó a  $37^{\circ}C$  durante 7 min. Con el objetivo de revelar la presencia de almidón, se adicionó un volumen de 500  $\mu L$  de reactivo B (solución de yodo) y la mezcla se llevó a un volumen final de 2,90 mL con agua desionizada. Posteriormente, la ABS fue determinada a 640 nm utilizando un espectrofotómetro UV2400 PC (Nade, China). El mismo volumen de *buffer* fosfato sódico 0,01 M en reemplazo de la muestra fue adicionado para la obtención del blanco. Como compuesto de referencia se utilizó acarbose (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Las determinaciones fueron llevadas a cabo a  $25^{\circ}C$  y realizadas por triplicado.

El porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -amilasa ( $I_{ami}$ , %) fue calculado como:

$$I_{ami} = \frac{ABS_{blanco} - ABS_{muestra}}{ABS_{blanco}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 9}),$$

donde  $ABS_{blanco}$  y  $ABS_{muestra}$  corresponden a la ABS del blanco y de la muestra, respectivamente.

Además, para determinar la  $A_{ami}$  se obtuvo el valor de  $IC_{50}$ , definido como la concentración de muestra necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima. En primer lugar, se prepararon diluciones seriadas de las muestras de 40 a 500  $\mu\text{g}$  muestra  $\text{mL}^{-1}$ . Los datos experimentales obtenidos fueron ajustados según la ecuación:

$$y = y_0 + A * \exp^{R_0 x} \quad (\text{Ecuación 10}),$$

donde  $y$  es la tasa de inhibición,  $y_0$ ,  $A$  y  $R_0$  son parámetros de regresión, y  $x$  es la concentración de muestra. Por último, el valor de  $IC_{50}$  fue obtenido como:

$$IC_{50} = \ln \frac{(50 - \frac{y_0}{A})}{R_0} \quad (\text{Ecuación 11}),$$

donde  $y_0$ ,  $A$  y  $R_0$  son parámetros de regresión.

### 3.3.7.2. Actividad inhibitoria de $\alpha$ -glucosidasa

La actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa ( $A_{glu}$ ,  $IC_{50}$  expresado como  $\mu\text{g}$  AE  $\text{mL}^{-1}$ ) de los complejos EWPn-AE obtenidos a pH 11,4 fue determinada según la metodología descrita por Costamagna y col. (2016) (174) con algunas modificaciones. En primer lugar, la mezcla de reacción conteniendo 160  $\mu\text{L}$  de *buffer* fosfato de sodio 0,1 M (pH 6,9), 5  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -glucosidasa (117F8205, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) (5,46 U  $\text{mL}^{-1}$ ) y 250  $\mu\text{L}$  de una dilución de la muestra fue incubada a 4°C durante 10 min. Luego, se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de reactivo 4-nitrofenil  $\alpha$ -D-glucopiranosido (pNPG, por su nombre en inglés *p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside*, BCBN2675V, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 25 mM y la mezcla fue incubada a 37°C durante 15 min. Por último, un volumen de 80  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio 0,2 M fue adicionado y la ABS fue determinada a 420 nm utilizando un lector de microplaca Biotek ELx808 (Estados Unidos). El mismo volumen de *buffer* fosfato de sodio 0,1 M en reemplazo de la muestra fue adicionado para la obtención del blanco. Como compuesto de referencia se utilizó acarbosa (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Las determinaciones fueron llevadas a cabo a 25°C y realizadas por triplicado.

El porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa ( $I_{glu}$ , %) fue calculado como:

$$I_{glu} = \frac{ABS_{blanco} - ABS_{muestra}}{ABS_{blanco}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 12}),$$

donde  $ABS_{blanco}$  y  $ABS_{muestra}$  corresponden a la ABS del blanco y de la muestra, respectivamente.

Además, para determinar la  $A_{glu}$  se obtuvo el valor de  $IC_{50}$ , definido como la concentración de muestra necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima. En primer lugar, se prepararon diluciones seriadas de las muestras de 0,4 a 130  $\mu\text{g}$  muestra  $\text{mL}^{-1}$ . Los datos experimentales obtenidos fueron ajustados según la ecuación:

$$y = y_0 + A * \exp^{R_0 x} \quad (\text{Ecuación 13}),$$

donde  $y$  es la tasa de inhibición,  $y_0$ ,  $A$  y  $R_0$  son parámetros de regresión, y  $x$  es la concentración de muestra. Por último, el valor de  $IC_{50}$  fue obtenido como:

$$IC_{50} = \ln \frac{(50 - \frac{y_0}{A})}{R_0} \quad (\text{Ecuación 14}),$$

donde  $y_0$ ,  $A$  y  $R_0$  son parámetros de regresión.

### 3.3.7.3. Actividad inhibitoria de lipasa pancreática

La actividad inhibitoria de lipasa pancreática ( $A_{lip}$ ,  $IC_{50}$  expresado como  $\mu\text{g AE mL}^{-1}$ ) de los complejos EWPn-AE obtenidos a pH 11,4 fue determinada mediante la hidrólisis enzimática del *p*-nitrofenil palmitato a *p*-nitrofenol, siguiendo la metodología de Costamagna y col. (2016) (174). En primer lugar, una mezcla conteniendo la enzima lipasa pancreática (BCR693, Fluka Chemie AG, Suiza) ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y  $150 \mu\text{L}$  de una dilución de muestra fue incubada a  $4^\circ\text{C}$  durante 10 min. Posteriormente, se añadió un volumen de  $330 \mu\text{L}$  de *buffer* fosfato de sodio  $0,1 \text{ M}$  (pH 7,0) suplementado con Triton X-100 (Fluka Chemie AG, Suiza)  $0,6\% \text{ m/v}$  y goma arábiga  $0,15\% \text{ m/v}$ . La reacción fue iniciada mediante el agregado de  $20 \mu\text{L}$  de sustrato *p*-nitrofenil palmitato (pNPP109K5200, Sigma-Aldrich, Estados Unidos)  $10 \text{ mM}$  y la mezcla fue incubada a  $37^\circ\text{C}$  durante 20 min. El mismo volumen de *buffer* fosfato de sodio  $0,1 \text{ M}$  en reemplazo de la muestra fue adicionado para la obtención del blanco. Por último, la ABS fue determinada a  $400 \text{ nm}$  utilizando un lector de microplaca Biotek ELx808 (Estados Unidos). Como compuesto de referencia se utilizó orlistat (tetrahidrolipstatina, código ATC: A08AB01, Laboratorio Elea, Argentina). Las determinaciones fueron llevadas a cabo a  $25^\circ\text{C}$  y realizadas por triplicado.

El porcentaje de inhibición de lipasa pancreática ( $I_{lip}$ , %) fue calculado como:

$$I_{lip} = \frac{ABS_{blanco} - ABS_{muestra}}{ABS_{blanco}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 15}),$$

donde  $ABS_{blanco}$  y  $ABS_{muestra}$  corresponden a la ABS del blanco y de la muestra, respectivamente.

Además, para determinar la  $A_{lip}$  se obtuvo el valor de  $IC_{50}$ , definido como la concentración de muestra necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima. En primer lugar, se prepararon diluciones seriadas de las muestras de 3 a  $70 \mu\text{g muestra mL}^{-1}$ . Los datos experimentales obtenidos fueron ajustados según la ecuación:

$$y = y_0 + A * \exp^{R_0 x} \quad (\text{Ecuación 16}),$$

donde  $y$  es la tasa de inhibición,  $y_0$ ,  $A$  y  $R_0$  son parámetros de regresión, y  $x$  es la concentración de muestra. Por último, el valor de  $IC_{50}$  fue obtenido como:

$$IC_{50} = \ln \frac{(50 - \frac{y_0}{A})}{R_0} \quad (\text{Ecuación 17}),$$



donde  $y_0$ ,  $A$  y  $R_0$  son parámetros de regresión.

### 3.3.8. Actividad inhibitoria de lipooxigenasa de complejos EWPn-AE

La actividad inhibitoria de lipooxigenasa ( $A_{lox}$ ,  $IC_{50}$  expresado como  $\mu g$  AE  $mL^{-1}$ ) de los complejos EWPn-AE obtenidos a pH 11,4 fue evaluada mediante la determinación de la producción de hidroperóxidos a partir de la oxidación del ácido linoleico, según Torres Carro y col. (2017) (175). Para ello, a partir de la mezcla de reacción conteniendo la enzima lipooxigenasa LOX-1 de soja (LOX-1, L2630, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) ( $948 U mL^{-1}$ ) disuelta en 50  $\mu L$  de *buffer* borato de sodio 0,2 M (pH 9,0), 18  $\mu L$  de sustrato ácido linoleico (L1376, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 50  $\mu M$  y 1732  $\mu L$  de una dilución de muestra, la ABS fue determinada luego de 5 min, utilizando un espectrofotómetro Jasco v-630 Bio (Japón) a 234 nm. El mismo volumen de *buffer* borato de sodio 0,2 M en reemplazo de la muestra fue adicionado para la obtención del blanco. Como compuesto de referencia se utilizó naproxeno (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Las determinaciones fueron llevadas a cabo a 25°C y realizadas por triplicado.

El porcentaje de inhibición de lipooxigenasa ( $I_{lox}$ , %) fue calculado como:

$$I_{lox} = \frac{ABS_{blanco} - ABS_{muestra}}{ABS_{blanco}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 18}),$$

donde  $ABS_{blanco}$  y  $ABS_{muestra}$  corresponden a la ABS del blanco y de la muestra, respectivamente.

Además, para determinar la  $A_{lox}$  se obtuvo el valor de  $IC_{50}$ , definido como la concentración de muestra necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima. En primer lugar, se prepararon diluciones seriadas de las muestras de 2 a 30  $\mu g$  muestra  $mL^{-1}$ . Los datos experimentales obtenidos fueron ajustados según la ecuación:

$$y = y_0 + A * \exp^{R_0 x} \quad (\text{Ecuación 19}),$$

donde  $y$  es la tasa de inhibición,  $y_0$ ,  $A$  y  $R_0$  son parámetros de regresión, y  $x$  es la concentración de muestra. Por último, el valor de  $IC_{50}$  fue obtenido como:

$$IC_{50} = \ln \frac{(50 - y_0)}{A} \frac{1}{R_0} \quad (\text{Ecuación 20}),$$

donde  $y_0$ ,  $A$  y  $R_0$  son parámetros de regresión.

### 3.3.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de todas las determinaciones analíticas se realizó por medio de análisis de variancia (ANOVA), utilizando el *software* R con interfaz RStudio versión 1.4.1717. Las diferencias significativas entre medias fueron determinadas utilizando test LSD con 95% de confianza

( $p < 0,05$ ). Para determinar los parámetros derivados del ajuste de modelos matemáticos se utilizó el *software* Origin versión 8.0724.

### 3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.4.1. Caracterización de aceites esenciales

##### 3.4.1.1. Contenido fenólico total

Los efectos positivos de AEs sobre la salud han sido atribuidos particularmente a la mezcla compleja de compuestos fenólicos que estos contienen. Los compuestos fenólicos se caracterizan por presentar uno o más anillos aromáticos con al menos un grupo hidroxilo unido. Comprenden un gran número de moléculas de estructuras diversas que pueden ser simples y pequeñas (terpenos, ácidos fenólicos, etc.) o más complejas y de alto PM, tales como taninos y flavonoides (176).

Estudios previos han demostrado que, en algunas especies de plantas (hierbas aromáticas y especias) con alto contenido de AE, existe una correlación entre la cantidad de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de ellas (77,177,178). Se ha sugerido que estos compuestos son capaces de romper la cadena de reacción de la oxidación de lípidos en el primer paso de iniciación mediante la donación de hidrógeno a los radicales libres presentes, y dicha capacidad de captar radicales podría ser explicada considerando los grupos hidroxilos que se encuentran en este grupo de moléculas (179,180).

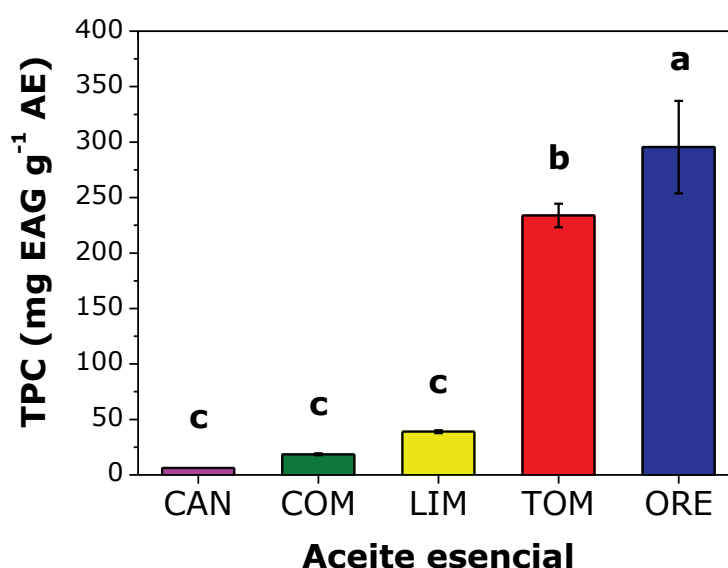
Por otro lado, se ha reportado que ciertos compuestos fenólicos son capaces de controlar y/o prevenir desórdenes metabólicos, entre ellos DM2, inhibiendo la actividad de enzimas clave tales como aldosa reductasa,  $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -glucosidasa y lipasa pancreática (181,182). Además, se ha comprobado el efecto inhibitorio de enzimas involucradas en procesos inflamatorios (fosfolipasa, hialuronidasa, LOX, etc.) que presentan algunos extractos vegetales con alto contenido de compuestos fenólicos (175,183).

Debido a lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo se estudió el contenido fenólico total (TPC) de los AEs. La Fig. 4 muestra los valores de TPC para CAN, COM, LIM, TOM y ORE (expresados como mg EAG g<sup>-1</sup> AE). Como se puede observar, ORE y TOM presentaron los valores más altos ( $295,5 \pm 41,6$  y  $233,9 \pm 10,7$  mg EAG g<sup>-1</sup> AE, respectivamente) y, a su vez, ORE evidenció un valor de TPC significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) al valor de TOM. En otros estudios, Prakash y col. (2012) (184) y Teixeira y col. (2013) (185) obtuvieron valores considerablemente más bajos para AE de *Origanum majorana* y *Origanum vulgare*, respectivamente. En el primer caso, el valor reportado fue de  $10,00 \mu\text{g EAG mg}^{-1}$  AE, y en el segundo de  $16,3 \text{ mg EAG g}^{-1}$  AE. Por otro lado, Aljabeili y col. (2018) (177) reportaron un resultado relativamente menor de TPC para AE extraído de *Thymus vulgaris*, el cual exhibió  $177 \text{ mg EAG g}^{-1}$  AE. El TPC obtenido para ambos AEs en la presente tesis fue superior al informado en la mayoría

de los estudios consultados, lo que podría deberse a variaciones en la especie botánica utilizada, el quimiotipo, el origen geográfico o el proceso de extracción aplicado, entre otros factores.

Además, no hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores de TPC presentados por CAN, COM y LIM ( $6,2 \pm 0,0$ ,  $18,6 \pm 0,8$  y  $39,0 \pm 1,2$  mg EAG g<sup>-1</sup> AE, respectivamente), siendo estos menores a ORE y TOM (Fig. 4). Al evaluar AE extraído a partir de corteza de canela *Cinnamomum zeylanicum*, Kamaliroosta y col. (2012) (186) informaron un valor de TPC de 5,7 mg EAG g<sup>-1</sup> en peso seco, con un rendimiento de extracción de 1,3%. En otro trabajo, se analizó AE de la misma especie, obteniéndose en este caso un valor de TPC de 53,74 mg EAG mL<sup>-1</sup> AE (187). Por su parte, Moghaddam y col. (2015) (77) exhibieron valores entre 25,52 y 40,00 mg EAG g<sup>-1</sup> AE para AE extraído de frutos de *Cuminum cyminum*. Además, Moosavy y col. (2017) (178) estudiaron AE de *Citrus limon* y reportaron un valor de TPC de 81,82 mg EAG g<sup>-1</sup> AE.

En el caso de CAN, el TPC obtenido fue comparable al reportado en algunos estudios previos, aunque inferior al de otros trabajos. Para COM, los resultados se situaron en el rango inferior de los valores descritos en la literatura, mientras que el valor de TPC de LIM fue considerablemente menor que el informado en estudios anteriores. En general, las diferencias que se evidenciaron entre los valores de TPC de los AEs empleados en el presente trabajo y aquellos reportados en la literatura podrían deberse a diversos factores relacionados con el material vegetal del cual proviene el AE, su tratamiento previo y/o posterior a la cosecha, el método de extracción del AE, etc. (81,82). De igual forma, el análisis de TPC brindó una primera visión requerida para predecir y comprender posibles actividades biológicas por parte de los AEs utilizados en la presente tesis.



**Figura 4.** Contenido fenólico total (TPC) de aceites esenciales de canela, comino, limón, tomillo y orégano (CAN, COM, LIM, TOM y ORE, respectivamente) expresado como mg de equivalente de ácido gálico por gramo de AE (mg EAG g<sup>-1</sup> AE). Cada barra representa el promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 3.4.1.2. Análisis GC-FID/MS

La identificación de los compuestos químicos presentes en AEs resulta de gran utilidad cuando el análisis tiene el propósito de investigar adulteración, comparar, caracterizar y clasificar sus componentes principales. La cromatografía de gases es una técnica de separación ampliamente utilizada en el análisis de mezclas multicomponentes, tales como AEs. Además, para poder identificar los compuestos químicos que están presentes en dicha mezcla, es necesario el empleo de un detector específico (por ejemplo, espectrómetro de masas) (188).

Para examinar la composición química de CAN, COM, LIM, TOM y ORE, se llevó a cabo un análisis de GC-FID/MS. La Tabla 2 muestra los compuestos identificados en cada AE, con su correspondiente tiempo de retención ( $t_r$ , min) y contenido relativo (CR, %). En todas las muestras, los compuestos identificados representaron más del 99,20% del total, con excepción de ORE, para el cual fue posible identificar el 97,60% de los componentes.

En primer lugar, 8 compuestos fueron identificados en CAN, siendo el componente mayoritario el *trans*-cinamaldehído (3-fenil-2-propenal), que presentó un valor de CR de 83,70% (Tabla 2). Además, *o*-metoxi-cinamaldehído fue el segundo compuesto en orden de CR (9,83%) y acetato de cinamilo también fue identificado, siendo el tercer compuesto más abundante con un valor de CR de 3,58%. El ácido *o*-hidroxiciámico presentó un CR de 1,12%, y los demás compuestos identificados en CAN exhibieron

valores de CR que representaron menos del 1%. Estos resultados fueron consistentes con [Hu y col. \(2018\) \(189\)](#), quienes reportaron que *trans*-cinamaldehído fue el principal componente presente en AE comercial de canela, pero el CR fue menor que el indicado en el presente trabajo (64,94%). Además, indicaron la presencia de acetato de cinamilo y eugenol, los cuales exhibieron valores de CR considerablemente altos (10,78% y 4,30%, respectivamente). Por otro lado, [Sihoglu Tepe y col. \(2020\) \(190\)](#) también señalaron a *trans*-cinamaldehído como el componente mayoritario (81,39%) de AE extraído de corteza de canela (*Cinnamomum zeylanicum*). Los compuestos acetato de cinamilo y *cis*-cinamaldehído fueron identificados con valores de CR de 4,20 y 3,42%, respectivamente.

El *trans*-cinamaldehído es un aldehído aromático  $\alpha,\beta$ -insaturado perteneciente a la clase de los fenilpropanoides. Es ampliamente utilizado en la industria alimentaria debido a que está clasificado como sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS, por sus siglas en inglés Generally Recognized As Safe) por la FDA y sustancia segura por la FEMA (*Flavor and Extract Manufacturers Association*), ambos organismos estadounidenses [\(191\)](#). Entre las propiedades biológicas que se han adjudicado al *trans*-cinamaldehído, se destacan su elevada actividad antimicrobiana [\(192,193\)](#). Por otro lado, se ha demostrado que *trans*-cinamaldehído disminuye los niveles de productos de la peroxidación lipídica e incrementa la actividad de enzimas antioxidantes, tales como la enzima superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa [\(194\)](#). Además, este compuesto ha sido capaz de aumentar la absorción de glucosa, mejorar la sensibilidad a la insulina en tejido adiposo y músculo esquelético, regular la actividad de enzimas tales como proteína tirosina fosfatasa 1B y  $\alpha$ -amilasa, entre otros efectos evaluados tanto *in vitro* como *in vivo*, convirtiéndolo en un promisorio agente antidiabético [\(157\)](#).

Como se observa en la [Tabla 2](#), 8 componentes fueron identificados en COM y, entre ellos, los compuestos mayoritarios resultaron 2-metil-3-fenil-propanal y  $\gamma$ -terpineno, los cuales presentaron un CR de 37,03 y 28,70%, respectivamente. Además, los compuestos  $\alpha$ -pineno, *o*-cimenol y 2-careol exhibieron un CR considerable en COM (15,85, 10,27 y 6,52%, respectivamente). Los compuestos restantes identificados en COM exhibieron valores de CR que representaron menos del 1%. Por su parte, [Karimirad y col. \(2019\) \(195\)](#) obtuvieron COM a partir de semillas secas y reportaron que cuminaldehído (4-isopropilbenzaldehído) y  $\gamma$ -terpinen-7-ol fueron los compuestos mayoritarios, con similar CR (23,60 y 22,23%, respectivamente). Además, los compuestos  $\gamma$ -terpineno (19,20%) y  $\beta$ -pineno (15,40%) exhibieron elevados valores de CR. Otros autores informaron que el compuesto mayoritario en AE de semilla de comino resultó ser cuminaldehído, con un valor de CR de 19,54% [\(196\)](#). Luego, los compuestos alcohol cumínico,  $\alpha$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno y una mezcla de anetol y estragol presentaron valores de CR cercanos a 8%. Aunque varios estudios han demostrado la presencia de cuminaldehído en COM, incluso siendo el componente más abundante, no se ha identificado este compuesto en el análisis llevado a cabo en el presente trabajo [\(197\)](#). La ausencia de cuminaldehído en el perfil cromatográfico obtenido podría atribuirse a diferencias en el quimiotipo de la planta utilizada, así como a factores asociados a la variabilidad genética,

las condiciones agroclimáticas, el estado de maduración de las semillas o el método específico de extracción empleado, los cuales pueden influir notablemente en la composición cuali-cuantitativa del AE.

El 2-metil-3-fenil-propanal ha sido identificado en extracto metanólico de jengibre (*Zingiber officinale*) y ha evidenciado actividad antibacteriana, aunque los autores han atribuido dicha propiedad principalmente a otros componentes presentes en la muestra (198). Al margen del estudio mencionado, no se han encontrado en la literatura suficientes trabajos científicos que identifiquen y evalúen la bioactividad de 2-metil-3-fenil-propanal, y sus propiedades deberían ser investigadas con mayor detenimiento.

El  $\gamma$ -terpineno es un monoterpeno perteneciente a la familia de los ciclohexadienos, el cual ha demostrado actividad antibacteriana, antifúngica y antioxidante (199,200). Se ha identificado en AEs de diversas plantas aromáticas y especias. Sin embargo, escasos estudios sobre la bioactividad de  $\gamma$ -terpineno han sido hallados en literatura.

Por otra parte, D-limoneno (1-metil-4-(1-metiletenil)ciclohexeno) resultó el principal componente entre 10 compuestos identificados en LIM, presentando un valor de CR de 75,18% (Tabla 2). Además, fueron identificados los compuestos  $\alpha$ -pineno y  $\gamma$ -terpineno (CR de 13,56 y 7,43%, respectivamente). Por último, el  $\alpha$ -ocimeno exhibió un CR de 1,63%, y los demás compuestos identificados en LIM exhibieron valores de CR que representaron menos del 1%. Esta caracterización fue consistente con lo reportado por ElAoubi y col. (2023) (201), quienes obtuvieron AE de cáscara de limón (*Citrus limon*) e informaron que D-limoneno fue el compuesto más abundante, con valores de CR entre 48,56 y 53,44%. Los autores también indicaron que  $\beta$ -pineno y  $\gamma$ -terpineno se encontraron presentes en alta proporción (superior al 12%). En otro estudio, se analizó AE obtenido a partir de flores de limón (*Citrus limon*) y la composición química fue similar a lo reportado previamente, con elevado CR de D-limoneno (39,74%) y  $\beta$ -pineno (25,44%) (202). Nuevamente, las diferencias observadas en la proporción relativa de ciertos compuestos, particularmente  $\beta$ -pineno, podrían deberse a un gran número de factores que influyen en la diversidad química de los AEs.

D-limoneno es un monoterpeno cíclico, siendo uno de los terpenos más abundantes en la naturaleza ya que se encuentra en AEs de numerosas especies de cítricos. Es ampliamente utilizado en la industria cosmética y alimentaria debido a su intenso aroma a limón y, fundamentalmente, a que está clasificado como sustancia GRAS por la FDA (203). Los efectos biológicos de D-limoneno han sido extensamente estudiados, y se le ha atribuido actividad antiviral, anticancerígena, antiinflamatoria, antidiabética y antioxidante, entre otras (204). Shah y col. (2018) (205) han evaluado la capacidad antioxidante de D-limoneno mediante seis técnicas *in vitro*. En todas ellas, el compuesto ha presentado elevada actividad, con excepción del ensayo correspondiente a la actividad quelante de hierro. Por su parte, se ha demostrado que D-limoneno fue capaz de restablecer parámetros relacionados con el control de DM en un modelo *in vivo*, tales como nivel de glucosa en sangre, nivel de hemoglobina A1c y nivel de insulina en suero (206). Además, D-limoneno ha evidenciado efecto inhibitorio frente a las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, claves en el metabolismo de la glucosa, incluso superior al *standard* acarbosa (207). Otros autores

reportaron fuerte actividad inhibitoria *in vitro* de la enzima LOX por parte del compuesto D-limoneno (208).

**Tabla 2.** Composición química de aceite esencial de canela, comino, limón, tomillo y orégano (CAN, COM, LIM, TOM y ORE, respectivamente) determinada por GC-FID/MS.  $t_r$ : tiempo de retención, expresado en min. CR: contenido relativo, expresado en %.

Aceite esencial	Compuesto	$t_r$ (min)	CR (%)
CAN	Benzaldehído	6,41	0,77
	Salicilaldehído	8,52	0,19
	Hidrocinamaldehído	11,74	0,15
	<i>o</i> -anisaldehído	13,88	0,26
	<i>trans</i> -cinamaldehído	15,45	<b>83,70</b>
	Cinamilacetato	19,21	3,58
	Ácido <i>o</i> -hidroxi-ciámico	19,34	1,12
	<i>o</i> -metoxi-cinamaldehído	21,48	9,83
COM	$\alpha$ -ocimeno	5,55	0,76
	Tujeno	6,52	0,14
	$\alpha$ -pineno	6,75	15,85
	<i>o</i> -cimeno	7,95	10,27
	$\gamma$ -terpineno	8,90	<b>28,70</b>
	Felandral	12,65	0,52
	2-metil-3-fenil-propanal	14,37	<b>37,03</b>
	2-caren-10-al	15,38	6,52
LIM	$\alpha$ -ocimeno	5,46	1,63
	$\alpha$ -pineno	6,66	13,56
	D-limoneno	8,17	<b>75,18</b>
	$\gamma$ -terpineno	8,76	7,43
	<i>p</i> -menta-1,4(8)-diene	9,38	0,20
	<i>trans</i> -citral	13,69	0,40
	<i>cis</i> -citral	14,50	0,68
	Neril acetato	16,66	0,25
	2-norpineno-2,6-dimetil-6-(4-metil-3-pentenil)	18,51	0,23
	$\alpha$ -bisaboleno	20,36	0,37
TOM	$\alpha$ -ocimeno	5,60	2,91

	$\alpha$ -mirceno	6,89	1,35
	<i>o</i> -cimeno	8,08	<b>35,24</b>
	$\gamma$ -terpineno	8,85	7,85
	$\alpha$ -linalool	10,01	5,79
	Timol	15,56	<b>44,61</b>
	Cariofileno	18,47	0,87
	Óxido de cariofileno	22,49	0,62
<b>ORE</b>	$\alpha$ -mirceno	6,86	1,01
	<i>o</i> -cimeno	7,96	8,84
	$\gamma$ -terpineno	8,81	6,91
	$\alpha$ -linalool	9,92	1,87
	Carvacrol	15,89	<b>76,73</b>
	Cariofileno	18,46	1,73
	Óxido de cariofileno	22,46	0,50

Como se observa en la [Tabla 2](#), los principales componentes identificados en TOM fueron timol (5-metil-2-propan-2-ilfenol, CR 44,61%) y *o*-cimeno (CR 35,24%). Luego, los compuestos  $\gamma$ -terpineno y  $\alpha$ -linalool presentaron valores de CR de 7,85 y 5,79%, respectivamente. Por último,  $\alpha$ -ocimeno y  $\alpha$ -mirceno también fueron identificados en TOM, los cuales presentaron valores de CR de 2,91 y 1,35%, respectivamente. Otros dos compuestos identificados exhibieron valores de CR que representaron menos del 1%. Con respecto a estos resultados, [Radünz y col. \(2021\) \(72\)](#) hallaron una composición química similar para TOM siendo timol el compuesto mayoritario (54,5%), seguido por *o*-cimol (27,0%). Del mismo modo, [Aljabeili y col. \(2018\) \(177\)](#) reportaron que timol fue el componente principal identificado en TOM, el cual exhibió un valor de CR de 41,04%. Sin embargo, los compuestos eugenol y  $\gamma$ -terpineno fueron también identificados presentando valores de CR considerables (14,26 y 12,06%, respectivamente). Por su parte, [Hu y col. \(2018\) \(189\)](#) informaron que *o*-cimeno fue el componente mayoritario identificado en AE comercial de tomillo (24,60%), mientras que timol fue el segundo compuesto más abundante (23,15%). Como se mencionó previamente, estas variaciones en la proporción relativa de timol y *o*-cimeno, así como la presencia o ausencia de otros compuestos como eugenol, podrían explicarse por una serie de factores internos y externos que influyen en la composición química del AE (*e.g.*, quimiotipo, origen de la materia vegetal, condiciones de almacenamiento, proceso de extracción, etc.).

El timol es un monoterpeno fenólico que se encuentra en AEs de plantas aromáticas de diversas especies. Las industrias cosmética, farmacéutica y alimentaria han demostrado gran interés en el empleo de este compuesto debido a que ha presentado gran potencial terapéutico, exhibiendo efecto antiviral, antibacteriano, antioxidante, antidiabético, antiinflamatorio, etc. [\(209,210\)](#). Algunos autores han evaluado



en estudios *in vitro* la capacidad de captación de radicales libres (DPPH y ABTS<sup>+</sup>) y la capacidad reductora de timol obteniendo resultados interesantes (211,212). Por otro lado, Ranjbaran y col. (2019) (213) analizaron la capacidad antioxidante de timol mediante ensayos *in vitro* y en cultivo celular de macrófagos. Este compuesto fue capaz de captar radicales ABTS<sup>+</sup>, radicales DPPH, radicales superóxido y óxido nítrico y de inhibir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad. Además, la producción de ROS y de óxido nítrico disminuyó significativamente cuando las células fueron cultivadas en presencia de timol. Este compuesto también disminuyó la expresión génica de enzimas involucradas en la producción de especies oxidantes en macrófagos. Por su parte, Saravanan y Pari (2015) (214) demostraron el potencial antidiabético de timol en ratones con DM2 inducida por una dieta alta en grasas. Los autores pudieron observar una disminución del nivel de glucosa en sangre, disminución del índice de resistencia a la insulina y disminución del nivel de hemoglobina A1c cuando los animales fueron tratados con timol. Además, Cutillas y col. (2018) (208) y Marsik y col. (2005) (215) reportaron fuerte actividad inhibitoria *in vitro* de las enzimas LOX y COX-1, respectivamente, por parte de timol.

El compuesto *o*-cimenol es un monoterpeno hidrocarbonado que consiste en un anillo bencénico sustituido con un grupo metilo y un grupo isopropilo. Se encuentra en AEs de plantas aromáticas de diversas especies, que al ser analizados han presentado actividad antimicrobiana (216). Sin embargo, en comparación con su isómero *p*-cimenol que ha sido extensamente estudiado, se han encontrado escasos trabajos en literatura que evalúen las propiedades biológicas de *o*-cimenol.

Finalmente, 7 compuestos fueron identificados en ORE, siendo carvacrol (2-metil-5-propan-2-ilfenol) el componente mayoritario con un CR de 76,73% (Tabla 2). Además, los compuestos *o*-cimenol y  $\gamma$ -terpineno presentaron valores de CR considerables (8,84 y 6,91%, respectivamente). También fueron identificados en ORE los compuestos  $\alpha$ -linalool (1,87%), cariofileno (1,73) y  $\alpha$ -mirreno (1,01%). El componente restante identificado en este análisis presentó un CR menor al 1%. Estos resultados fueron comparables con los de Zinno y col. (2023) (59), quienes indicaron porcentajes entre 80,59 y 84,7% para el contenido de carvacrol y porcentajes entre 5,33 y 7,11% para el contenido de  $\gamma$ -terpineno (segundo componente más abundante) en AE extraído a partir de hojas y flores de orégano (*Origanum vulgare*). Otros autores, por su parte, informaron que los componentes mayoritarios en tres muestras de AE extraído a partir de tallos y hojas de la planta de orégano (*Origanum vulgare*) resultaron cariofileno y timol. En dicho análisis, no se informó la presencia de carvacrol entre los compuestos identificados (217). La variabilidad en los perfiles químicos reportados para ORE podría deberse a factores ambientales, prácticas de cultivo o al tipo de procesamiento postcosecha, así como también al quimiotipo utilizado, que pueden influir notablemente en la proporción de compuestos como carvacrol, timol o cariofileno.

El carvacrol es un monoterpeno fenólico, isómero de timol, que se encuentra en AEs de plantas aromáticas de diversas especies (218). Es ampliamente utilizado en la industria alimentaria y sus

propiedades biológicas (antibacteriana, antiviral, anticancerígena, antioxidante, entre otras) han sido extensamente estudiadas y comprobadas (209). Numerosos autores han informado la capacidad que presenta carvacrol para captar radicales DPPH y ABTS<sup>+</sup> y para neutralizar radicales hidroxilo, aunque muchos de ellos coinciden en que la actividad antioxidante es menor a la presentada por su isómero timol (211,212,219). Por otro lado, Bayramoglu y col. (2014) (220) reportaron que carvacrol fue capaz de disminuir el nivel de glucosa en suero en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina. Un efecto similar fue observado por Li y col. (2020) (221), quienes indicaron que el nivel de glucosa en plasma disminuyó en ratones con diabetes inducida por el mismo compuesto luego de ser tratados con carvacrol. Además, carvacrol exhibió actividad inhibitoria de enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa en estudios *in vitro* (222). Por su parte, Taibi y col. (2024) (223) evaluaron la acción antiinflamatoria de carvacrol mediante la determinación de las actividades enzimáticas de 5-LOX, COX-1 y COX-2, las que fueron inhibidas en presencia de dicho compuesto.

En síntesis, para comprender estos resultados debería considerarse que diferentes factores internos y externos controlan la síntesis de metabolitos secundarios en plantas aromáticas. Generalmente, la genética (variedad y quimiotipo), diversos factores ambientales tales como la ubicación geográfica, altitud, temperatura, luz solar, características agronómicas, prácticas de cultivo y estadio de maduración de la planta, condiciones de secado y almacenado del material vegetal cosechado, entre otros parámetros, afectan en gran medida la composición química de AEs (77,81,197). Además, la variación en la composición química entre AEs obtenidos a partir de una misma especie podría estar relacionada con el método de extracción empleado (224).

Debido a lo expuesto previamente y a las diferencias halladas entre los resultados del análisis del presente trabajo y la literatura, el conocimiento de la composición química de AEs utilizando GC-FID/MS es de gran relevancia, particularmente cuando se desea comprender y justificar las potenciales actividades biológicas que los AEs podrían presentar.

### **3.4.2. Caracterización de complejos EWPn–AE**

#### **3.4.2.1. Distribución de tamaño de partícula y potencial $\zeta$**

Se ha comprobado que para obtener elevada estabilidad coloidal en medios acuosos se requieren pequeños tamaños de partícula y altos valores de potencial  $\zeta$  (21). Por lo general, las partículas con potencial  $\zeta$  más positivos que +30 mV o más negativos que -30 mV son consideradas altamente estables (225).

Por otro lado, el pH del medio acuoso en el que se encuentra una proteína determina el tipo y la distribución de cargas sobre su superficie, afectando tanto el plegamiento intramolecular como las interacciones proteína-proteína (226). De este modo, las fuerzas electrostáticas y las repulsiones estéricas son responsables de la estabilidad de los sistemas proteicos frente a los fenómenos de agregación (227).

En el presente trabajo se evaluó, mediante DLS, la PSD de los complejos EWPn-AE y los controles EWPn obtenidos a concentración de proteína 1% m/v y ajustados a valores de pH 7,0, 9,0 y 11,4. En la [Tabla 3](#) se presenta el  $d_H$  de partícula expresado en nm, el cual fue determinado a partir de la PSDi (%), y el volumen correspondiente determinado a partir de la PSDv (%). Como puede observarse, todos los sistemas evaluados presentaron dos o tres poblaciones de partículas (representadas en curvas bimodales o trimodales), con excepción del control EWPn a pH 7,0, el cual presentó una única población de partículas (96%). Tanto los sistemas EWPn-AE como los controles EWPn exhibieron un pico principal (volumen mayor a 50% en la PSDv) con valores de  $d_H$  en el rango de tamaño nanométrico (es decir, menores a 100 nm), y esto ocurrió bajo todas las condiciones de pH evaluadas. En general, el control EWPn a pH 9,0 y 11,4 presentó los menores  $d_H$  ( $10 \pm 1$  y  $10 \pm 3$  nm, respectivamente) y el mayor valor de  $d_H$  fue exhibido por EWPn-COM a pH 7,0 ( $65 \pm 12$  nm).

La [Fig. 5](#) muestra el  $d_H$  de partícula (expresado en nm) determinado a partir de la PSDi (%) correspondiente al pico principal, es decir, al pico que presentó volumen mayor a 50% en la PSDv (%) para los nanocomplejos EWPn-AE y los controles EWPn a concentración de proteína de 1% m/v y pH 7,0, 9,0 y 11,4. En primer lugar y considerando los picos principales, los valores de  $d_H$  aumentaron cuando los AEs fueron encapsulados en EWPn, excepto en el caso de los nanocomplejos EWPn-CAN a pH 7,0 y EWPn-ORE a pH 7,0 y 9,0. En dichos casos particulares no hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los valores de  $d_H$  de los nanocomplejos y del control, al ser analizados en la misma condición de pH ([Fig. 5](#)). El aumento de tamaño que se observó cuando cada AE es encapsulado en EWPn fue variable, sugiriendo que su asociación a la nanopartícula proteica se llevaría a cabo de forma diferencial, según las moléculas presentes en los AEs, es decir, según su composición química discutida previamente ([Sección 3.4.1.2](#)).

Por otro lado, cuando sistemas proteicos se encuentran a valores de pH significativamente menores o mayores que su pI (cercano a 5,0 para las principales proteínas de EW), las macromoléculas de proteína se alejan unas de otras debido a la repulsión electrostática existente, condición que promueve una agregación mínima y controlada durante un tratamiento térmico. Del mismo modo, una modificación en el valor de pH de 7,0 a 11,4 podría conducir a la obtención de partículas más pequeñas, debido al incremento de las repulsiones electrostáticas ([166](#)). Efectivamente, en casi todos los sistemas evaluados los valores de  $d_H$  correspondientes al pico principal disminuyeron con el aumento de pH de 7,0 a 9,0, pero no hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) cuando el pH se modificó de 9,0 a 11,4. Sin embargo, los nanocomplejos EWPn-TOM y EWPn-ORE exhibieron los menores valores de  $d_H$  a pH 9,0 ([Tabla 3](#)). Además, el comportamiento de las poblaciones de partículas correspondientes al segundo y tercer pico de las curvas bimodales y trimodales siguió la misma tendencia, es decir, los valores de  $d_H$  resultaron menores a valores de pH más altos y los nanocomplejos EWPn-TOM y EWPn-ORE exhibieron los menores tamaños de partícula a pH 9,0.

**Tabla 3.** Valores de diámetro hidrodinámico ( $d_H$ , nm) y volumen (%) de los sistemas EWPn y EWPn–AE evaluados a diferentes valores de pH (7,0, 9,0 y 11,4). Resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos de un mismo sistema y pico ( $p < 0,05$ ).

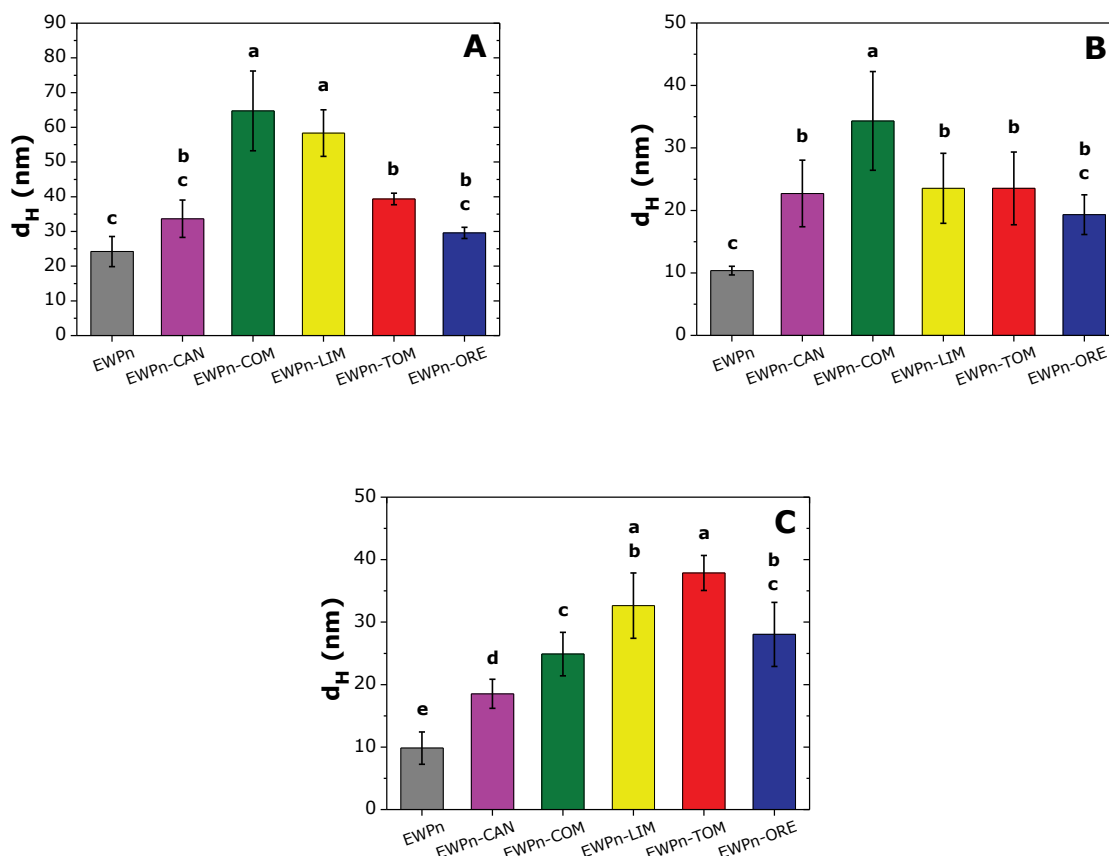
Sistema	pH	$d_H$ pico 1	Volumen	$d_H$ pico 2	Volumen	$d_H$ pico 3	Volumen
		(nm)	(%)	(nm)	(%)	(nm)	(%)
EWPn	7,0	$24 \pm 4^a$	$96 \pm 6$	-	-	-	-
	9,0	$10 \pm 1^b$	$93 \pm 11$	$161 \pm 11^a$	$10 \pm 9$	-	-
	11,4	$10 \pm 3^b$	$92 \pm 7$	$114 \pm 57^a$	$11 \pm 0$	-	-
EWPn–CAN	7,0	$34 \pm 5^a$	$91 \pm 1$	$191 \pm 9^a$	$9 \pm 1$	-	-
	9,0	$23 \pm 5^b$	$95 \pm 4$	$209 \pm 28^a$	$6 \pm 2$	-	-
	11,4	$19 \pm 2^b$	$93 \pm 4$	$103 \pm 9^b$	$5 \pm 3$	-	-
EWPn–COM	7,0	$65 \pm 12^a$	$50 \pm 10$	$393 \pm 65^a$	$44 \pm 10$	$4.965 \pm 434^a$	$6 \pm 3$
	9,0	$34 \pm 8^b$	$78 \pm 3$	$348 \pm 241^a$	$15 \pm 6$	$1.514 \pm 312^b$	$8 \pm 5$
	11,4	$25 \pm 4^b$	$82 \pm 4$	$108 \pm 19^b$	$6 \pm 1$	$616 \pm 41^c$	$14 \pm 2$
EWPn–LIM	7,0	$58 \pm 7^a$	$69 \pm 4$	$349 \pm 10^a$	$29 \pm 5$	$5.186 \pm 326^a$	$2 \pm 1$
	9,0	$24 \pm 6^b$	$91 \pm 3$	$368 \pm 41^a$	$8 \pm 2$	-	-
	11,4	$33 \pm 5^b$	$82 \pm 4$	$208 \pm 112^b$	$9 \pm 6$	$2.564 \pm 1514^b$	$5 \pm 2$
EWPn–TOM	7,0	$39 \pm 2^a$	$83 \pm 1$	$268 \pm 24^{a,b}$	$17 \pm 1$	-	-
	9,0	$24 \pm 6^b$	$94 \pm 3$	$232 \pm 33^b$	$5 \pm 2$	-	-
	11,4	$38 \pm 1^a$	$88 \pm 1$	$304 \pm 1^a$	$12 \pm 1$	-	-
EWPn–ORE	7,0	$30 \pm 2^a$	$89 \pm 1$	$214 \pm 6^a$	$7 \pm 3$	-	-
	9,0	$19 \pm 3^b$	$90 \pm 0$	$194 \pm 6^b$	$9 \pm 1$	-	-
	11,4	$28 \pm 5^a$	$96 \pm 1$	$224 \pm 11^a$	$4 \pm 1$	-	-

A partir de lo expuesto en la [Tabla 3](#) y la [Fig. 5](#), fue posible concluir que el  $d_H$  de partícula de los nanocomplejos EWPn–AE resultó dependiente tanto del AE encapsulado como del pH del medio. Del mismo modo, el  $d_H$  del control EWPn resultó dependiente del pH del medio.

En un estudio similar, [Deseta y col. \(2022\) \(168\)](#) encapsularon timol y carvacrol en EWPn obtenidas a pH 11,5. Contrariamente a lo observado en el presente trabajo, se obtuvieron curvas monomodales en la

PSDv (%) en todos los casos evaluados. Cuando timol fue encapsulado en EWPn, no se evidenció diferencia significativa entre el  $d_H$  del nanocomplejo (18 nm) y del control (23 nm). Sin embargo, la encapsulación de carvacrol provocó un aumento significativo en este parámetro, condición que promovió un tamaño de partícula de 32 nm. Es importante considerar que, aunque los nanocomplejos se han obtenido bajo condiciones similares, los ligandos evaluados en dicho estudio corresponden a compuestos que presentan estructura química simple, mientras que los AEs son mezclas complejas de compuestos con diversas características fisicoquímicas.

Por otra parte, Wang y col. (2020) (228) encapsularon curcumina en EWP y, luego de modificar el pH en un rango de 5,0 a 7,0, evaluaron el tamaño de partícula de los complejos obtenidos y del control EWP. Se pudo observar que a bajos valores de pH, la encapsulación resultó en una disminución del  $d_H$  cuando fue comparado con el control EWP, y a pH cercanos a 7,0 no hubo diferencia significativa entre ellos. Los autores sugieren que la estructura de la proteína se comprimiría cuando las moléculas de curcumina interactúan con ella, lo que reduciría el tamaño de partícula. Además, el  $d_H$  del complejo disminuyó significativamente con el aumento gradual del pH, y el mismo efecto fue evidenciado para el control EWP.



**Figura 5.** Diámetro hidrodinámico ( $d_H$ , nm) (correspondiente al pico principal en PSDv) de los sistemas EWPn y EWPn-AE evaluados a pH 7,0 (A), 9,0 (B) y 11,4 (C). Cada barra representa el promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

El pH es uno de los parámetros más influyentes en la determinación del potencial  $\zeta$ , especialmente en dispersiones acuosas. El pI corresponde al valor de pH en el que el potencial  $\zeta$  es cero. Cuando el pH se acerca a dicho valor, la estabilidad de los sistemas coloidales se pierde y estos tienden a formar diferentes asociaciones (225).

El potencial  $\zeta$  (mV) de los nanocomplejos EWPn-AE y los controles EWPn a concentración de proteína 1% m/v y pH 7,0, 9,0 y 11,4 también fue evaluado (Tabla 4). Como se puede observar, los valores de los nanocomplejos EWPn-AE y el control EWPn resultaron negativos en todo el rango de pH evaluado. Este comportamiento se ajustó a lo esperado debido a que, como se mencionó anteriormente, el pI de la proteína más abundante (OVA) es 4,5. Además, el potencial  $\zeta$  se encontró entre  $-21,1 \pm 1,4$  mV (EWPn-COM a pH 7,0) y  $-38,1 \pm 0,3$  mV (EWPn-CAN a pH 11,4), por lo cual los nanocomplejos formados serían coloidalmente estables (225).

En primer lugar, no se evidenciaron cambios significativos ( $p < 0,05$ ) en el valor del potencial  $\zeta$  luego de la encapsulación de los AEs en EWPn a pH 7,0 y 9,0, sugiriendo que el comportamiento coloidal de los

nanocomplejos estaría gobernado por la nanopartícula proteica (Tabla 4). Sin embargo, a pH 11,4 el nanocomplejo EWPn-ORE presentó un valor de potencial  $\zeta$  significativamente menor en términos absolutos ( $p < 0,05$ ) que el control EWPn. Por otra parte, los nanocomplejos EWPn-CAN, EWPn-COM y EWPn-LIM exhibieron mayor potencial  $\zeta$  comparados con los sistemas EWPn-TOM y EWPn-ORE.

En general, la modificación del pH de 7,0 a 11,4 provocó un aumento en el valor absoluto del potencial  $\zeta$ , lo que indicaría que el valor de pH más alto sería la condición de mayor estabilidad coloidal para estos sistemas (Tabla 4).

Al respecto, Deseta y col. (2022) (168) observaron valores de potencial  $\zeta$  negativos al encapsular timol y carvacrol en EWPn a pH 11,5. Los autores señalaron que la complejación de los ligandos no produjo cambios significativos en el potencial  $\zeta$  respecto al control EWPn y, de forma similar a lo reportado en el presente trabajo, los valores resultaron cercanos a -28 mV.

En otro estudio, se encapsuló ácido fólico (vitamina esencial para la síntesis de ADN, la división celular, etc.) en EWPn a pH 3 (123). Bajo esta condición, el potencial  $\zeta$  resultó positivo tanto para los complejos (20,9-28,4 mV) como para los controles EWPn (20,7-31,5 mV), y el valor se mantuvo significativamente constante luego de la encapsulación del ligando. El ácido fólico presenta un pKa de 2,3, por lo que, a pH 3 predominarían las moléculas neutras de ácido fólico en el equilibrio. Los autores sugieren que esta condición del ácido fólico sería la razón por la cual no se modificaría el potencial  $\zeta$  luego de la unión de este compuesto a EWPn cargada positivamente.

**Tabla 4.** Valores de potencial  $\zeta$  expresado en mV de los sistemas EWPn y EWPn–AE evaluados a diferentes pH (7,0, 9,0 y 11,4). Resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos de un mismo sistema y diferentes letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos de un mismo pH ( $p < 0,05$ ).

Sistema	pH	Potencial $\zeta$ (mV)
<b>EWPn</b>	<b>7,0</b>	$-28,2 \pm 0,6^{aA}$
	<b>9,0</b>	$-31,3 \pm 0,9^{aA}$
	<b>11,4</b>	$-35,4 \pm 0,3^{aB,C}$
<b>EWPn–CAN</b>	<b>7,0</b>	$-26,1 \pm 0,3^{aA}$
	<b>9,0</b>	$-30,1 \pm 0,7^{aA}$
	<b>11,4</b>	$-38,1 \pm 0,3^{aC}$
<b>EWPn–COM</b>	<b>7,0</b>	$-21,1 \pm 1,4^{aA}$
	<b>9,0</b>	$-29,0 \pm 2,8^{bA}$
	<b>11,4</b>	$-37,3 \pm 1,2^{cC}$
<b>EWPn–LIM</b>	<b>7,0</b>	$-28,5 \pm 1,3^{aA}$
	<b>9,0</b>	$-37,5 \pm 0,5^{bA}$
	<b>11,4</b>	$-37,0 \pm 0,2^{bC}$
<b>EWPn–TOM</b>	<b>7,0</b>	$-25,2 \pm 0,4^{aA}$
	<b>9,0</b>	$-30,3 \pm 0,6^{a,bA}$
	<b>11,4</b>	$-33,8 \pm 0,6^{bB}$
<b>EWPn–ORE</b>	<b>7,0</b>	$-27,1 \pm 1,9^{aA}$
	<b>9,0</b>	$-33,6 \pm 0,5^{bA}$
	<b>11,4</b>	$-29,0 \pm 1,1^{a,bA}$

#### 3.4.2.2. Espectroscopía de fluorescencia intrínseca y extrínseca

Se ha reportado previamente que el fenómeno de unión de ligandos a proteínas para dar lugar a la formación de complejos promueve modificaciones en la estructura conformacional y en la superficie de los sistemas proteicos (229). Además, las condiciones de formación de las nanopartículas proteicas (tiempo y temperatura del tratamiento térmico, pH, etc.) y de formación de los complejos (concentración, pH, etc.) también pueden definir las características estructurales y superficiales de la proteína (229).



La espectroscopía de fluorescencia es una herramienta útil para el estudio de la estructura conformacional de las proteínas, las interacciones proteína-ligando y el efecto del pH sobre estas. El comportamiento fluorescente de una proteína (fluorescencia intrínseca) se debe a la emisión de fluorescencia de los aminoácidos aromáticos triptófano (Trp), fenilalanina (Phe) y tirosina (Tyr) presentes en la misma (230). La proteína mayoritaria en EWP, la OVA, presenta tres residuos triptófano (Trp<sub>148</sub>, Trp<sub>267</sub> y Trp<sub>184</sub>), los cuales contribuyen globalmente a la intensidad de emisión de fluorescencia cuando la longitud de onda de excitación es 295 nm (21,120).

En el presente trabajo se evaluó la fluorescencia intrínseca de los nanocomplejos EWPn-AE y los controles EWPn obtenida en condiciones de concentración de proteína 0,01% m/v y pH 7,0, 9,0 y 11,4. En la [Tabla 5](#) se presentan los valores de la  $IF_{\max-\text{Trp}}$  (u.a.) y de la  $\lambda_{\max-\text{Trp}}$  (nm). Es posible observar que la variación del pH en el rango 7,0-11,4 provocó cambios significativos ( $p < 0,05$ ) en el valor de  $IF_{\max-\text{Trp}}$ , lo que indicaría modificaciones en la estructura conformacional del sistema proteico. Tanto los nanocomplejos EWPn-AE como el control EWPn exhibieron los mayores valores de  $IF_{\max-\text{Trp}}$  cuando fueron analizados a pH 9,0, con excepción del nanocomplejo EWPn-CAN que no presentó diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) cuando el pH varió de 7,0 a 9,0 y, posteriormente, la  $IF_{\max-\text{Trp}}$  disminuyó considerablemente a pH 11,4. Además, el aumento del pH provocó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en los valores de  $\lambda_{\max-\text{Trp}}$  de los nanocomplejos EWPn-AE y del control EWPn, es decir, se observó un corrimiento hacia el azul en el espectro electromagnético ([Tabla 5](#)). Este fenómeno indicaría que los cambios conformacionales ocurridos expondrían a los residuos Trp a un entorno menos polar a pH 11,4 (229).

La [Fig. 6](#) muestra la  $IF_{\max-\text{Trp}}$  (u.a.) de los nanocomplejos EWPn-AE y los controles EWPn en condiciones de concentración de proteína de 0,01% m/v, evaluada a pH 7,0, 9,0 y 11,4. En general, los valores de  $IF_{\max-\text{Trp}}$  disminuyeron en diferente medida cuando el AE fue encapsulado en EWPn. Sin embargo, los nanocomplejos EWPn-LIM y EWPn-TOM formados a pH 11,4 no presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en dichos valores con respecto al control EWPn evaluado en la misma condición de pH ([Fig. 6C](#)). Estos resultados sugieren que a pH 7,0 y 9,0 las moléculas presentes en los AEs se unirían lo suficientemente cerca de residuos Trp en EWPn de forma tal que la emisión de fluorescencia disminuya con la formación del nanocomplejo. A pH 11,4, el mismo efecto podría ocurrir con las moléculas presentes en CAN, COM y ORE. Por el contrario, las moléculas que componen LIM y TOM podrían unirse en dominios particulares de EWPn alejados de los residuos Trp a pH 11,4, de modo que los cambios conformacionales no serían detectados mediante esta técnica. Otra hipótesis propondría que LIM y TOM podrían unirse a EWPn en menor proporción, lo que no provocaría cambios sustanciales en la estructura del sistema proteico (21).

Por otro lado, la [Fig. 7](#) muestra la  $\lambda_{\max-\text{Trp}}$  (nm) de los nanocomplejos EWPn-AE y los controles EWPn en condiciones de concentración de proteína de 0,01% m/v, evaluada a pH 7,0, 9,0 y 11,4. En todo el rango de pH evaluado se observó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en la  $\lambda_{\max-\text{Trp}}$  de EWPn-CAN y

EWPn–COM con respecto al control EWPn, mientras que los nanocomplejos EWPn–TOM y EWPn–ORE no evidenciaron cambios significativos ( $p < 0,05$ ) en dicho parámetro. Por otra parte, el valor de  $\lambda_{\text{max-Trp}}$  del nanocomplejo EWPn–LIM resultó significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el control EWPn a pH 7,0, pero no se exhibieron cambios significativos ( $p < 0,05$ ) entre los valores de este parámetro para los sistemas EWPn–LIM y EWPn a pH 9,0 y 11,4. El aumento de la  $\lambda_{\text{max-Trp}}$  luego de la encapsulación de CAN, COM y LIM correspondió a un corrimiento hacia el rojo en el espectro electromagnético relacionándose con la exposición de los residuos Trp de EWPn a un entorno más polar.

La hidrofobicidad superficial de una proteína puede ser estimada utilizando la sonda fluorescente ANS, la cual se une a dominios proteicos mediante fuerzas atractivas no covalentes, principalmente a través de interacciones hidrofóbicas. Cuando el ANS se une a los sitios hidrofóbicos de la superficie de las proteínas, la intensidad de la emisión de fluorescencia (denominada fluorescencia extrínseca) incrementa (230).

En el presente trabajo se evaluó la fluorescencia extrínseca de los nanocomplejos EWPn–AE y los controles EWPn obtenida a concentración de proteína 0,01% m/v y ajustados a los valores de pH 7,0, 9,0 y 11,4. En la [Tabla 5](#) se presentan los valores de la  $IF_{\text{max-ANS}}$  (u.a.) y de la  $\lambda_{\text{max-ANS}}$  (nm). Como es posible observar, los valores de  $IF_{\text{max-ANS}}$  de los nanocomplejos EWPn–AE y del control EWPn decrecieron gradual y notablemente con la variación del pH de 7,0 a 11,4. Esto sugiere que la exposición de dominios hidrofóbicos en EWPn estaría profundamente influenciada por el pH del medio, y que la condición de mayor hidrofobicidad superficial de EWPn correspondería al menor pH evaluado.

A partir del análisis del parámetro  $\lambda_{\text{max-ANS}}$  fue posible observar que la variación de pH de 7,0 a 9,0 no provocó cambios en los valores de los nanocomplejos EWPn–AE y del control EWPn, con excepción del sistema EWPn–CAN, el cual presentó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) (corrimiento hacia el rojo en el espectro) ([Tabla 5](#)). Posteriormente, el aumento del pH de 9,0 a 11,4 provocó un considerable incremento en los valores de  $\lambda_{\text{max-ANS}}$  en todos los casos. Nuevamente, el corrimiento hacia el rojo en el espectro electromagnético indicaría que el ANS unido a EWPn se encontraría en un entorno más polar a pH 11,4.

**Tabla 5.** Valores de intensidad de fluorescencia máxima debida al Trp ( $IF_{\max-\text{Trp}}$ , u.a.), longitud de onda correspondiente a la máxima intensidad de fluorescencia debida al Trp ( $\lambda_{\max-\text{Trp}}$ , nm), intensidad de fluorescencia máxima debida a la sonda fluorescente ANS ( $IF_{\max-\text{ANS}}$ , u.a.) y longitud de onda correspondiente a la máxima intensidad de fluorescencia debida a la sonda fluorescente ANS ( $\lambda_{\max-\text{ANS}}$ , nm) de los sistemas EWPn y EWPn-AE evaluados a diferentes pH (7,0, 9,0 y 11,4). Resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos de un mismo sistema ( $p < 0,05$ ).

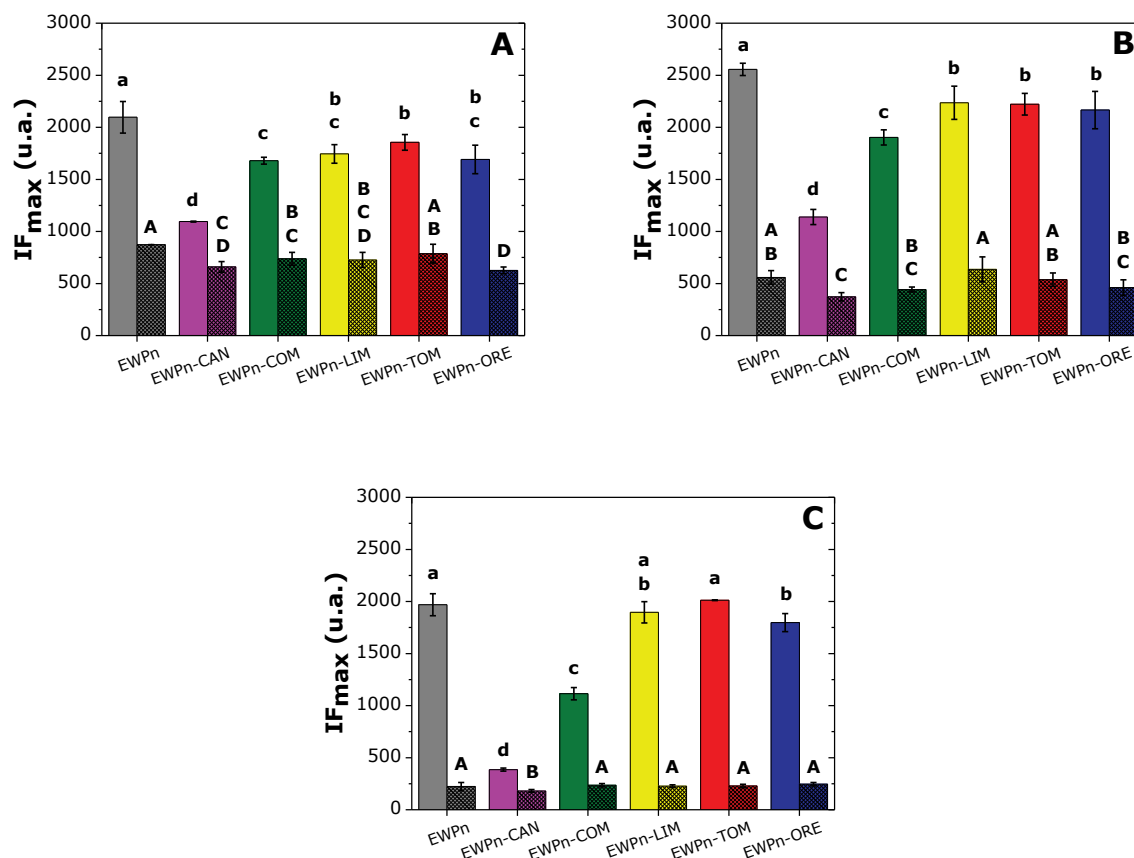
Sistema	pH	$IF_{\max-\text{Trp}}$ (u.a.)	$\lambda_{\max-\text{Trp}}$ (nm)	$IF_{\max-\text{ANS}}$ (u.a.)	$\lambda_{\max-\text{ANS}}$ (nm)
EWPn	7,0	$2.096 \pm 152^b$	$354 \pm 0^a$	$873 \pm 1^a$	$471 \pm 1^b$
	9,0	$2.556 \pm 59^a$	$352 \pm 0^b$	$559 \pm 65^b$	$471 \pm 1^b$
	11,4	$1.969 \pm 106^b$	$341 \pm 0^c$	$223 \pm 39^c$	$483 \pm 3^a$
EWPn-CAN	7,0	$1.095 \pm 4^a$	$361 \pm 0^a$	$660 \pm 51^a$	$471 \pm 1^c$
	9,0	$1.138 \pm 73^a$	$360 \pm 1^b$	$372 \pm 40^b$	$474 \pm 2^b$
	11,4	$385 \pm 15^b$	$358 \pm 1^c$	$181 \pm 12^c$	$492 \pm 1^a$
EWPn-COM	7,0	$1.679 \pm 33^b$	$359 \pm 1^a$	$738 \pm 61^a$	$471 \pm 0^b$
	9,0	$1.903 \pm 73^a$	$356 \pm 1^b$	$443 \pm 24^b$	$471 \pm 0^b$
	11,4	$1.114 \pm 59^c$	$347 \pm 1^c$	$235 \pm 15^c$	$484 \pm 1^a$
EWPn-LIM	7,0	$1.745 \pm 89^b$	$357 \pm 3^a$	$727 \pm 73^a$	$471 \pm 1^b$
	9,0	$2.236 \pm 160^a$	$352 \pm 3^b$	$637 \pm 120^a$	$470 \pm 1^b$
	11,4	$1.897 \pm 102^b$	$341 \pm 0^c$	$227 \pm 13^b$	$483 \pm 1^a$
EWPn-TOM	7,0	$1.855 \pm 75^c$	$353 \pm 1^a$	$787 \pm 90^a$	$471 \pm 1^b$
	9,0	$2.221 \pm 104^a$	$352 \pm 1^a$	$538 \pm 64^b$	$471 \pm 1^b$
	11,4	$2.012 \pm 4^b$	$341 \pm 1^b$	$228 \pm 16^c$	$478 \pm 2^a$
EWPn-ORE	7,0	$1.691 \pm 137^b$	$355 \pm 0^a$	$626 \pm 32^a$	$472 \pm 0^b$
	9,0	$2.166 \pm 180^a$	$355 \pm 1^a$	$461 \pm 75^b$	$472 \pm 1^b$
	11,4	$1.797 \pm 87^b$	$341 \pm 0^b$	$245 \pm 17^c$	$482 \pm 0^a$

La Fig. 6 muestra la  $IF_{\max-\text{ANS}}$  (u.a.) de los nanocomplejos EWPn-AE y los controles EWPn en condiciones de concentración de proteína de 0,01% m/v, evaluada a pH 7,0, 9,0 y 11,4. Como se puede observar, a pH 7,0 los valores de  $IF_{\max-\text{ANS}}$  de los nanocomplejos EWPn-AE disminuyeron con respecto al control EWPn, es decir, la encapsulación de los AEs en EWPn provocó una disminución en la emisión de

fluorescencia, excepto para el caso del sistema EWPn–TOM, que no presentó diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) respecto al control EWPn (Fig. 6A).

A pH 9,0 el valor de  $IF_{\text{max-ANS}}$  no presentó variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) luego de la encapsulación de AE en EWPn en la mayoría de los casos, con excepción del nanocomplejo EWPn–CAN, que exhibió un valor significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que el control EWPn evaluado a la misma condición de pH (Fig. 6B). El mismo comportamiento fue observado a pH 11,4, siendo el sistema EWPn–CAN el único nanocomplejo que presentó menor  $IF_{\text{max-ANS}}$  que el control EWPn (Fig. 6C).

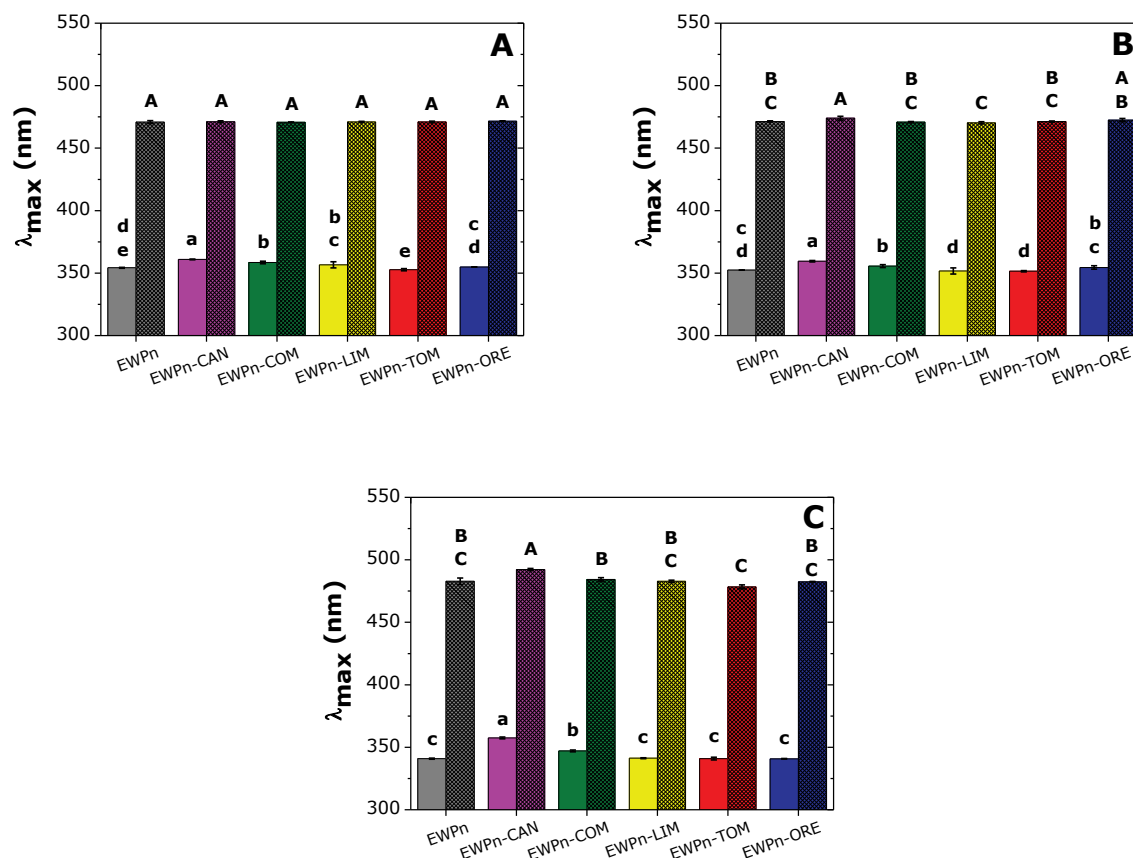
En general, se puede hipotetizar que, a pH 7,0, la unión de los compuestos presentes en los AEs ocurriría a nivel de los mismos sitios hidrofóbicos de la superficie de EWPn afines al ANS, dejando una menor cantidad de sitios disponibles para la unión de esta sonda fluorescente (231). Sin embargo, a pH 9,0 y 11,4 la unión de los compuestos presentes en los AEs sucedería en dominios particulares de EWPn (diferentes a los sitios de unión del ANS), o bien el ANS podría provocar el desplazamiento de los compuestos que componen a los AEs de la superficie de EWPn (232).



**Figura 6.** Intensidad de fluorescencia máxima ( $IF_{max}$ , u.a.) debida al Trp (liso) y debida a la sonda fluorescente ANS (rayado) de los sistemas EWPn y EWPn-AE evaluados a pH 7,0 (A), 9,0 (B) y 11,4 (C). Cada barra representa el promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos de un mismo parámetro ( $p < 0,05$ ).

Finalmente, la Fig. 7 muestra la  $\lambda_{max-ANS}$  (nm) de los nanocomplejos EWPn-AE y los controles EWPn en condiciones de concentración de proteína de 0,01% m/v, evaluada a pH 7,0, 9,0 y 11,4. Como se puede observar, a pH 7,0 la formación de los nanocomplejos EWPn-AE no provocó cambios significativos ( $p < 0,05$ ) en la  $\lambda_{max-ANS}$  con respecto al control EWPn (Fig. 7A). El mismo efecto se evidenció a pH 9,0 y 11,4, excepto para el nanocomplejo EWPn-CAN, que presentó mayor  $\lambda_{max-ANS}$  que el control EWPn evaluado bajo la misma condición de pH (Fig. 7B y 7C). En este caso, estaría ocurriendo un corrimiento hacia el rojo en el espectro electromagnético, indicando la exposición de los dominios de unión al ANS de EWPn en un entorno más polar.

El estudio de la fluorescencia intrínseca y extrínseca de los nanocomplejos EWPn-AE y los controles EWPn bajo diferentes condiciones de pH resultó una herramienta útil para deducir que la estructura conformacional de los sistemas proteicos y la hidrofobicidad superficial de EWPn resultó claramente dependiente tanto del pH del medio como de la naturaleza del AE encapsulado.



**Figura 7.** Longitud de onda correspondiente a la máxima intensidad de fluorescencia ( $\lambda_{max}$ , nm) debida al Trp (liso) y debida a la sonda fluorescente ANS (rayado) de los sistemas EWPN y EWPN-AE evaluados a pH 7,0 (A), 9,0 (B) y 11,4 (C). Cada barra representa el promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos de un mismo parámetro ( $p < 0,05$ ).

### 3.4.2.3. Eficiencia de encapsulación

Numerosos estudios han evaluado la incorporación de AEs en diferentes materiales mediante diversos métodos de encapsulación. El conocimiento de la eficiencia de encapsulación es un punto crítico en el diseño y la comparación de sistemas que vehiculizan CBs.

En el presente trabajo, se evaluó la eficiencia de encapsulación (EE, %) de los nanocomplejos EWPN-AE formados a pH 7,0, 9,0 y 11,4, y los resultados se exponen en la [Tabla 6](#). Como se puede observar, la encapsulación de CAN en EWPN a pH 7,0 y 9,0 generó nanocomplejos con los menores valores de EE ( $28 \pm 4$  y  $27 \pm 3\%$ , respectivamente). Por otro lado, el sistema EWPN-TOM obtenido a pH 11,4 presentó el mayor valor de EE ( $86 \pm 0\%$ ).

En primer lugar, el nanocomplejo EWPN-CAN no exhibió diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores de EE obtenidos a pH 7,0 y 9,0 ([Tabla 6](#)). Sin embargo, una mayor eficiencia fue obtenida cuando este nanocomplejo fue formado a pH 11,4, alcanzando un valor de EE de  $44 \pm 5\%$ . Recientemente,

diferentes microcapsulas capaces de vehiculizar CAN fueron diseñadas y obtenidas mediante secado *spray*, evidenciando el impacto de la composición del material de pared en sus características. De este modo, se alcanzó una EE de 70% con una combinación de maltodextrina y goma arábiga, y cerca de 90% de EE al utilizar una formulación óptima de aislado de proteína de suero, maltodextrina y alginato de sodio (233,234). Por su parte, Yang y col. (2021) (235) vehiculizaron CAN en nanocápsulas obtenidas mediante el método de nanoprecipitación utilizando quitosano y aislado de proteína de suero como material de pared. Los autores informaron que la EE resultó mayor a 91%.

Por otro lado, los valores de EE registrados para el nanocomplejo EWPn–COM no variaron significativamente ( $p < 0,05$ ) en todo el rango de pH evaluado, lo que sugiere que este parámetro no estaría influenciado por las características estructurales discutidas en las secciones previas, las cuales sí dependieron del pH del medio (Tabla 6). En este caso, la EE se encontró entre  $74 \pm 1$  y  $76 \pm 1\%$ . En otro estudio, Karimirad y col. (2019) (195) obtuvieron nanopartículas de quitosano cargadas con COM mediante el método de gelificación iónica, las cuales evidenciaron un valor de EE mucho menor (17,89%) que el exhibido por el nanocomplejo EWPn–COM en el presente trabajo. En contraste, Hemmatkhah y col. (2020) (236) reportaron una EE de 78,45% para microcápsulas cargadas con COM, las que fueron obtenidas mediante el método de ultrasonificación utilizando aislado de proteína de suero e inulina como materiales de pared.

Los valores de EE correspondientes al nanocomplejo EWPn–LIM resultaron claramente dependientes del pH de formación (Tabla 6). El aumento del pH de 7,0 a 11,4 provocó un gradual y significativo incremento ( $p < 0,05$ ) en dicho parámetro, alcanzando un máximo de  $79 \pm 1\%$ . Diversas combinaciones de material de pared (goma de mezquite y mucílago de chía, poli- $\epsilon$ (caprolactona), etilcelulosa, quitosano y almidón) fueron utilizadas para producir nano y microcápsulas capaces de vehiculizar LIM mediante métodos de liofilización, secado *spray* y gelificación iónica. En general, los autores informaron valores de EE mayores a 85% (237–240). Sin embargo, se debe tener en cuenta que ninguno de estos trabajos ha implementado la utilización de sistemas proteicos como *carriers*. Por su parte, Liu y col. (2023) (241) diseñaron coacervados complejos de aislado de proteína de cáñamo y goma arábiga con el objetivo de encapsular LIM. Las cápsulas obtenidas de este modo presentaron una EE de 34%.

Al igual que EWPn–CAN, el nanocomplejo EWPn–TOM presentó un valor de EE ( $86 \pm 0\%$ ) significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) cuando fue formado a pH 11,4 (Tabla 6). En otro estudio, Marques y col. (2021) (242) reemplazaron una parte de aislado de proteína de suero por una mezcla de maltodextrina y quitosano con el objetivo de generar micropartículas capaces de encapsular TOM mediante secado *spray*, alcanzando valores de EE mucho menores a los obtenidos en el presente trabajo (20–30%). En contraste, otros autores informaron una EE similar a la exhibida por el nanocomplejo EWPn–TOM (85% aproximadamente), encapsulando este AE en una mezcla de gelatina y goma arábiga mediante coacervación compleja (243).

Además, el nanocomplejo EWPn–ORE presentó el mismo comportamiento que EWPn–COM frente a la variación de pH, con valores de EE entre  $78 \pm 1$  y  $80 \pm 0\%$  (Tabla 6). Previamente, ORE fue encapsulado mediante coacervación compleja utilizando mezclas de gelatina y mucílago de chíá o goma arábica como materiales de pared. De este modo, se obtuvieron valores de EE entre 76,39 y 91,79% (244). En otro estudio, Fernandes y col. (2018) (245) emplearon el método de secado *spray* para desarrollar partículas de aislado de proteína de suero capaces de vehiculizar ORE, permitiendo la obtención de una EE de 90%.

Es importante remarcar que las principales diferencias observadas entre los valores de EE obtenidos en el presente trabajo y los reportados en la bibliografía pueden atribuirse fundamentalmente a las variaciones en la composición y naturaleza de los materiales de pared, así como a los métodos de encapsulación empleados. En este estudio, la encapsulación de los AEs se llevó a cabo exclusivamente utilizando EWPn y mediante un procedimiento de complejación a diferentes valores de pH, sin la adición de PSs u otros materiales comunes en formulaciones más complejas. En contraste, muchos de los sistemas descritos en la literatura incorporaron combinaciones de biopolímeros (como maltodextrina, goma arábica, quitosano o alginato de sodio) y métodos como la liofilización, el secado *spray* o la gelificación iónica, que impactan notablemente en la EE lograda.

Al contrastar los datos informados en la Tabla 6 con lo reportado hasta el momento en la literatura, sería posible concluir que la encapsulación de AE en nanopartículas EWPn podría considerarse una estrategia conveniente para vehiculizar estos compuestos bioactivos, particularmente si es llevada a cabo a pH 11,4. Los resultados de EE, junto con los analizados en las secciones previas, sugieren que la formación de los nanocomplejos EWPn–AE sería más favorable cuando es producida a pH 11,4. Por tal motivo, los nanocomplejos EWPn–AE y el control EWPn fueron obtenidos a pH 11,4 para efectuar todos los análisis posteriores del presente trabajo.



**Tabla 6.** Valores de eficiencia de encapsulación (EE, %) de los nanocomplejos EWPn–AE evaluados a pH 7,0, 9,0 y 11,4. Resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Nanocomplejo	pH	EE (%)
EWPn–CAN	7,0	$28 \pm 4^h$
	9,0	$27 \pm 3^h$
	11,4	$44 \pm 5^g$
EWPn–COM	7,0	$76 \pm 1^{c,d}$
	9,0	$76 \pm 1^{c,d}$
	11,4	$74 \pm 1^d$
EWPn–LIM	7,0	$58 \pm 1^f$
	9,0	$62 \pm 2^e$
	11,4	$79 \pm 1^b$
EWPn–TOM	7,0	$77 \pm 0^{b,c,d}$
	9,0	$80 \pm 0^b$
	11,4	$86 \pm 0^a$
EWPn–ORE	7,0	$78 \pm 0^{b,c}$
	9,0	$80 \pm 0^b$
	11,4	$78 \pm 1^{b,c,d}$

### 3.4.3. Actividad antioxidante de nanocomplejos EWPn–AE

Está ampliamente aceptado que los AEs pueden actuar como importantes agentes antioxidantes a través de sus componentes, tales como terpenos y aldehídos aromáticos (202,246). Algunos autores, sin embargo, han reportado que las interacciones químicas existentes entre proteínas y compuestos fenólicos (como los monoterpenos fenólicos) serían responsables de la disminución de la actividad antioxidante de los últimos (139). Por este motivo, resulta relevante evaluar la capacidad antioxidante de los AEs luego de su encapsulación en EWPn.

Por otro lado, la actividad antioxidante de un AE podría deberse a diferentes mecanismos, tales como prevención de la iniciación de la cadena de radicales libres, prevención de la descomposición de peróxidos, prevención de la abstracción continua de hidrógeno, captación o reducción de radicales libres, captación o

reducción de iones catalizadores, etc. (77). Por lo tanto, diversas técnicas analíticas y diferentes sustratos deberían ser empleados para una evaluación más detallada de la efectividad de las muestras, y de este modo cubrir la mayoría de los aspectos mencionados (247,248).

En el presente trabajo, la actividad antioxidante de los nanocomplejos EWPn–AE y del control EWPn formados a pH 11,4 fue determinada mediante el empleo de 3 técnicas *in vitro* complementarias: ensayo de actividad de captación de radical ABTS<sup>+</sup>, ensayo de actividad de poder reductor y ensayo de actividad quelante de hierro. Estos métodos son los más utilizados en la determinación de la actividad antioxidante de extractos de plantas en general (246,248).

#### 3.4.3.1. Actividad de captación de radical ABTS<sup>+</sup>

En la [Tabla 7](#) se presentan los valores de IC<sub>50</sub> de la actividad de captación de radical ABTS<sup>+</sup> (A<sub>ABTS+</sub>) correspondientes a los nanocomplejos EWPn–AE y al control EWPn obtenidos a pH 11,4, expresados como mg proteína g<sup>-1</sup>. Como puede observarse, los nanocomplejos EWPn–ORE y EWPn–TOM exhibieron mayor A<sub>ABTS+</sub> frente al resto de los nanocomplejos y al control EWPn, cuyos valores de IC<sub>50</sub> (1,2 ± 0,0 y 1,7 ± 0,2 mg proteína g<sup>-1</sup>, respectivamente) no presentaron diferencia significativa (p<0,05) entre ellos. Por su parte, [Liu y col. \(2023\) \(241\)](#) obtuvieron coacervados complejos de aislado de proteína de cáñamo y goma arábiga con el objetivo de encapsular cuatro AEs. Entre ellos, las cápsulas cargadas con ORE presentaron la mayor capacidad para captar radicales ABTS<sup>+</sup>.

En un estudio reciente, se utilizó aislado de proteína de soja para generar matrices capaces de incorporar TOM y formar *films* (249). Luego, la capacidad antioxidante de los *films* fue evaluada mediante ensayo de A<sub>ABTS+</sub> y fue posible observar que la menor actividad fue exhibida por el *film* sin TOM y que dicha actividad aumentó notablemente con el aumento de la cantidad de TOM incorporada. Los autores indicaron que TOM no formaría interacciones fuertes con la matriz proteica, lo que permitiría que las propiedades antioxidantes del AE se mantengan luego de su incorporación.

Otros trabajos también han evaluado la actividad antioxidante de TOM encapsulado en diferentes materiales no proteicos mediante el ensayo de captación de radical ABTS<sup>+</sup>. [Sampaio y col. \(2022\) \(98\)](#) informaron que la capacidad antioxidante de nanoemulsiones de aceite de girasol cargadas con TOM aumentó gradualmente con el aumento de la concentración de AE. La menor actividad fue exhibida por la nanoemulsión sin TOM, mientras que TOM libre (sin encapsular) presentó la mayor capacidad antioxidante. Por el contrario, [González Reza y col. \(2021\) \(250\)](#) determinaron que TOM encapsulado en quitosano evidenció mayor capacidad antioxidante que TOM libre. Los autores sugirieron que este efecto se produciría debido a la capacidad antioxidante propia del PS.

Como se observa en la [Tabla 7](#), no hubo diferencia significativa (p<0,05) entre la A<sub>ABTS+</sub> del nanocomplejo EWPn–CAN y el control EWPn, presentando valores de IC<sub>50</sub> de 10,2 ± 0,4 y 9,9 ± 0,3 mg

proteína  $\text{g}^{-1}$ , respectivamente. Hasta el momento, escasos trabajos han evaluado la capacidad antioxidante de CAN encapsulado. [Liang y col. \(2022\) \(107\)](#) sintetizaron nanoemulsiones de glucoproteína de suero y CAN, y reportaron que estas nanoemulsiones presentaron mayor capacidad de captación de radicales  $\text{ABTS}^+$  que CAN libre, e incluso que el ácido ascórbico utilizado como control positivo. Por otro lado, [Bhatia y col. \(2023\) \(251\)](#) obtuvieron *films* de alginato de sodio y goma arábiga cargados con diferentes concentraciones de CAN. Los autores observaron un aumento del porcentaje de inhibición del radical  $\text{ABTS}^+$  con el aumento de la concentración de CAN. A su vez, observaron que el *film* control (sin CAN) evidenció la menor inhibición del radical  $\text{ABTS}^+$ .

Por otra parte, el nanocomplejo EWPn–LIM exhibió un valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $16,4 \pm 0,8$  mg proteína  $\text{g}^{-1}$ , mientras que EWPn–COM presentó la menor  $\text{A}_{\text{ABTS}^+}$  ( $18,4 \pm 1,0$  mg proteína  $\text{g}^{-1}$ ) entre todos los sistemas evaluados ([Tabla 7](#)). Ambos nanocomplejos evidenciaron una  $\text{A}_{\text{ABTS}^+}$  significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que el control EWPn. Contrariamente a lo ocurrido con CAN, TOM y ORE, la encapsulación de COM y LIM afectaría la capacidad de captación de radicales  $\text{ABTS}^+$  de EWPn. Esto sugiere que, en los nanocomplejos EWPn–COM y EWPn–LIM, los componentes de estos AEs podrían estar interactuando con grupos funcionales clave de la proteína (como grupos tiol o aromáticos), reduciendo su disponibilidad para actuar como captadores de radicales  $\text{ABTS}^+$ . [Xue y col. \(2019\) \(252\)](#) obtuvieron *films* compuestos por aislado de proteína de soja y goma arábiga, los cuales fueron utilizados para encapsular diferentes AEs. En este caso, los autores indicaron que el *film* que contuvo LIM presentó la mayor  $\text{A}_{\text{ABTS}^+}$ , mientras que el *film* sin AE no exhibió capacidad antioxidante. Con respecto a COM, no se ha reportado hasta el momento la capacidad de captación de radicales  $\text{ABTS}^+$  cuando este AE se encuentra encapsulado en matrices poliméricas.

Está ampliamente aceptado que la  $\text{A}_{\text{ABTS}^+}$  de AEs, y extractos de plantas en general, se correlaciona con el TPC de dichas muestras ([77,177,253](#)). De este modo, un AE que presente elevado TPC exhibiría potencial antioxidante a través del ensayo de captación de radicales  $\text{ABTS}^+$ . Además, se ha demostrado que timol y carvacrol exhiben, generalmente, mayor capacidad de captar radicales libres que otros compuestos volátiles comúnmente presentes en AEs ([218,254](#)). Debido a su estructura química correspondiente a monoterpenos oxigenados, ambos isómeros serían capaces de donar átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilo a radicales libres y convertirlos en productos no radicales más estables ([255](#)). Por lo tanto, los resultados discutidos se ajustan con lo observado en la [Sección 3.4.1.1](#) y en la [Sección 3.4.1.2](#), donde TOM y ORE evidenciaron elevado TPC ([Fig. 4](#)) y alto CR de timol y carvacrol ([Tabla 2](#)), respectivamente. Fue posible concluir que la encapsulación de TOM y ORE en EWPn no afectaría la capacidad antioxidante esperada por parte de estos AEs.

**Tabla 7.** Valores de actividad antioxidante de los sistemas EWPn y EWPn–AE evaluada mediante ensayos de actividad de captación de radical ABTS<sup>+</sup> ( $A_{ABTS^+}$ ), actividad de poder reductor ( $A_{PR}$ ) y actividad quelante de hierro (ICA). Resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos de un mismo parámetro ( $p < 0,05$ ). ND: no determinado.

Sistema	$A_{ABTS^+}$	$A_{PR}$	ICA
	IC <sub>50</sub> mg proteína g <sup>-1</sup>	Pendiente g sistema g <sup>-1</sup> proteína	IC <sub>50</sub> mg proteína g <sup>-1</sup>
<b>EWPn</b>	9,9 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>	17,2 $\pm$ 1,2 <sup>d</sup>	0,19 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>
<b>EWPn–CAN</b>	10,2 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	19,7 $\pm$ 1,3 <sup>c</sup>	0,50 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>
<b>EWPn–COM</b>	18,4 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	11,9 $\pm$ 0,9 <sup>e</sup>	ND
<b>EWPn–LIM</b>	16,4 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	17,1 $\pm$ 0,8 <sup>d</sup>	0,71 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
<b>EWPn–TOM</b>	1,7 $\pm$ 0,2 <sup>d</sup>	28,2 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	1,47 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
<b>EWPn–ORE</b>	1,2 $\pm$ 0,0 <sup>d</sup>	36,2 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	0,71 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>

### 3.4.3.2. Actividad de poder reductor

En la [Tabla 7](#) se presentan los valores de la pendiente correspondiente a la actividad de poder reductor ( $A_{PR}$ ) para los nanocomplejos EWPn–AE y el control EWPn obtenidos a pH 11,4, expresados como g sistema g<sup>-1</sup> proteína. Como se puede observar, la mayor  $A_{PR}$  fue exhibida por el nanocomplejo EWPn–ORE, registrándose una pendiente de 36,2  $\pm$  1,4 g sistema g<sup>-1</sup> proteína. Por su parte, [Sampaio Paulo y col. \(2021\) \(256\)](#) encapsularon ORE en goma arábica y maltodextrina y, posteriormente, obtuvieron *films* conteniendo microcápsulas de ORE y ORE libre. Mediante el método de capacidad para reducir el hierro férrico (FRAP, por sus siglas en inglés *Ferric Reducing Antioxidant Power*), los autores evidenciaron elevada capacidad de reducir Fe<sup>+3</sup> por parte de los *films* con ORE (libre o encapsulado) frente al *film* control (sin ORE).

El nanocomplejo EWPn–TOM mostró elevada  $A_{PR}$ , aunque significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que la registrada para el nanocomplejo EWPn–ORE, exhibiendo una pendiente de 28,2  $\pm$  0,9 g sistema g<sup>-1</sup> proteína, respectivamente ([Tabla 7](#)). [Jayari y col. \(2022\) \(257\)](#) encapsularon AE de tomillo (*Thymus capitatus*) en diversas nanoemulsiones y nanopartículas biopoliméricas. Se informó que la encapsulación de dicho AE mejoró notablemente la actividad antioxidante (determinada mediante el ensayo FRAP) con respecto a la actividad del AE libre, excepto cuando el material utilizado para la obtención de la nanopartícula fue goma arábica.

Seguidamente, el nanocomplejo EWPn–CAN presentó  $A_{PR}$  intermedia en comparación con el resto de los nanocomplejos evaluados, con una pendiente de 19,7  $\pm$  1,3 g sistema g<sup>-1</sup> proteína ([Tabla 7](#)). En un

estudio reciente, se encapsuló CAN en 5 tipos de  $\beta$ -ciclodextrinas y se reportó que el poder reductor evaluado mediante el método FRAP disminuyó en diferente medida luego de dicha encapsulación con respecto al AE libre (258). Además, se informó que las  $\beta$ -ciclodextrinas no presentaron actividad al ser evaluadas mediante el mismo ensayo.

Según los resultados informados en la Tabla 7, no hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre el valor de la pendiente del nanocomplejo EWPn–LIM ( $17,1 \pm 0,8$  g sistema  $g^{-1}$  proteína) y el valor de la pendiente del control EWPn ( $17,2 \pm 1,2$  g sistema  $g^{-1}$  proteína). Hasta el momento, no se ha estudiado la capacidad de reducir  $Fe^{+3}$  de LIM encapsulado en biopolímeros. Sin embargo, Tongnuanchan y col. (2012) (259) obtuvieron *films* de gelatina a los cuales les incorporaron cuatro AEs del género *Citrus*. Entre ellos, los *films* con LIM presentaron mayor poder reductor (evaluado mediante el ensayo FRAP), mientras que los controles (*films* sin AE) evidenciaron muy baja actividad.

Finalmente, el nanocomplejo EWPn–COM exhibió la menor  $A_{PR}$  entre todos los sistemas evaluados, presentando una pendiente de  $11,9 \pm 0,9$  g sistema  $g^{-1}$  proteína (Tabla 7). Según este resultado, la encapsulación de COM afectaría la capacidad de reducir  $Fe^{+3}$  de EWPn. Al igual que LIM, no se ha estudiado la capacidad de reducir  $Fe^{+3}$  de COM encapsulado en biopolímeros. Por otro lado, se ha evaluado el poder reductor de COM extraído mediante diferentes técnicas, presentando actividades similares a los compuestos de referencia vitamina C y butilhidroxitolueno (260).

Estudios previos han demostrado que los monoterpenos oxigenados, tales como timol y carvacrol, podrían actuar como agentes reductores debido a sus propiedades redox. Nuevamente, los resultados discutidos son consistentes con lo observado en la Tabla 2, donde TOM y ORE evidenciaron elevados CR de timol y carvacrol, respectivamente (213). Fue posible concluir que la encapsulación de TOM y ORE en EWPn no afectaría la capacidad reductora esperada por parte de estos AEs. Sin embargo, a diferencia del ensayo de  $A_{ABTS^{+}}$ , la  $A_{PR}$  resultó significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) para el caso del nanocomplejo EWPn–ORE.

### 3.4.3.3. Actividad quelante de hierro

En la Tabla 7 se presentan los valores de  $IC_{50}$  de la actividad quelante de hierro (ICA) correspondientes a los nanocomplejos EWPn–AE y al control EWPn obtenidos a pH 11,4, expresados como mg proteína  $g^{-1}$ . Como se puede observar, el control EWPn exhibió la mayor ICA ( $0,19 \pm 0,01$  mg proteína  $g^{-1}$ ) entre todos los sistemas evaluados, y esta capacidad fue afectada en diferente medida dependiendo del AE encapsulado en EWPn. Tanto péptidos como proteínas son capaces de actuar como quelantes de metales cuando ciertos residuos de aminoácidos tales como histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, serina fosforilada y treonina se encuentran disponibles en el medio o expuestos en la superficie del biopolímero (173,261).

Luego, el nanocomplejo EWPn–CAN presentó un valor de  $IC_{50}$  de  $0,50 \pm 0,02$  mg proteína  $g^{-1}$ , siendo el nanocomplejo con mayor ICA entre los evaluados en el presente trabajo (Tabla 7). Hasta el momento, no se ha estudiado la capacidad quelante de  $Fe^{+2}$  de CAN encapsulado en biopolímeros. Sin embargo, dicha propiedad ha sido evaluada para CAN libre y comparada frente a otros AEs (262). La capacidad quelante de CAN libre aumentó linealmente con la concentración (en el rango 2-12 mg  $mL^{-1}$ ), alcanzando una capacidad quelante mayor al 60%.

Según lo observado en la Tabla 7, no hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los valores de  $IC_{50}$  de los nanocomplejos EWPn–LIM ( $0,71 \pm 0,02$  mg proteína  $g^{-1}$ ) y EWPn–ORE ( $0,71 \pm 0,05$  mg proteína  $g^{-1}$ ). Himed y col. (2019) (150) encapsularon LIM en dióxido de silicio amorfo y observaron que dicha encapsulación no modificó la capacidad quelante de  $Fe^{+2}$  de LIM libre. Sin embargo, en ambos casos esta propiedad resultó menor frente al compuesto de referencia utilizado (EDTA). Por otro lado, Kulawik y col. (2023) (263) obtuvieron emulsiones de quitosano, furcellaran y péptidos conteniendo ORE. Los autores informaron que la capacidad quelante de  $Fe^{+2}$  resultó muy baja en todos los casos.

El nanocomplejo EWPn–TOM presentó un valor de  $IC_{50}$  de  $1,47 \pm 0,10$  mg proteína  $g^{-1}$ , siendo considerablemente mayor al valor del resto de los nanocomplejos (Tabla 7). Con respecto a la capacidad quelante de  $Fe^{+2}$  de TOM, no se ha evaluado dicha propiedad para este AE encapsulado en biopolímeros. Por otra parte, en su forma libre TOM exhibió un valor de  $IC_{50}$  de 13,29 mg  $mL^{-1}$  cuando la ICA fue determinada (248).

Finalmente, el nanocomplejo EWPn–COM no evidenció ICA en todo el rango de concentración evaluado (Tabla 7). Al igual que para el caso de TOM, la capacidad quelante de  $Fe^{+2}$  de COM no ha sido evaluada hasta el momento, ya sea en su forma libre o encapsulado en biopolímeros. No obstante, Bettaieb Rebey y col. (2012) (264) reportaron la capacidad quelante de  $Fe^{+2}$  de distintos extractos orgánicos de semillas de comino (*Cuminum cyminum*), con valores de  $IC_{50}$  entre 22,71 y 32,75 mg  $mL^{-1}$ .

A partir de lo discutido, fue posible concluir que la encapsulación de AE en EWPn involucraría, en menor o mayor grado, grupos funcionales (presentes en los componentes del AE) y/o residuos de aminoácidos (presentes en EWPn) relevantes para la quelación de  $Fe^{+2}$ .

Numerosos estudios han demostrado la actividad antioxidante de AEs en forma libre (sin encapsular) a través de diferentes ensayos *in vitro*, entre ellos, los realizados en el presente trabajo (72,190,197,201). Sin embargo, existen escasos artículos disponibles que reporten la capacidad de captación de radical  $ABTS^+$ , la capacidad reductora y la capacidad quelante de  $Fe^{+2}$  de AEs encapsulados. Más aún, aquellos estudios que han analizado las propiedades antioxidantes de CAN, COM, LIM, TOM y ORE encapsulados, han empleado biopolímeros no proteicos o coacervados complejos como material de pared, tal como se expuso previamente. Por tal motivo, la encapsulación de AEs en EWPn se propone como una técnica simple, económica y novedosa capaz de preservar y potenciar la actividad antioxidante de los compuestos volátiles, fundamentalmente de TOM y ORE.

### 3.4.4. Actividad antidiabética de nanocomplejos EWPn-AE

#### 3.4.4.1. Actividad inhibitoria de $\alpha$ -amilasa

La enzima  $\alpha$ -amilasa cataliza la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -glucosídicos en el almidón y el glucógeno, liberando glucosa a partir de estas macromoléculas. Por lo tanto, la inhibición de esta enzima se considera una importante estrategia para la prevención y el tratamiento de desórdenes metabólicos y enfermedades relacionadas con la DM2 (2).

En la [Tabla 8](#) se presentan los valores de  $IC_{50}$  de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -amilasa ( $A_{ami}$ ) correspondientes a los nanocomplejos EWPn-AE y al control EWPn obtenidos a pH 11,4, expresados como  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Además, el compuesto de referencia acarbosa fue analizado del mismo modo.

En primer lugar, el control EWPn no evidenció  $A_{ami}$  en el rango de concentraciones evaluado (datos no mostrados). Según lo observado en la [Tabla 8](#), la mayor  $A_{ami}$  fue exhibida por los nanocomplejos EWPn-TOM y EWPn-ORE. Así, estos nanocomplejos presentaron los menores valores de  $IC_{50}$  ( $35,9 \pm 0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$  para EWPn-TOM y  $36,6 \pm 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  para EWPn-ORE) y no hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre ellos. Sin embargo, ambos valores de  $IC_{50}$  resultaron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) al valor obtenido para el compuesto de referencia acarbosa ( $1,25 \pm 0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Algunos autores han informado la capacidad de inhibir  $\alpha$ -amilasa de TOM y ORE libres (AEs no encapsulados). Entre ellos, [Laftouhi y col. \(2024\) \(80\)](#) analizaron diferentes muestras de TOM y reportaron valores de  $IC_{50}$  entre 37,67 y 57,88  $\text{mg mL}^{-1}$ , las cuales resultaron notablemente menos efectivas para inhibir la enzima que el compuesto de referencia acarbosa (0,4  $\text{mg mL}^{-1}$ , aproximadamente). Por otro lado, [Radünz y col. \(2021\) \(72\)](#) informaron que TOM y ORE fueron capaces de inhibir el 81,3 y 81,4% de la actividad de  $\alpha$ -amilasa, respectivamente, presentando mayor efectividad que el compuesto de referencia acarbosa (73,4%). Sin embargo, la  $A_{ami}$  de TOM y ORE encapsulados en biopolímeros ha sido escasamente estudiada hasta el momento. En este sentido, [Siahbalaei y col. \(2020\) \(160\)](#) encapsularon AE de *Thymus kotschyanus* en partículas de gelatina y pectina y, posteriormente, evaluaron su capacidad inhibitoria de  $\alpha$ -amilasa. El AE encapsulado de dicho modo presentó mayor  $A_{ami}$  que la partícula de gelatina y pectina sin AE incorporado, pero menor  $A_{ami}$  que el compuesto de referencia acarbosa. Es importante mencionar que el AE analizado por estos autores corresponde a una especie diferente a la utilizada en el presente trabajo. Particularmente, el compuesto mayoritario del AE de *Thymus kotschyanus* resultó carvacrol (CR de 43,39%), y timol representó un bajo CR (1,18%). Con respecto a ORE, hasta el momento no se ha estudiado la  $A_{ami}$  en su forma encapsulada, como tampoco la de carvacrol encapsulado.

Por otro lado, el nanocomplejo EWPn-LIM presentó un valor de  $IC_{50}$  de  $205,8 \pm 2,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , implicando una  $A_{ami}$  significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que la registrada para los nanocomplejos EWPn-TOM y EWPn-ORE ([Tabla 8](#)). Escasos estudios han reportado la capacidad de inhibir  $\alpha$ -amilasa de LIM libre (AE no encapsulado) y, hasta el momento, no se ha evaluado este efecto para LIM o limoneno en sus formas encapsuladas. Al evaluar la  $A_{ami}$  de LIM libre, [Obob y col. \(2017\) \(71\)](#) indicaron un valor de

IC<sub>50</sub> de 8,16 µg mL<sup>-1</sup>, resultando menor que el correspondiente a AE de *Citrus sinensis*, pero mayor al valor presentado por el compuesto de referencia acarbosa. Además, [El Aboubi y col. \(2023\) \(201\)](#) analizaron la A<sub>ami</sub> de diferentes muestras de LIM libre. Los autores reportaron que el menor valor de IC<sub>50</sub> resultó 1.689,06 µg mL<sup>-1</sup>, mientras que la muestra menos efectiva para la inhibición de α-amilasa presentó un valor mayor a 4.000 µg mL<sup>-1</sup>. El compuesto de referencia acarbosa evidenció el menor valor de IC<sub>50</sub> (619,11 µg mL<sup>-1</sup>).

Por otro lado, el nanocomplejo EWPn–COM presentó un valor de IC<sub>50</sub> de 219,9 ± 1,2 µg mL<sup>-1</sup> al evaluar la A<sub>ami</sub> ([Tabla 8](#)). Al respecto, es preciso remarcar que existe escasa información relacionada a la capacidad inhibitoria de α-amilasa de COM, tanto en su forma libre como encapsulada. [Tahir y col. \(2016\) \(265\)](#) analizaron el potencial antidiabético de COM y AE de *Syzygium aromaticum* (y de emulsiones conteniendo estos AEs), mediante la determinación de la A<sub>ami</sub>. Los autores reportaron que la A<sub>ami</sub> de AE de *Syzygium aromaticum* (IC<sub>50</sub> de 74,53 µg mL<sup>-1</sup>) resultó significativamente mayor (p<0,05) que la de COM (IC<sub>50</sub> de 80,01 µg mL<sup>-1</sup>), y que ambos AEs presentaron menor capacidad para inhibir α-amilasa que el compuesto de referencia acarbosa (IC<sub>50</sub> de 14,79 µg mL<sup>-1</sup>). Además, diferentes emulsiones compuestas por Tween 80, etanol, agua y COM fueron capaces de inhibir α-amilasa, exhibiendo entre 14,32 y 83,09% de inhibición de la enzima.

Finalmente, el nanocomplejo EWPn–CAN evidenció la menor A<sub>ami</sub> entre todos los nanocomplejos evaluados (IC<sub>50</sub> de 273,7 ± 10,0 µg mL<sup>-1</sup>). Algunos estudios han reportado el potencial antidiabético (tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*) de AEs de diferentes especies del género *Cinnamomum*. [Sihoglu Tepe y Ozaslan \(2020\) \(190\)](#) evaluaron la capacidad de inhibir α-amilasa de AE de *Cinnamomum zeylanicum*. Los autores informaron un valor de 15,25% de inhibición de la enzima para AE de *Cinnamomum zeylanicum* y un porcentaje de inhibición significativamente superior (p<0,05) para acarbosa (66,66%). Cabe mencionar que, aunque el AE analizado fue extraído a partir de una especie diferente a la empleada en el presente trabajo, se identificó a *trans*-cinamaldehído como su componente principal (CR de 81,39%). Hasta el momento, no se ha encapsulado CAN con el objetivo de evaluar su capacidad antidiabética mediante ensayos *in vitro*. [Nawaz y col. \(2023\) \(266\)](#) compararon el porcentaje de inhibición de α-amilasa de un extracto etanólico de *Cinnamomum zeylanicum* y una nanosuspensión de dicho extracto en alcohol polivinílico, los cuales representaron el 39,3 y 6,3%, respectivamente. Sin embargo, la composición química del extracto etanólico resultó drásticamente diferente a las discutidas anteriormente para un AE proveniente de una especie del género *Cinnamomum*, por lo que debería evitarse la comparación directa entre ambas muestras.

Es importante señalar que todos los nanocomplejos EWPn–AE evaluados evidenciaron menor A<sub>ami</sub> que el compuesto de referencia acarbosa. Sin embargo, debido a los efectos adversos que este inhibidor sintético generalmente presenta sobre el organismo, el empleo de AEs protegidos mediante la encapsulación en biopolímeros debería continuar siendo explorado como estrategia alternativa frente a las drogas convencionales disponibles comercialmente ([2,267](#)).



**Tabla 8.** Valores de actividad antidiabética evaluada mediante ensayos de actividad inhibitoria de  $\alpha$ -amilasa ( $A_{ami}$ ), actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa ( $A_{glu}$ ) y actividad inhibitoria de lipasa pancreática ( $A_{lip}$ ), y actividad antiinflamatoria evaluada mediante ensayo de actividad inhibitoria de lipooxigenasa ( $A_{lox}$ ) de los nanocomplejos EWPn–AE obtenidos a pH 11,4, expresadas como  $IC_{50}$  ( $\mu g mL^{-1}$ ). Resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos de un mismo parámetro ( $p < 0,05$ ). NI: no inhibe. (\*):  $IC_{25}$ , concentración de AE ( $\mu g mL^{-1}$ ) necesaria para inhibir el 25% de la actividad enzimática.

Nanocomplejo	$A_{ami}$	$A_{glu}$	$A_{lip}$	$A_{lox}$
	$IC_{50}$ $\mu g mL^{-1}$	$IC_{50}$ $\mu g mL^{-1}$	$IC_{50}$ $\mu g mL^{-1}$	$IC_{50}$ $\mu g mL^{-1}$
<b>EWPn–CAN</b>	$273,7 \pm 10,0^a$	$118,6 \pm 2,4^a$	$68,8 \pm 1,8^a$	$7,9 \pm 0,1^b$
<b>EWPn–COM</b>	$219,9 \pm 1,2^b$	$82,8 \pm 2,4^c$	$62,0 \pm 0,2^b$	NI
<b>EWPn–LIM</b>	$205,8 \pm 2,2^c$	$109,8 \pm 7,6^b$	$55,1 \pm 1,8^c$	$20,2 \pm 0,7^*$
<b>EWPn–TOM</b>	$35,9 \pm 0,8^d$	$7,2 \pm 0,1^e$	$15,2 \pm 0,1^d$	$0,2 \pm 0,0^c$
<b>EWPn–ORE</b>	$36,6 \pm 0,5^d$	$7,7 \pm 0,1^e$	$13,0 \pm 0,3^e$	$0,1 \pm 0,0^c$
<b>Acarbosa</b>	$1,3 \pm 0,1^e$	$25,0 \pm 1,0^d$	-	-
<b>Orlistat</b>	-	-	$0,1 \pm 0,0^f$	-
<b>Naproxeno</b>	-	-	-	$14,0 \pm 0,7^a$

#### 3.4.4.2. Actividad inhibitoria de $\alpha$ -glucosidasa

La enzima  $\alpha$ -glucosidasa cataliza el paso final en el proceso digestivo de los carbohidratos hidrolizando enlaces glucosídicos  $\alpha(1-4)$ . De este modo, cumple un rol fundamental controlando la cantidad de glucosa, liberada de oligosacáridos y glicoconjugados, en el intestino. Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa son capaces de retardar la absorción de carbohidratos de la dieta y suprimir la hiperglucemia posprandial, representando una herramienta útil para el control y/o tratamiento de DM2 (268).

En la [Tabla 8](#) se presentan los valores de  $IC_{50}$  de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa ( $A_{glu}$ ) correspondientes a los nanocomplejos EWPn–AE obtenidos a pH 11,4 y al compuesto de referencia acarbosa, expresados como  $\mu g mL^{-1}$ .

En primer lugar, el control EWPn no evidenció  $A_{glu}$  en el rango de concentraciones evaluado (dato no mostrado). De acuerdo con lo expuesto en la [Tabla 8](#), la mayor  $A_{glu}$  fue exhibida por los nanocomplejos EWPn–TOM y EWPn–ORE, siendo esto consistente con las determinaciones de  $A_{ami}$ . Sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió al evaluar el efecto inhibitorio de  $\alpha$ -amilasa, los valores de  $IC_{50}$  de estos

nanocomplejos ( $7,2 \pm 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  para EWPn–TOM y  $7,7 \pm 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  para EWPn–ORE) resultaron significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que el valor de  $\text{IC}_{50}$  del compuesto de referencia acarbosa ( $25,00 \pm 1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). La capacidad de inhibir  $\alpha$ -glucosidasa de TOM y ORE libres (AEs no encapsulados) se ha reportado en algunos trabajos científicos. En particular, [Laftouhi y col. \(2024\) \(80\)](#) analizaron la  $A_{\text{glu}}$  de diferentes muestras de TOM y reportaron valores de  $\text{IC}_{50}$  entre  $4,66$  y  $48,97 \text{ mg mL}^{-1}$ , resultando en una menor efectividad para inhibir la enzima que el compuesto de referencia acarbosa ( $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ , aproximadamente). Además, [Radünz y col. \(2021\) \(72\)](#) informaron que TOM y ORE fueron capaces de inhibir el 98,9 y 50,5% de la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa, respectivamente, presentando mayor efectividad que el compuesto de referencia acarbosa (34,5%). En este caso, el componente mayoritario de TOM resultó timol (CR de 54,5%), pero no se informó la presencia de carvacrol en ORE. Por otro lado, AEs de 5 especies de tomillo con CR de timol entre 13,8 y 48,3% fueron analizados según su capacidad de inhibir  $\alpha$ -glucosidasa, presentando porcentajes de inhibición entre 79,4 y 89,5% bajo la condición de mayor concentración evaluada ([269](#)). Sin embargo, la  $A_{\text{glu}}$  de AEs del género *Thymus* encapsulados en biopolímeros ha sido escasamente estudiada hasta el momento. Respecto a dicha condición, [Siahbalaei y col. \(2020\) \(160\)](#) encapsularon AE de *Thymus kotschyanus* en partículas de gelatina y pectina y, posteriormente, evaluaron su capacidad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa. El AE encapsulado de dicho modo presentó mayor  $A_{\text{glu}}$  ( $238 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) que la partícula de gelatina y pectina sin AE incorporado ( $512 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), pero menor  $A_{\text{glu}}$  que el compuesto de referencia acarbosa ( $139 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Como se resaltó previamente, el AE analizado por estos autores corresponde a una especie diferente a la utilizada en el presente trabajo. Particularmente, el compuesto mayoritario del AE de *Thymus kotschyanus* resultó carvacrol (CR de 43,39%), y timol representó un bajo CR (1,18%). Hasta el presente y del mismo modo que en la evaluación de la  $A_{\text{ami}}$ , no se ha estudiado la  $A_{\text{glu}}$  de ORE en su forma encapsulada (como tampoco la  $A_{\text{glu}}$  de extracto de orégano o carvacrol encapsulado).

Por otro lado, el nanocomplejo EWPn–COM presentó un valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $82,8 \pm 2,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , resultando significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el valor de los nanocomplejos EWPn–TOM y EWPn–ORE y el compuesto de referencia acarbosa ([Tabla 8](#)). Hasta el momento, no se ha reportado la capacidad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa de COM libre o encapsulado en biopolímeros. Sin embargo, [Ghalib y Mehrotra \(2022\) \(270\)](#) obtuvieron un extracto de *Cuminum cyminum* utilizando una solución de acetona y evaluaron la  $A_{\text{glu}}$  del extracto puro, del extracto encapsulado en nanopartículas de óxido de zinc y del compuesto de referencia acarbosa, obteniendo valores de  $\text{IC}_{50}$  de 122,83, 90,97 y  $1.720,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

Como se expone en la [Tabla 8](#), el nanocomplejo EWPn–LIM exhibió un valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $109,8 \pm 7,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  al determinar la  $A_{\text{glu}}$ . Escasos autores han reportado la capacidad de inhibir  $\alpha$ -glucosidasa de LIM libre (AE no encapsulado) y, hasta el momento, no se ha evaluado este efecto para LIM, extracto de *Citrus limon* o limoneno en sus formas encapsuladas. [Oboh y col. \(2017\) \(71\)](#) evaluaron la  $A_{\text{glu}}$  de LIM libre y, tal como se indicó para la  $A_{\text{ami}}$ , el valor de  $\text{IC}_{50}$  ( $7,56 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) resultó menor que el valor correspondiente a

AE de *Citrus sinensis* (también determinado por estos autores), pero significativamente igual ( $p < 0,05$ ) al valor presentado por el compuesto de referencia acarbosa. Por su parte, [El Aboubi y col. \(2023\) \(201\)](#) analizaron la  $A_{glu}$  de diferentes muestras de LIM libre y reportaron valores de  $IC_{50}$  entre 1.021,58 y 2.467,62  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . El compuesto de referencia acarbosa evidenció el menor valor de  $IC_{50}$  (374,98  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Finalmente, el nanocomplejo EWPn–CAN evidenció la menor  $A_{glu}$  entre los nanocomplejos evaluados ( $IC_{50}$  de  $118,6 \pm 2,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ([Tabla 8](#)). Existen algunos trabajos de investigación que reportan la capacidad de AEs de diferentes especies del género *Cinnamomum* de inhibir la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. En un estudio reciente, se determinó la  $A_{glu}$  de AE de *Cinnamomum zeylanicum*, presentando un valor de  $IC_{50}$  de 90  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ([271](#)). Este resultado fue comparado con el compuesto de referencia acarbosa ( $IC_{50}$  de 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y con un extracto etanólico de la misma especie ( $IC_{50}$  de 180  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A partir del análisis de la composición química del AE de *Cinnamomum zeylanicum*, se reportó que el componente principal fue *trans*-cinamaldehído (CR de 95,89%). Por otro lado, [Kuttithodi y col. \(2023\) \(272\)](#) reportaron un valor de  $IC_{50}$  de 47,07  $\mu\text{g mL}^{-1}$  al evaluar la  $A_{glu}$  de AE de *Cinnamomum malabattrum*. En este caso, el componente principal del AE resultó linalool, mientras que *trans*-cinamaldehído presentó un CR de 12,01%.

La capacidad de inhibir la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de CAN encapsulado en biopolímeros no se ha evaluado hasta el momento. Sin embargo, [Purbowatingrum y col. \(2018\) \(273\)](#) encapsularon *trans*-cinamaldehído en nanopartículas de quitosano y, posteriormente, analizaron la  $A_{glu}$ . De este modo, obtuvieron un valor de  $IC_{50}$  de 134,13 ppm. Además, [Wanniarachchi y col. \(2023\) \(274\)](#) evaluaron la  $A_{glu}$  de un extracto acuoso de *Cinnamomum zeylanicum* y de micropartículas de albúmina sérica bovina cargadas con dicho extracto. Los autores hallaron valores de  $IC_{50}$  entre 112,40 y 137,75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para las micropartículas, mientras que el extracto acuoso puro exhibió un valor de  $IC_{50}$  de 141,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Interesantemente, el compuesto de referencia acarbosa presentó  $A_{glu}$  significativamente menor ( $IC_{50}$  de 224,45  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Cabe destacar que, entre todos los nanocomplejos evaluados, EWPn–TOM y EWPn–ORE resultaron los más efectivos para inhibir tanto  $\alpha$ -amilasa como  $\alpha$ -glucosidasa ([Tabla 8](#)). Adicionalmente, los nanocomplejos EWPn–TOM y EWPn–ORE fueron aún más efectivos que el compuesto de referencia acarbosa al estudiar la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. Por su parte, el nanocomplejo EWPn–CAN presentó la menor  $A_{ami}$  y  $A_{glu}$  entre todos los nanocomplejos evaluados.

#### 3.4.4.3. Actividad inhibitoria de lipasa pancreática

La lipasa pancreática cataliza la escisión de enlaces éster presentes en triglicéridos para dar lugar a monoglicéridos y ácidos grasos libres, moléculas que pueden ser absorbidas y almacenadas en el tejido adiposo. De este modo, la lipasa pancreática representa una enzima clave para la digestión de triglicéridos ingeridos en la dieta ([182](#)).

En la [Tabla 8](#) se presentan los valores de  $IC_{50}$  de la actividad inhibitoria de lipasa pancreática ( $A_{lip}$ ) correspondientes a los nanocomplejos EWPn-AE obtenidos a pH 11,4 y al compuesto de referencia orlistat, expresados como  $\mu g\ mL^{-1}$ .

En primer lugar, el control EWPn no evidenció  $A_{lip}$  en el rango de concentraciones evaluado (dato no mostrado). Como se expone en la [Tabla 8](#), la mayor  $A_{lip}$  entre todos los nanocomplejos evaluados fue exhibida por EWPn-TOM y EWPn-ORE, aunque en este caso EWPn-ORE presentó un valor de  $IC_{50}$  significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que EWPn-TOM ( $13,0 \pm 0,3$  y  $15,2 \pm 0,1\ \mu g\ mL^{-1}$ , respectivamente). Sin embargo, ambos valores de  $IC_{50}$  resultaron considerablemente mayores al valor obtenido para el compuesto de referencia orlistat ( $0,08 \pm 0,01\ \mu g\ mL^{-1}$ ). Hasta el momento, no se ha reportado la capacidad de inhibir lipasa pancreática de TOM libre o encapsulado. Por su parte, [Sayari y col. \(2024\) \(275\)](#) evaluaron la  $A_{lip}$  de diferentes extractos de *Thymus vulgaris*. El extracto más efectivo para inhibir la enzima (extracción con acetato de etilo) presentó un valor de  $IC_{50}$  de  $803,8\ \mu g\ mL^{-1}$ . Por otro lado, tampoco se ha estudiado la capacidad de inhibir lipasa pancreática de ORE libre o encapsulado. [Ali-Shtayeh y col. \(2018\) \(276\)](#) obtuvieron AEs a partir de la especie *Origanum syriacum* bajo diferentes condiciones de crecimiento y, posteriormente, evaluaron la  $A_{lip}$  de estos AEs, timol y carvacrol. Los autores informaron que el valor de  $IC_{50}$  de los AEs se encontró entre  $20,9$  y  $25,9\ mg\ mL^{-1}$ . Además, los AEs presentaron menor  $IC_{50}$  que timol ( $31,44\ mg\ mL^{-1}$ ) y menor o igual  $IC_{50}$  que carvacrol ( $25,46\ mg\ mL^{-1}$ ). En todos los casos, los AEs evidenciaron alto CR de timol (entre  $25,10$  y  $57,60\%$ ) y carvacrol (entre  $19,08$  y  $66,68\%$ ).

Al determinar la  $A_{lip}$  del nanocomplejo EWPn-LIM, se observó un valor de  $IC_{50}$  de  $55,1 \pm 1,8\ \mu g\ mL^{-1}$ , que resultó significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) comparado con EWPn-TOM y EWPn-ORE. No se ha reportado en la literatura la evaluación *in vitro* de la capacidad inhibitoria de lipasa pancreática por parte de LIM, como tampoco la de extractos de *Citrus limon* o limoneno, en forma libre o encapsulada. Por su parte, [Abdul Razak y col. \(2024\) \(277\)](#) compararon la capacidad inhibitoria de lipasa pancreática de extractos de hoja, cáscara y fruto de 5 especies del género *Citrus* (*C. aurantifolia*, *C. grandis*, *C. hystrix*, *C. medica* y *C. microcarpa*). Los valores de porcentaje de inhibición de la enzima se encontraron entre  $5,59$  y  $62,57\%$ , mientras que el compuesto de referencia orlistat presentó un valor de  $84,75\%$ . Además, [Ortega Pérez y col. \(2022\) \(278\)](#) obtuvieron un extracto etanólico de hojas de *Callistemon citrinus* con alto CR de limoneno. Al determinar la  $A_{lip}$ , los autores informaron un valor de  $IC_{50}$  de  $392,00\ \mu g\ mL^{-1}$ , el cual resultó mayor que el valor presentado por el compuesto de referencia orlistat ( $35,10\ \mu g\ mL^{-1}$ ).

Por otro lado, el nanocomplejo EWPn-COM exhibió un valor de  $IC_{50}$  de  $62,0 \pm 0,2\ \mu g\ mL^{-1}$  ([Tabla 8](#)). Hasta el momento, no se ha estudiado la capacidad inhibitoria de lipasa pancreática *in vitro* de COM libre o encapsulado. Sin embargo, [Sellami y col. \(2016\) \(156\)](#) determinaron los valores de porcentaje de inhibición de lipasa pancreática de diferentes extractos de *Cuminum cyminum*, encontrando valores comprendidos entre  $37,07$  y  $50,37\%$ .

Finalmente, el nanocomplejo EWPn–CAN exhibió la menor  $A_{lip}$  ( $IC_{50}$  de  $68,8 \pm 1,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) entre los nanocomplejos evaluados (Tabla 8). No se ha reportado en la literatura la evaluación *in vitro* de la capacidad inhibitoria de lipasa pancreática de CAN, como tampoco la de extractos de *Cinnamomum cassia* o *trans*-cinamaldehído, en forma libre o encapsulada. Sin embargo, existen algunos trabajos científicos que reportan este efecto para AEs y extractos de especies pertenecientes al género *Cinnamomum*. Wang y col. (2023) (279) obtuvieron AEs a partir de la especie *Cinnamomum burmannii* utilizando diferentes métodos de extracción. Posteriormente, los autores evaluaron la  $A_{lip}$  de estos AEs e indicaron que los valores de  $IC_{50}$  se encontraron entre 23,56 y 54,45  $\text{mg mL}^{-1}$ , mientras que el compuesto de referencia orlistat presentó un valor de 0,72  $\text{mg mL}^{-1}$ . Cabe señalar que el componente principal de los AEs resultó el 1,8-cineol, en tanto que *trans*-cinamaldehído presentó bajo CR. Por otro lado, Abeysekera y col. (2017) (280) informaron valores de  $IC_{50}$  de 297,57 y 301,09  $\mu\text{g mL}^{-1}$  al evaluar la  $A_{lip}$  de extractos de *Cinnamomum zeylanicum*, resultando considerablemente menos efectivos que el compuesto de referencia orlistat ( $IC_{50}$  de 26,78  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). En este caso, el compuesto *trans*-cinamaldehído resultó el componente principal de los extractos evaluados.

A partir de estas determinaciones, podría concluirse que EWPn–TOM y EWPn–ORE resultarían ser los nanocomplejos más efectivos para inhibir enzimas relacionadas con DM2 ( $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -glucosidasa y lipasa pancreática). Por el contrario, el nanocomplejo EWPn–CAN presentó la menor capacidad para inhibir estas enzimas digestivas entre todos los nanocomplejos evaluados.

### 3.4.5. Actividad inhibitoria de lipooxigenasa de nanocomplejos EWPn–AE

La enzima LOX cataliza la biosíntesis de leucotrienos a partir de ácido araquidónico, y su hiperactividad ha sido relacionada con diversas enfermedades inflamatorias, tumorales, isquémicas, entre otras, y con DM (208). Las reacciones de oxidación de ácidos grasos poliinsaturados catalizadas por esta enzima corresponden a uno de los varios procesos que generan ROS como subproducto. Se conoce que la enzima LOX cumple una importante función regulando los niveles de ROS en la señalización proinflamatoria, por lo que su inhibición podría ser beneficiosa tanto para disminuir la respuesta inflamatoria como para reducir los niveles de ROS asociados (281).

En la Tabla 8 se presentan los valores de  $IC_{50}$  de la actividad inhibitoria de lipooxigenasa ( $A_{lox}$ ) correspondientes a los nanocomplejos EWPn–AE obtenidos a pH 11,4 y al compuesto de referencia naproxeno, expresados como  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

En primer lugar, el control EWPn no evidenció  $A_{lox}$  en el rango de concentraciones evaluado (dato no mostrado). Como se observa en la Tabla 8, la mayor  $A_{lox}$  fue exhibida por los nanocomplejos EWPn–TOM y EWPn–ORE. Los valores de  $IC_{50}$  de ambos nanocomplejos ( $0,21 \pm 0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$  para EWPn–TOM y  $0,12 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$  para EWPn–ORE) resultaron significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que

el valor de  $IC_{50}$  del compuesto de referencia naproxeno ( $14,0 \pm 0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Algunos autores han informado la capacidad de inhibir LOX de TOM y ORE libres (AEs no encapsulados). Entre ellos, [Kamdem y col. \(2015\) \(282\)](#) hallaron un valor de  $IC_{50}$  de  $0,192 \text{ mg mL}^{-1}$  al evaluar la  $A_{lox}$  de TOM. Sin embargo, dicha actividad resultó menor que la obtenida para el compuesto de referencia ácido nordihidroguaiarético (ANDG), el cual presentó un valor de  $IC_{50}$  de  $0,0007 \text{ mg mL}^{-1}$ . A partir del análisis de la composición química, los autores informaron que el componente principal de TOM resultó timol (CR de 57,9%). En otro trabajo científico, se informó que TOM evidenció mayor capacidad de inhibir LOX que ORE (90,24 y 82,92% de inhibición, respectivamente), y ambos AEs presentaron menor capacidad que el compuesto de referencia quercetina (92,39%) [\(283\)](#). Cabe mencionar que, a diferencia de lo expuesto en el presente trabajo, carvacrol fue reportado como el componente principal de TOM y ORE (CR de 80,68 y 67,95%, respectivamente). Por otro lado, no se ha reportado la encapsulación de AEs de plantas de *Thymus* u *Origanum*, extractos de tomillo u orégano, timol o carvacrol para la evaluación *in vitro* de la capacidad inhibitoria de LOX.

Como se expone en la [Tabla 8](#), el nanocomplejo EWPn–CAN exhibió moderada  $A_{lox}$ , presentando un valor de  $IC_{50}$  de  $7,9 \pm 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Al igual que EWPn–TOM y EWPn–ORE, este nanocomplejo evidenció una actividad inhibitoria significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) a la del compuesto de referencia naproxeno. Aunque la propiedad antiinflamatoria de *Cinnamomum* spp. se ha demostrado mediante diferentes estudios *in vivo*, la capacidad de inhibir LOX (*in vitro*) de AEs o extractos (libres o encapsulados) obtenidos a partir de *Cinnamomum* spp., o de *trans*-cinamaldehído (libre o encapsulado), no se ha reportado hasta el momento [\(284\)](#).

Por otro lado, no fue posible obtener un valor de  $IC_{50}$  para el nanocomplejo EWPn–LIM debido a su baja  $A_{lox}$ . Por este motivo, en la [Tabla 8](#) se expone el valor de  $IC_{25}$  (concentración de AE en  $\mu\text{g mL}^{-1}$  necesaria para inhibir el 25% de la actividad enzimática) correspondiente al nanocomplejo EWPn–LIM, resultando ser este de  $20,2 \pm 0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Algunos autores han estudiado la capacidad de inhibir LOX de LIM libre (no encapsulado). Entre ellos, [Hamdan y col. \(2013\) \(285\)](#) informaron que LIM presentó considerable  $A_{lox}$  ( $IC_{50}$  de  $32,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), aunque menor que la exhibida por el compuesto de referencia ANDG ( $IC_{50}$  de  $0,24 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los autores atribuyeron el efecto inhibitorio al alto CR de limoneno (52,73%), ya que este compuesto puro evidenció un valor de  $IC_{50}$  de  $13 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Además, [Dongmo y col. \(2013\) \(286\)](#) evaluaron la  $A_{lox}$  de LIM y AE de *Citrus aurantifolia* y observaron valores de  $IC_{50}$  de 46,50 y 49,35 ppm, respectivamente. En este caso, el componente principal de los AEs resultó limoneno, con un CR de 81,4% en LIM y de 52,0% en AE de *Citrus aurantifolia*. Ambos AEs presentaron menor  $A_{lox}$  que la del compuesto de referencia ANDG ( $IC_{50}$  de 0,70 ppm). Por otro lado, la capacidad de inhibir LOX *in vitro* no se ha reportado para LIM, AE de *Citrus* spp. o limoneno encapsulado en biopolímeros.

Finalmente, el nanocomplejo EWPn–COM no evidenció  $A_{lox}$  bajo las concentraciones evaluadas en el presente trabajo ([Tabla 8](#)). La actividad antiinflamatoria de COM ha sido evaluada mediante diversos

ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*. Hanafi y col. (2014) (165) determinaron la  $A_{lox}$  de COM y AE de *Coriandrum sativum* y obtuvieron valores de  $IC_{50}$  de 35,81 y 38,67  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Además, los autores compararon estas actividades con la del compuesto de referencia ANDG, el que presentó un valor de  $IC_{50}$  de 0,24  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Al analizar la composición química de COM, se informó que el componente principal resultó  $\gamma$ -terpineno, el que presentó CR de 22,7% (valor similar al de COM evaluado en el presente trabajo). Sin embargo, la capacidad inhibitoria de LOX *in vitro* de COM, extracto de *Cuminum cyminum* o  $\gamma$ -terpineno encapsulado en biopolímeros no ha sido estudiada hasta el momento.

A partir de estas determinaciones, podría concluirse que EWPn–TOM, EWPn–ORE y EWPn–CAN resultaron ser los nanocomplejos más efectivos para inhibir LOX, presentando incluso mayor  $A_{lox}$  que el compuesto de referencia naproxeno. Por el contrario, el nanocomplejo EWPn–LIM evidenció baja  $A_{lox}$ , mientras que la actividad del nanocomplejo EWPn–COM no pudo ser determinada bajo las condiciones experimentales del presente trabajo.

### 3.5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 1

En el presente capítulo se abordó el desarrollo de EWPn para la encapsulación de AEs con potencial actividad antidiabética, y su posterior caracterización fisicoquímica y biológica. Los resultados alcanzados permiten concluir lo siguiente, en función de los objetivos propuestos:

Caracterización de AEs: Mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, se identificaron y cuantificaron en términos relativos los principales compuestos volátiles presentes en CAN, COM, LIM, TOM y ORE. Se evidenció una marcada variabilidad en la composición química entre ellos, con predominancia de monoterpenos oxigenados, fenoles y aldehídos aromáticos, todos con actividad biológica previamente demostrada. Esta caracterización permitió seleccionar AEs con perfiles químicos adecuados para aplicaciones funcionales, orientadas a la inhibición de enzimas asociadas a la DM2.

Formación y caracterización de nanopartículas proteicas que encapsulan AEs: Se lograron desarrollar con éxito complejos nanoestructurados a partir de EWPn y diferentes AEs, obteniendo sistemas estables con tamaños en el rango nanométrico, potencial  $\zeta$  negativo y adecuada eficiencia de encapsulación. La interacción EWPn–AE fue confirmada por espectroscopía de fluorescencia y se observó que algunos AEs inducen modificaciones estructurales relevantes en la nanopartícula. En todos los casos, las nanopartículas actuaron como vehículos eficaces para los AEs, protegiendo sus componentes bioactivos.

Evaluación de la actividad biológica: La actividad inhibitoria de los nanocomplejos EWPn–AE fue evaluada frente a cuatro enzimas clave en la fisiopatología de la DM2 ( $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -glucosidasa, lipasa pancreática) y en el estado inflamatorio asociado (LOX). En general, los nanocomplejos exhibieron una capacidad inhibitoria significativa, siendo el sistema EWPn–ORE uno de los más destacados por su efecto frente a todas las enzimas evaluadas. La encapsulación permitió conservar la actividad biológica de los

AEs, posiblemente por el aumento de la estabilidad. Estos resultados respaldan el potencial de las nanopartículas proteicas como vehículos funcionales para modular respuestas enzimáticas relevantes en el contexto metabólico.

Por lo tanto, este capítulo demuestra la viabilidad tecnológica y funcional del uso de EWPn para vehicular AEs con potencial actividad antidiabética. Se establece así una base sólida para futuras investigaciones orientadas a la optimización de estos sistemas y su aplicación en matrices alimentarias o nutraceuticos.



## **4. CAPÍTULO 2**

**Coacervados proteína-polisacárido que vehiculizan aceites  
esenciales: evaluación de las propiedades antioxidantes y  
antidiabéticas**

## 4.1. INTRODUCCIÓN

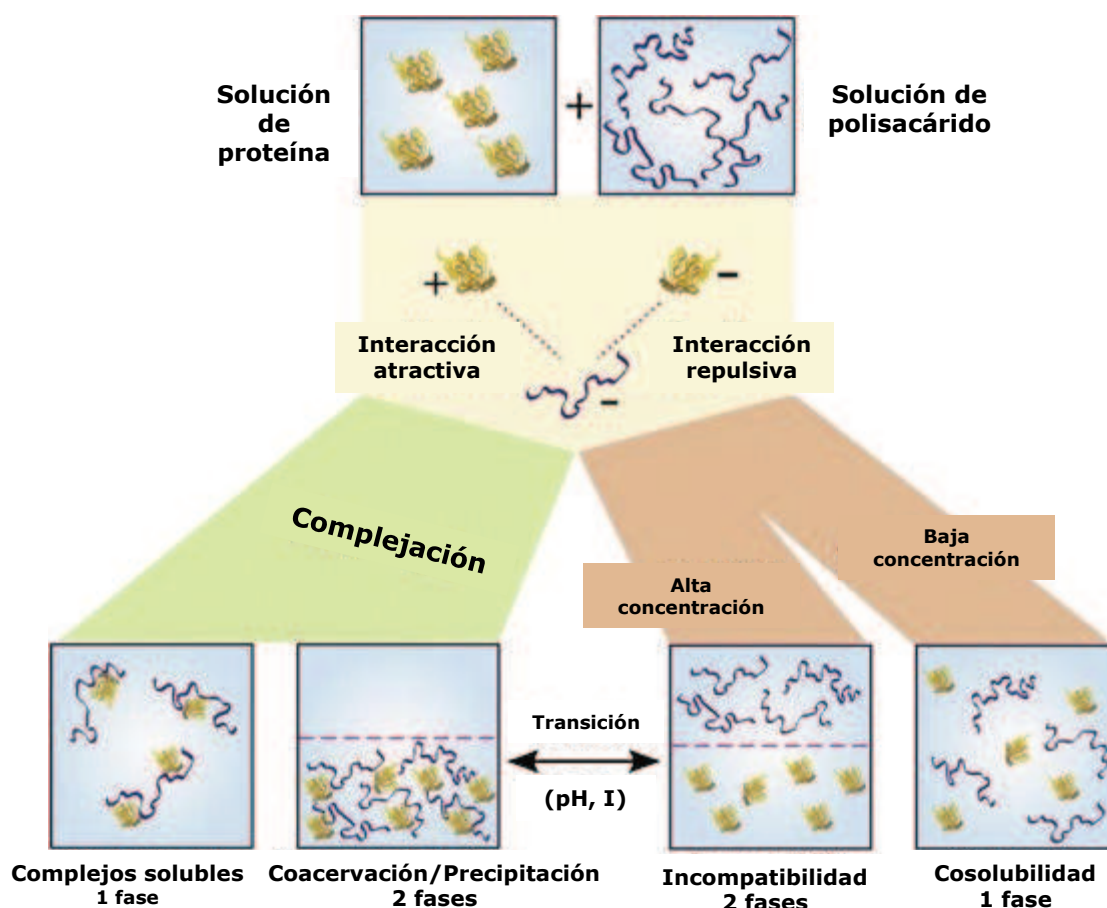
### 4.1.1. Interacciones proteína-polisacárido

En solución, dos o más biopolímeros de diferente naturaleza química pueden asociarse mediante diversas interacciones dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas y de las condiciones del medio. Las fuerzas que gobiernan este comportamiento son principalmente de naturaleza electrostática (atracción y repulsión), aunque también pueden ocurrir otras interacciones no covalentes tales como interacciones hidrofóbicas, de van der Waals y puentes de hidrógeno que estabilizan el sistema biopolimérico. La comprensión de estas interacciones resulta importante para el diseño de partículas destinadas a la incorporación de CBs (287).

La incorporación de un PS puede conferir mayor estabilidad coloidal a un complejo proteína-ligando y mayor protección a un CB frente a agentes externos. Esto se debe a la potencial capacidad de los PSs para formar una cubierta protectora (o estructuras con características funcionales interesantes) cuando interaccionan con proteínas en solución. En particular, las interacciones entre proteínas y PSs dependen de sus propiedades fisicoquímicas (*e.g.*, PM, densidad de carga, flexibilidad, etc.), de la relación proteína:PS en la solución, de la concentración total de biopolímeros y de las condiciones del medio (*e.g.*, pH, fuerza iónica, etc.) (34). Las interacciones electrostáticas se deben a la carga neta que presenta cada biopolímero en las condiciones en que se produce la mezcla. Por un lado, las proteínas poseen grupos que confieren carga tanto positiva (grupos amino) como negativa (grupos carboxilos) a la macromolécula. La carga neta total de la proteína depende de su pI y del pH del medio. Es importante considerar que, aunque la carga neta de una proteína sea cero en su pI, la macromolécula aún presenta regiones positivas y negativas en su superficie y, por lo tanto, puede estar involucrada en interacciones electrostáticas atractivas y/o repulsivas. Por su parte, la carga eléctrica de un PS depende de la naturaleza de los grupos iónicos a lo largo de su cadena polimérica, como también de las condiciones de la solución acuosa. Algunos PSs son neutros (*e.g.*, almidón, celulosa, etc.), otros aniónicos (*e.g.*, alginato, carrageninas, goma arábica, etc.) y otros catiónicos (quitosano). La magnitud de la carga eléctrica de los PSs iónicos varía con el pH en relación con el pKa de los grupos cargados. Los PSs aniónicos tienden a ser neutros a valores de pH suficientemente menores al pKa, pero negativos cuando el pH se encuentra por encima. Los grupos funcionales cargados que se encuentran con mayor frecuencia en PSs son los grupos sulfato (pKa cercano a 2), grupos carboxilo (pKa cercano a 3,5) y grupos amino (pKa cercano a 6,5). Además, la carga eléctrica de los PSs puede ser alterada en presencia de otras especies en solución, como iones monovalentes o divalentes que se unen a grupos con carga opuesta (16).

La presencia de una proteína y un PS en solución puede derivar en un sistema de una o dos fases, según las propiedades fisicoquímicas de los biopolímeros y las condiciones del medio acuoso. En una mezcla de proteína y PS aniónico existe un rango de pH (valores mayores al pI) en el que ambos biopolímeros poseen carga negativa, lo que conduce principalmente a interacciones repulsivas

promoviendo la cosolubilidad y/o la incompatibilidad termodinámica, dependiendo de la concentración (Fig. 8). Cuando la concentración total de biopolímeros es baja se produce la cosolubilidad. En este caso, el sistema presenta una sola fase, con biopolímeros distribuidos homogéneamente en la solución. Por otro lado, la incompatibilidad termodinámica ocurre cuando la concentración total de biopolímeros es elevada. Bajo esta condición, el sistema presenta dos fases, cada una de ellas rica en uno de los biopolímeros (separación de fases segregativa). Generalmente, el fundamento molecular de este efecto es la exclusión estérica (43). Por otro lado, cuando el pH se encuentra levemente por debajo del pI de la proteína se forman complejos solubles, ya que la carga neta positiva que adquiere la proteína permite la atracción electrostática entre los biopolímeros (Fig. 8). De este modo, el sistema presenta una sola fase con complejos distribuidos homogéneamente en la solución y la solubilidad se debe al exceso de cargas en estos complejos. Además, un exceso de PS favorece la solubilidad y estabilidad de estos complejos debido a que las cargas negativas predominantes provocan repulsión electrostática entre ellos e impiden la precipitación isoeléctrica de la proteína. Sin embargo, cuando el valor del pH es considerablemente menor respecto al valor del pI de la proteína, la carga neta de los complejos se aproxima a la neutralidad, lo que se traduce en un fenómeno de agregación y sedimentación. En consecuencia, se obtiene un sistema de dos fases (separación de fases asociativa), siendo una de ellas rica en ambos biopolímeros (fase continua) y la otra mayormente enriquecida en solvente acuoso (fase de equilibrio). Dicho fenómeno se denomina coacervación compleja y los agregados formados se denominan coacervados complejos (Fig. 8) (43).

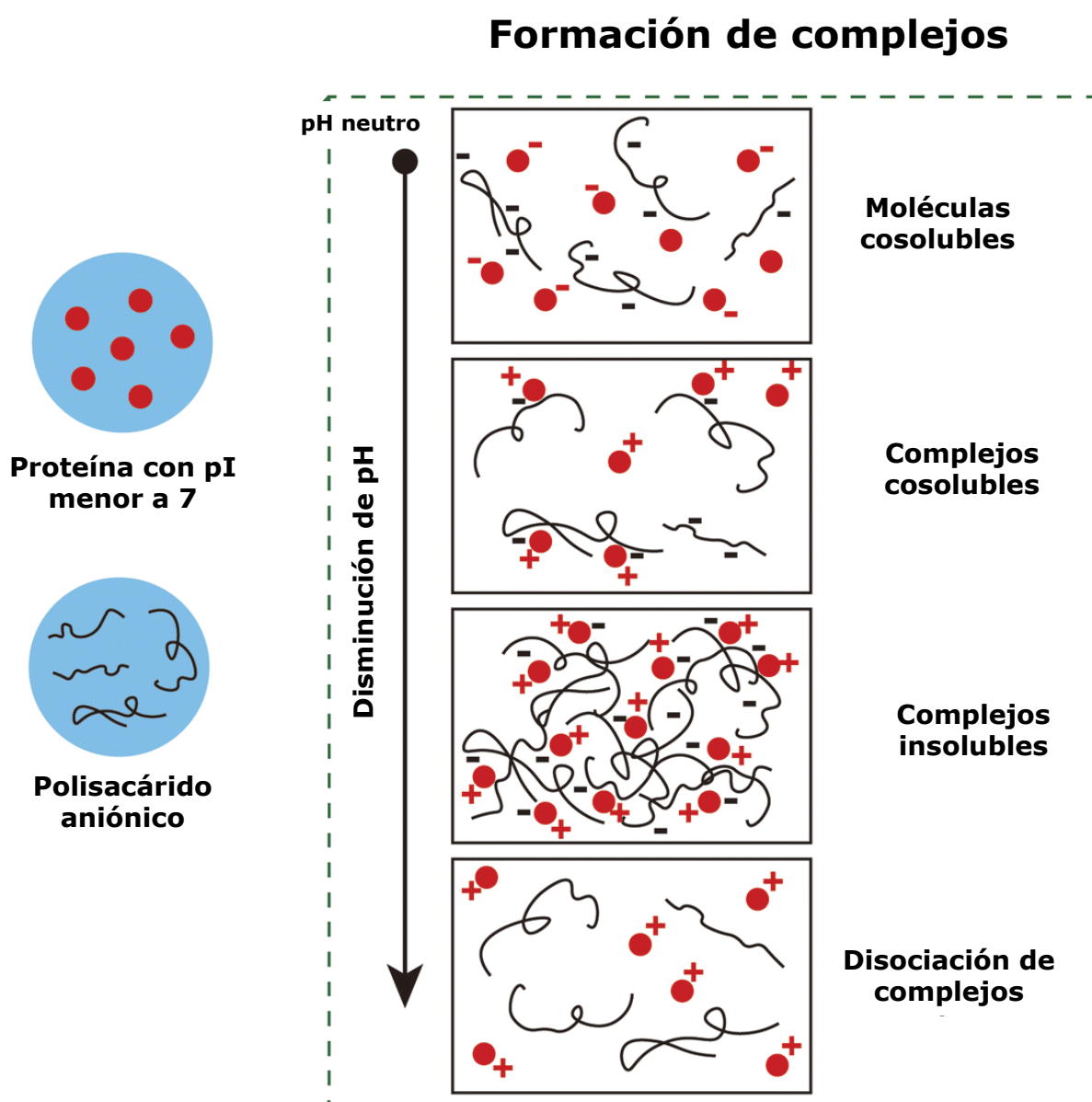


**Figura 8.** Representación esquemática de las interacciones posibles entre dos biopolímeros en solución acuosa (Figura modificada de Matalanis y col. (2011) (43)).

Los sistemas proteína-PS exhiben varias propiedades interesantes para su aplicación en alimentos, tales como actividad superficial para estabilizar interfaces aire-agua o aceite-agua, propiedades espesantes y gelificantes y, además, presentan capacidad para encapsular diversos CBs. La gran variedad de proteínas y PSs naturales ampliamente disponibles y de bajo costo permite el diseño de partículas biopoliméricas destinadas específicamente a la liberación controlada de CBs, que puede ser facilitada por procesos mecánicos, variaciones de pH (condiciones de acidez en el estómago y de neutralidad en el intestino) o acción enzimática. Sin embargo, es importante señalar que los complejos electrostáticos pueden ser sensibles al pH, a la fuerza iónica y a los cambios de temperatura, lo que puede causar fenómenos de disociación o agregación no deseados. Además, estos complejos no son adecuados para la obtención de partículas transparentes. Esto se debe al elevado PM de los biopolímeros involucrados, lo que implica que los complejos formados generen una gran dispersión de luz (43).

A partir de lo expuesto, es posible obtener coacervados complejos compuestos por una proteína y un PS controlando las fuerzas atractivas que ocurren entre estos biopolímeros. Para ello, se debe considerar que el pH de la solución es crítico en la formación de estas estructuras y que las cargas superficiales de

ambas macromoléculas se pueden modular controlando este parámetro (Fig. 9). Inicialmente, los coacervados se presentan como pequeñas gotas ricas en biopolímeros suspendidas en la fase acuosa, pero son muy propensas a la coalescencia debido a su baja carga neta y el sistema tiende a la separación de fases asociativas. Si el pH se reduce lo suficiente, los biopolímeros se empaquetan tan estrechamente formando estructuras de gran tamaño que finalmente precipitan. Por último, si el pH se encuentra muy por debajo del valor de pKa del PS aniónico, no se produce formación de complejos debido a la disminución de carga del PS (288).



**Figura 9.** Representación esquemática del mecanismo para producir coacervados complejos proteína-polisacárido en términos del pH del medio (Figura modificada de Zhang y col. (2024) (288)).

En un trabajo científico, [Sponton y col. \(2017\) \(169\)](#) desarrollaron nanopartículas de OVA y pectina de alto metoxilo (PAM) con el objetivo de estudiar diferentes relaciones proteína:PS. Los autores propusieron que PAM se puede unir a OVA mediante interacciones electrostáticas formando una cubierta protectora a su alrededor. Para determinar la concentración de PS suficiente para recubrir completamente la superficie de la proteína, llevaron a cabo un estudio de potencial  $\zeta$  en función del pH correspondiente a nanopartículas de OVA, PAM y distintas relaciones nanopartícula de OVA:PAM. A partir de las curvas obtenidas se pudo calcular el pI de las nanopartículas, el cual evidenció un valor de 4,73, y se observó que PAM presentó carga negativa en todo el rango de pH evaluado. Por otro lado, la relación másica nanopartícula de OVA:PAM 3,3:1 exhibió una curva de potencial  $\zeta$  en la cual se observó la presencia de carga positiva (correspondiente a grupos cargados positivamente en la proteína) en ciertos valores de pH. Esto indicó que la concentración de PAM no fue suficiente para cubrir la superficie de la nanopartícula en su totalidad. Finalmente, la neutralización total de los grupos positivos ocurrió cuando la relación másica nanopartícula de OVA:PAM fue 1:1 y 2:1. Debido a que la relación 2:1 se corresponde con una mayor cantidad de nanopartícula de OVA (y, por lo tanto, mayor capacidad de carga del CB), fue seleccionada por los autores para continuar con los análisis.

#### **4.1.1.1. Características generales de las pectinas**

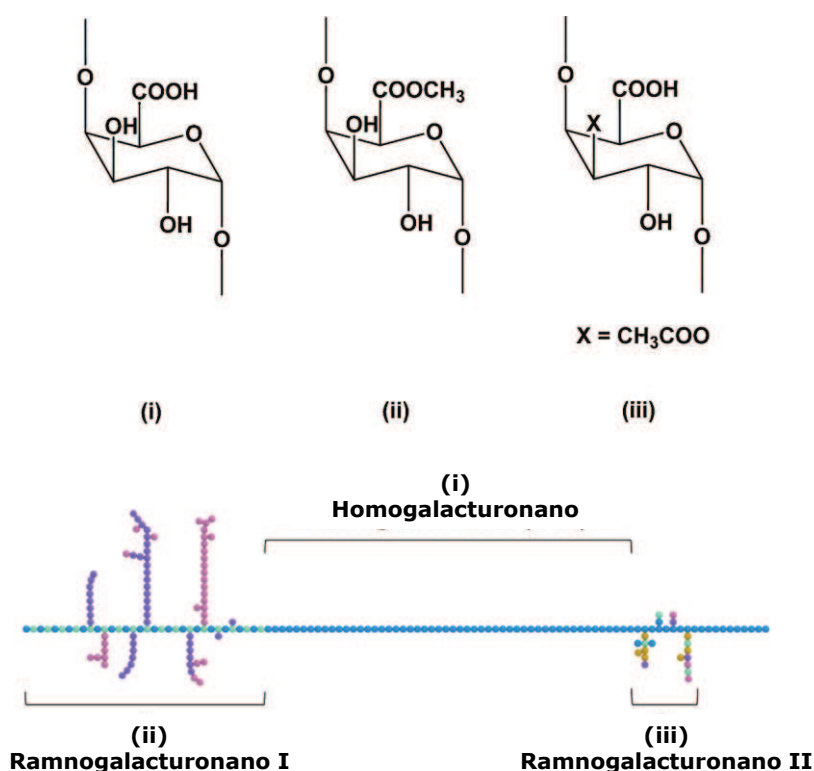
Las pectinas pertenecen a la familia de PSs presentes en la pared celular primaria y en la lamela media de plantas vasculares. Son importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas ya que tienen un fuerte impacto sobre la integridad y rigidez de los tejidos vegetales. Además, están involucradas en el transporte de iones, definen la porosidad de las paredes celulares e influyen en la activación del sistema inmunitario de las plantas. Las numerosas funciones de las diversas pectinas dependen de su estructura y concentración en la pared celular, y esto es muy variable debido a modificaciones químicas y enzimáticas que se producen durante el crecimiento, maduración y, posteriormente, durante el almacenamiento y procesamiento de cada parte de la planta [\(289\)](#).

Debido a que se clasifican como sustancias GRAS y presentan propiedades gelificantes y emulsionantes, las pectinas son ampliamente utilizadas en la industria alimenticia para la producción de jaleas, confituras, mermeladas, jugos frutales, etc. Es importante señalar que, como constituyentes esenciales de la fibra dietética soluble, presentan numerosos beneficios para la salud (*e.g.*, contribuyen al control del nivel de colesterol en sangre, unen metales pesados contaminantes, presentan actividad antitumoral, etc.) [\(289\)](#).

Aunque la mayoría de las plantas contienen pectina, cerca del 85% se extrae de las cáscaras de cítricos y de la pulpa de manzana debido a su alto contenido (entre 18 y 30%) y a la elevada disponibilidad y bajo costo de estos residuos industriales. Entre los diversos métodos de extracción, el más empleado consiste en convertir la pectina insoluble presente en las células (protopectina) en su forma soluble a través

del calentamiento en medio ácido. Dependiendo de la fuente y el método de separación, el PM del PS puede encontrarse entre 60 y 130 kDa (290).

Las pectinas empleadas como aditivos alimentarios son heteropolisacáridos aniónicos que contienen al menos 17 monosacáridos diferentes. En su estructura básica, un 65% m/m corresponde a unidades de ácido galacturónico, el cual puede estar presente como ácido libre (sal de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  o  $\text{NH}_4^+$ ), metil éster (esterificado naturalmente con metanol) o conteniendo grupos amida (pectinas aminadas). Sin embargo, este porcentaje varía según la metodología de extracción, el material vegetal, el estadio de desarrollo fisiológico, etc. De modo general, la cadena lineal del PS presenta monómeros de ácido galacturónico unidos entre sí por enlaces  $\alpha 1-4$ , a la cual se unen residuos de azúcares neutros como la L-arabinosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-xilosa, entre otros (Fig. 10) (291). Dado que las pectinas comerciales pertenecen a un grupo heterogéneo, son clasificadas en función del grado de metil-esterificación o metoxilación de las unidades de ácido galacturónico. El grado de metoxilación es un porcentaje que expresa la relación molar de grupos carboxilo metil-esterificados presentes sobre la cantidad total de unidades de ácido galacturónico (en forma libre y sustituida). Así, pectinas con valores de grado de metoxilación por debajo del 50% se clasifican como pectinas de bajo metoxilo, mientras que aquellas que presentan valores mayores al 50% se clasifican como pectinas de alto metoxilo. Este parámetro tiene relación directa con la capacidad gelificante y emulsionante del PS, y puede ser determinado mediante técnicas espectroscópicas (291).



**Figura 10.** Unidades de ácido galacturónico encontradas en pectinas (Figura modificada de Chan y col. (2017) (291)).

#### 4.1.1.2. Aceites esenciales encapsulados en coacervados complejos

La coacervación compleja es una de las técnicas más empleadas para la encapsulación de CBs en general. Corresponde a un método relativamente simple y económico que puede dividirse en 4 etapas: (i) suspensión del “núcleo” biopolimérico en fase líquida, (ii) suspensión de la “cubierta” biopolimérica en fase líquida, (iii) deposición electrostática de la cubierta alrededor del núcleo, y (iv) gelificación y solidificación de la cápsula obtenida (etapa opcional). Los coacervados complejos formados de este modo son resistentes a las altas temperaturas y, en general, evidencian elevada EE y permiten la liberación controlada del CB (292).

Como se mencionó previamente, la implementación de AEs en la industria encuentra limitaciones tecnológicas debido a su elevada volatilidad, baja solubilidad acuosa, susceptibilidad frente al oxígeno, luz UV y altas temperaturas, interacciones con otros componentes, impacto negativo en la aceptabilidad sensorial, etc. (95). A partir de esta problemática, se ha sugerido en numerosos trabajos científicos la encapsulación de AEs en coacervados complejos como una promisorio estrategia que permita el aprovechamiento de estos CBs. En un estudio, Manaf y col. (2018) (293) encapsularon AE de citronela en coacervados complejos de gelatina y goma arábica (relación másica 1:1). Mediante este método, fue posible obtener cápsulas de forma esférica y superficie lisa. Además, se alcanzó una EE de aproximadamente 94% y se observó que la liberación del AE desde el interior de las cápsulas ocurrió a través de difusión pasiva. Por otro lado, Muhoza y col. (2019) (294) utilizaron gelatina y PAM en una relación másica 3:1 y ácido tánico como agente de entrecruzamiento para obtener coacervados complejos. Las microcápsulas formadas de este modo fueron capaces de incorporar AE de menta, presentando una EE de 75%. Adicionalmente, los autores indicaron que los coacervados mejoraron significativamente las propiedades térmicas del AE. En otro trabajo, se encapsuló AE de jengibre en coacervados complejos formados por aislado de proteína de suero y goma arábica presentes en una relación másica 3:1 (295). Los autores señalaron que la incorporación del AE en las micropartículas no implicó la formación de enlaces covalentes, lo que sugiere que los CBs son encapsulados en los coacervados por medio de interacciones físicas. Además, indicaron que la eficiencia de entrapamiento, definida como el porcentaje de AE encapsulado en los coacervados respecto de la cantidad de AE total, resultó 55%. Por último, se observó que los coacervados obtenidos fueron capaces de proteger a los CBs de la degradación térmica. Por su parte, Hernández Nava y col. (2020) (244) encapsularon ORE mediante el método de coacervación compleja utilizando dos sistemas diferentes. En primer lugar, se obtuvieron coacervados de gelatina y mucílago de chíá en una relación másica 2:1 y Tween 80 como agente emulsionante, los cuales fueron comparados con coacervados de gelatina y goma arábica en una relación másica 1:1 y el mismo agente emulsionante. Mediante microscopía óptica, fue posible observar estructuras aglomeradas junto a cápsulas individuales para ambos sistemas. Además, los autores reportaron que la EE de los coacervados se encontró entre 76 y 92%, aproximadamente. Finalmente, Qiu y col. (2022) (296) desarrollaron coacervados complejos utilizando aislado de proteína de frijol mungo y pectina de cáscara de damasco. Las condiciones óptimas para la formación del coacervado complejo



fueron pH 4,1 y relación másica de biopolímeros 4:1 (proteína:PS). Los autores indicaron que el coacervado diseñado fue capaz de incorporar AE de rosa con una EE cercana a 90%. Adicionalmente, señalaron que las interacciones involucradas en la asociación de los biopolímeros fueron de tipo electrostáticas, mientras que entre los materiales de la cubierta (proteína y PS) y el núcleo (AE) se observó la formación de puentes de hidrógeno. Por último, el AE de rosa encapsulado en el coacervado exhibió mayor estabilidad térmica que el AE en forma libre.

#### **4.1.2. Métodos *in vitro* basados en cultivos celulares para la evaluación de la actividad antidiabética**

Como se mencionó previamente, el potencial antidiabético de un CB puede evaluarse a través de diferentes modelos *in vitro*. Sin embargo, algunos de ellos utilizan reactivos sintéticos o involucran reacciones químicas demasiado simplificadas, por lo que no reflejan completamente el efecto de un CB sobre el organismo, más aún si dicho compuesto se encuentra incorporado en un sistema biopolimérico. El avance continuo en el diseño de modelos *in vitro* basados en cultivos celulares permite obtener información cada vez más exhaustiva de los mecanismos de acción específicos y evaluar la citotoxicidad de CBs sin recurrir a modelos animales y ensayos clínicos que implican elevados costos y la aprobación ética de los protocolos (297).

Para la implementación de técnicas basadas en cultivos celulares se obtienen líneas celulares a partir de una única célula, la cual es clonada en condiciones controladas. Esto asegura la homogeneidad de las poblaciones de células que serán empleadas en los ensayos, eliminando factores aleatorios genéticos o ambientales. En cada subcultivo, las muestras replicadas son idénticas entre sí y las características de la línea pueden perpetuarse por varias generaciones, o incluso indefinidamente si la línea celular se almacena en nitrógeno líquido. Así, se pueden analizar numerosas variables y obtener una gran cantidad de réplicas de forma relativamente económica. Con respecto a los factores ambientales, el cultivo de células permite controlar el entorno fisicoquímico (*e.g.*, pH, temperatura, presión osmótica, tensión de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, etc.) y condiciones fisiológicas como la concentración de hormonas y nutrientes específicos. De este modo, los datos obtenidos presentan altos niveles de confiabilidad, reproducibilidad y consistencia que no pueden alcanzarse cuando se estudian órganos u organismos (297). Por otro lado, los métodos *in vitro* basados en cultivos celulares permiten la selección de líneas humanas. Esto es particularmente importante cuando se desea evaluar la actividad antidiabética de un CB, ya que el desarrollo de esta patología presenta leves o importantes diferencias entre especies (298).

Las técnicas basadas en cultivos celulares deben llevarse a cabo bajo estrictas condiciones que implican un elevado nivel de destreza e interpretación por parte del operador para reconocer los diferentes desafíos que puedan surgir y actuar en consecuencia. Además, la contaminación causada por bacterias, hongos, virus, micoplasmas, contaminantes químicos, entre otros agentes, es un problema recurrente en el

cultivo de células que puede conducir a cambios en la morfología, velocidad de crecimiento y fenotipo, generar mutaciones o culminar en la destrucción total del cultivo. Este gran inconveniente puede evitarse si el operador posee una sólida capacitación y amplia experiencia en los procedimientos involucrados que le permita implementar buenas prácticas de cultivo (299). Por su parte, en la desdiferenciación celular se pierden las propiedades diferenciadas dificultando la relación entre las células cultivadas y las células funcionales provenientes de un órgano o tejido. Cuando esto ocurre, se pierden las interacciones celulares específicas de la histología del tejido. La disociación de las células a partir de una geometría tridimensional para su propagación en un sustrato bidimensional induce la mayoría de las diferencias observadas en el comportamiento celular entre células cultivadas y sus equivalentes formando parte de un órgano o tejido. Además, un cultivo celular carece de varios componentes sistémicos involucrados en la regulación homeostática *in vivo*, lo que ha conducido a la incorporación de diferentes hormonas en los medios de cultivo. Finalmente, la baja tensión de O<sub>2</sub> debido a la ausencia de su transportador (hemoglobina) resulta en un metabolismo energético *in vitro* producido principalmente por glucólisis. Aunque el ciclo del ácido cítrico continúa siendo funcional en células cultivadas, juega un papel menor respecto al que se observa *in vivo*. A pesar de estas limitaciones, un importante número de vías específicas y funciones especializadas son expresadas también en cultivo, lo que convierte a los métodos *in vitro* basados en cultivos celulares en valiosas herramientas para su estudio (300).

Todos los métodos *in vitro* basados en cultivos celulares requieren la evaluación previa de la viabilidad celular o citotoxicidad, fundamental para establecer las condiciones de cultivo y corroborar que la concentración de CB propuesta para dicho ensayo no sea citotóxica. Las pruebas de viabilidad celular indican la fracción de células funcionales y metabólicamente activas con respecto a una población inicial, mientras que los ensayos de citotoxicidad determinan la fracción de células muertas (ya sea por apoptosis o necrosis) con respecto a una población inicial. Existe un gran número de ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad reportado en la literatura que comprenden simples técnicas colorimétricas o análisis complejos de células individuales. Con el objetivo de estimar la cantidad de células viables luego de ser enfrentadas a un CB, se han desarrollado ensayos de viabilidad celular que incluyen diversas metodologías con diferentes enfoques, tales como exclusión de colorantes, evaluación de actividad metabólica, ensayos de actividad enzimática, determinación de producción de ATP, pruebas con sustratos específicos de proteasas, evaluación de la permeabilidad de las membranas, etc. (301).

Los ensayos con sales de tetrazolio permiten evaluar la viabilidad, actividad y proliferación celular. Estos procesos se basan en la reducción enzimática de un colorante de tetrazolio mediante enzimas deshidrogenasas localizadas en las mitocondrias y el citoplasma. Una de las pruebas con sales de tetrazolio más empleadas cuando se desea analizar la viabilidad celular y la citotoxicidad de CBs es el ensayo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro). El MTT es un compuesto de color amarillo que exhibe solubilidad en agua y es capaz de ser internalizado por células viables, donde es transformado en un compuesto de color azul-violeta insoluble en agua denominado formazán. La posterior disolución de este

compuesto en dimetilsulfóxido (DMSO) permite su cuantificación mediante espectroscopía, la cual se correlaciona directamente con la actividad enzimática y es directamente proporcional al número de células viables. Una mayor intensidad de color azul-violeta se corresponde con un mayor nivel de viabilidad celular, mientras que la disminución de la intensidad indica un menor número de células viables y la existencia de efecto citotóxico. El ensayo MTT es simple, implica el empleo de una sal de bajo costo, puede realizarse en cultivos en suspensión o monocapa y otorga resultados rápidos y reproducibles (301).

Existen numerosas líneas celulares que pueden emplearse para analizar el potencial antidiabético de un CB, entre las cuales se debe seleccionar la más adecuada dependiendo del mecanismo de acción que se desea evaluar. Como se mencionó previamente, páncreas, hígado, músculo e intestino son los órganos afectados directamente en esta patología, mientras que el tejido adiposo juega un papel clave en la señalización de la insulina. Por lo tanto, las células pancreáticas, hepatocitos, miocitos, enterocitos y adipocitos son principalmente utilizados para determinar la actividad antidiabética de un CB (298). En un estudio, [Semaan y col. \(2018\) \(302\)](#) evaluaron el potencial antidiabético de extractos de *Allophylus cominia* a través de la determinación de la capacidad de absorción de glucosa utilizando las líneas celulares de carcinoma hepatocelular humano HepG2, fibroblastos embrionarios y adipocitos diferenciados de ratón 3T3-L1 y músculo esquelético de rata L6. Los autores reportaron que las células incrementaron su capacidad de absorción de glucosa al ser tratadas con estos extractos, sugiriendo que los CBs presentes favorecerían la homeostasis de la glucosa mediante la disminución del nivel de glucosa en sangre. Por otro lado, el retardo de la absorción de glucosa intestinal representa otro enfoque a través del cual es posible modular la hiperglucemia posprandial (303). En este sentido, [Schreck y Melzig \(2021\) \(304\)](#) analizaron el efecto de extractos de diversas especies de plantas sobre la capacidad de absorción de glucosa utilizando la línea celular epitelial de carcinoma de colon humano Caco-2. A partir de estas determinaciones, los autores pudieron confirmar la actividad antidiabética de la mayoría de los extractos evaluados, ya que fueron capaces de inhibir entre un 40 y 80% la absorción de glucosa. Uno de los posibles mecanismos de acción relacionado con el retardo del transporte de glucosa desde el lumen intestinal hacia el torrente sanguíneo corresponde a la inhibición de la expresión de genes que codifican para los transportadores SGLT1 y GLUT2 presentes en la membrana basolateral de los enterocitos. En un trabajo reciente, [Liu y col. \(2023\) \(305\)](#) determinaron el nivel relativo de transcripción de los genes que codifican para SGLT1 y GLUT2 empleando la línea celular Caco-2, luego de que estas células intestinales sean tratadas con un extracto de *Cinnamomum cassia*. Los autores indicaron una marcada disminución de la expresión génica de estos transportadores de glucosa en las células cultivadas en presencia del extracto frente a las células control, confirmando el efecto hipoglucemiante de los compuestos presentes en dicho extracto. Por otro lado, [Kadan y col. \(2016\) \(306\)](#) utilizaron la línea celular de músculo esquelético de rata L6 para evaluar la translocación de la proteína transportadora GLUT4 hacia la membrana plasmática luego de que las células sean enfrentadas a extractos de albahaca. Considerando que la translocación de GLUT4 en miocitos es un importante mecanismo de la insulina para mantener la homeostasis de la glucosa, un aumento de esta

proteína transportadora en la membrana plasmática sugiere que las células incrementan la sensibilidad a la insulina. En otro trabajo, se analizó el potencial antidiabético de AEs obtenidos a partir de las especies *Pinus nigra* y *Pinus radiata*, y de los CBs  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno y eucaliptol, evaluando el nivel de expresión del gen que codifica para GLUT4 en una línea celular de mioblastos de músculo esquelético de ratón C2C12 (307).

Los CBs también pueden manifestar actividad antidiabética sobre un organismo aumentando la secreción de insulina por parte de las células  $\beta$  pancreáticas. Al respecto, Sriramavaratharajan y col. (2022) (308) utilizaron una línea celular de insulinoma de ratón MIN6 para analizar su capacidad de secreción de insulina en respuesta a una alta concentración de glucosa al ser tratadas con una nanoemulsión preparada con Tween 80, propilenglicol y lecitina de soja conteniendo AE de *Cinnamomum travancoricum*. Los autores informaron un aumento considerable de la secreción de la hormona en las células tratadas frente a las células control, confirmando el potencial antidiabético de los CBs presentes en el AE.

#### 4.1.2.1. Expresión génica de SGLT1 y GLUT2 en células Caco-2

La línea celular Caco-2 es una de las más empleadas en el estudio del efecto antidiabético de CBs ya que representa el modelo *in vitro* más realista del epitelio intestinal humano. Las células Caco-2 son células epiteliales originadas a partir de adenocarcinoma de colon humano que se diferencian espontáneamente (es decir, sin la necesidad de suplementar el medio con factores de diferenciación) desarrollando un fenotipo similar al de los enterocitos cuando son cultivadas durante 2 semanas (18,304,309). Luego de la diferenciación, estas células cultivadas en monocapa presentan morfología polarizada, uniones estrechas y microvellosidades en la membrana apical. Además, expresan diferentes enzimas digestivas, enzimas involucradas en el metabolismo de medicamentos y proteínas transportadoras de membrana. Por otro lado, los coeficientes de permeabilidad en cultivos monocapa de Caco-2 son comparables con los valores de permeabilidad del intestino humano (310). Sin embargo, cuando se emplean cultivos de células Caco-2 deben considerarse algunas limitaciones del modelo. En primer lugar, estas células no son capaces de diferenciarse en todos los tipos de células que están comúnmente presentes en el epitelio intestinal de un organismo, como las células caliciformes que secretan moco. Por otro lado, las células Caco-2 exhiben considerable heterogeneidad, generando subpoblaciones celulares en función del número de pasajes, del medio utilizado y de la composición sérica en el cultivo (310).

Particularmente, las células Caco-2 son empleadas para determinar el potencial antidiabético de un CB a través de ensayos de absorción de glucosa y de expresión de SGLT1 y de transportadores de la familia GLUT involucrados en la difusión facilitada de glucosa (GLUT2 y GLUT5). Los co-transportadores de sodio y glucosa (SGLT, por sus siglas en inglés *Sodium Glucose Linked Transporters*) pertenecen a una amplia familia de transportadores de solutos presentes en la membrana plasmática denominada SLC. En particular, este tipo de transportadores requiere la presencia de iones  $\text{Na}^+$  para permitir la captación de

moléculas de glucosa por parte de la célula. Inicialmente, la unión de dos iones  $\text{Na}^+$  en la parte exterior de la proteína transportadora provoca un cambio conformacional en dicha proteína a partir del cual una molécula de glucosa es capaz de unirse al sitio correspondiente. Luego de que la glucosa se une al transportador, la proteína experimenta un nuevo cambio conformacional mediante el cual se produce el ingreso de dos iones  $\text{Na}^+$  y una molécula de glucosa a la célula al mismo tiempo y en contra del gradiente de concentración. Además de glucosa, los SGLT son capaces de transportar galactosa, fructosa y urea, entre otros solutos (50). Tanto SGLT1 como SGLT2 están estrechamente asociados a DM2 debido a su rol en el proceso de absorción de glucosa. Sin embargo, SGLT1 se encuentra principalmente en la membrana apical de los enterocitos y está involucrado en la absorción de glucosa luego de la digestión de los carbohidratos ingeridos, mientras que SGLT2 se encuentra principalmente en el riñón, más precisamente en el túbulo proximal de los nefrones, y cumple un rol fundamental en el proceso de reabsorción de glucosa (311). Por otro lado, los transportadores GLUT son glicoproteínas que, al igual que los SGLT, pertenecen a la familia SLC. Se encuentran en la membrana plasmática de una gran variedad de células y son capaces de transportar glucosa, galactosa, fructosa y manosa, entre otros solutos, mediante difusión facilitada. Hasta el momento se han identificado 14 transportadores GLUT, los cuales cumplen funciones importantes en la disminución de la hiperglucemia a través de diferentes mecanismos según el tejido en el cual se expresan. Entre ellos, los transportadores que están más asociados al desarrollo de DM2 son GLUT2 y GLUT4, ya que están involucrados en el proceso de homeostasis de la glucosa. El transportador GLUT2 se encuentra principalmente en la membrana basolateral de los enterocitos y transporta moléculas de glucosa desde el interior de la célula hacia el sistema porta, mientras que GLUT4 se expresa principalmente en miocitos y adipocitos donde cumplen la función de transportar moléculas de glucosa hacia el interior de la célula (50).

El transportador SGLT1 es una proteína de alta afinidad, baja capacidad y transporte activo, mientras que el transportador GLUT2 es una proteína de baja afinidad, alta capacidad y transporte facilitado. Se ha observado que cuando la concentración de glucosa luminal es lo suficientemente elevada, el transportador SGLT1 expresado en enterocitos se satura y GLUT2 puede ser translocado desde vesículas citosólicas preformadas hacia la membrana apical de la célula intestinal, incrementando la capacidad de absorción de glucosa y promoviendo la hiperglucemia. A su vez, la RI en DM2 puede conducir a que dicha translocación se encuentre menos regulada, aumentando aún más la cantidad de GLUT2 en la membrana apical (50).

Cuando se propone el empleo de células Caco-2 para analizar la expresión de SGLT1 y GLUT2 se deben considerar ciertas diferencias entre el modelo y lo que ocurre en los enterocitos. Generalmente, la expresión de SGLT1 en Caco-2 es menor respecto a la expresión en enterocitos humanos, y esta diferencia es más o menos significativa dependiendo de la sublínea clonal. Por otro lado, la glucosa no es capaz de inducir la translocación de proteínas transportadoras desde el interior de la célula Caco-2 hacia su membrana apical como ocurre en los enterocitos. Finalmente, algunos fenómenos relacionados con la señalización de insulina que ocurren naturalmente en enterocitos no son observados en células Caco-2 (310).

#### 4.1.3. Digestión gastrointestinal *in vitro* de coacervados complejos

La digestión es un proceso complejo mediante el cual, luego de la ingesta de un alimento, se proporcionan nutrientes al organismo y se liberan moléculas en el TGI que pueden tener efectos beneficiosos o perjudiciales para la salud. Comprender el destino de los alimentos en el TGI es importante, no sólo para conocer su efecto sobre la salud, sino también para diseñar sistemas de encapsulación que potencien los efectos beneficiosos de los diferentes CBs. El destino de los alimentos en el TGI puede estudiarse utilizando varios métodos o modelos, incluyendo modelos *in vitro* estáticos o dinámicos, diversos cultivos celulares, modelos *ex vivo*, modelos animales y ensayos clínicos (312,313).

Dentro de los modelos de digestión gastrointestinal *in vitro* se encuentran los de tipo estático y dinámico. Los métodos estáticos comprenden las técnicas más simples e incluyen dos o tres pasos de digestión (oral, gástrica e intestinal) cuyos productos permanecen en gran medida inmóviles en un solo biorreactor estático. Estos métodos simulan un número limitado de parámetros de digestión fisiológica. Son muy utilizados, pero se llevan a cabo siguiendo protocolos que difieren unos de otros en las condiciones experimentales (*e.g.*, pH, duración de los diferentes pasos, cantidad de enzimas digestivas y bilis, etc.) haciendo imposible la comparación de resultados entre estudios (312). Por tal motivo, a través de la red internacional *COST Action Infogest* se ha propuesto un protocolo de consenso que permite estandarizar la metodología y obtener resultados comparables con otros trabajos (314). Los modelos estáticos son particularmente útiles cuando se desea evaluar la digestión en pasos específicos, pero proporcionan información limitada en cuanto al proceso de digestión total, donde es necesario incluir la fermentación colónica. De este modo, los métodos estáticos se pueden emplear para evaluar la influencia de las condiciones de digestión y para estudiar el efecto positivo o negativo de la estructura, composición y procesamiento de alimentos sobre la bioaccesibilidad de nutrientes y CBs, a fin de establecer el valor nutricional de los alimentos y mejorar su formulación o diseño. En general, los modelos estáticos se utilizan para estudios de digestión en alimentos simples e ingredientes aislados o purificados. Son métodos relativamente reproducibles, rápidos, simples y económicos. Sin embargo, a pesar de su potencial y su amplia aplicabilidad, ninguno de los modelos estáticos reproduce el entorno dinámico del TGI. En primer lugar, carecen de la barrera mucosa compleja con todos sus procesos reguladores, de la complejidad de los movimientos peristálticos, del vaciado gástrico, de los cambios continuos en el pH y las tasas de flujo de secreción, de los efectos de la microflora intestinal y del metabolismo hepático. Además, tanto las enzimas como las SB se agregan al inicio y permanecen constantes durante todo el experimento (313).

Debido a las limitaciones de los modelos estáticos, se han desarrollado modelos *in vitro* de digestión dinámicos. En ellos, las condiciones dentro de los diferentes compartimentos cambian con el tiempo para simular los procesos de digestión que ocurren *in vivo*. Los modelos de digestión dinámicos generalmente poseen varias secreciones digestivas diferentes que se agregan a los compartimentos del modelo a lo largo del tiempo. Esta adición puede seguir una velocidad de secreción constante, seguir un patrón preprogramado permitiendo que la velocidad cambie con el tiempo o programarse para cambiar en

respuesta a otros parámetros, como el volumen de llenado. En los modelos dinámicos, es posible controlar el pH en tiempo real para adecuar la velocidad de adición de HCl, permitiendo que la acidificación del alimento dentro del compartimento gástrico siga una curva predeterminada. Cuando estos métodos incorporan un paso duodenal, el pH del quimo se neutraliza en dicha etapa mediante la adición controlada de solución de bicarbonato de sodio, y se agregan secreciones biliares y pancreáticas. Además, los compartimentos intentan imitar las diferentes formas, tamaños y orientaciones de los órganos del TGI humano. Finalmente, los alimentos son sometidos a diferentes fuerzas físicas, como también a la presión ejercida por los movimientos peristálticos en el estómago e intestino. Así, la geometría de algunos modelos dinámicos ha sido diseñada de tal manera que simule estas fuerzas físicas (315). Existen diversos modelos de digestión dinámicos, los cuales se clasifican en mono o multicompartimentados. Entre ellos, los más utilizados son el modelo gástrico dinámico, el simulador gástrico humano, el modelo gastrointestinal TNO, el sistema DIDGI y el sistema SHIME. Cada sistema presenta estructuras, mecanismos y limitaciones propias del método, con ventajas y desventajas a partir de las cuales es posible seleccionar sus principales aplicaciones. Es importante remarcar que ninguno de los modelos dinámicos desarrollados hasta el momento ha logrado imitar en su totalidad los procesos que ocurren *in vivo*, particularmente con relación al control hormonal y nervioso, los mecanismos de retroalimentación, la actividad de las células de la mucosa, la complejidad de los movimientos peristálticos y la participación del sistema inmunitario y microbiota locales (315,316).

Además de los modelos estáticos y dinámicos, existen cultivos celulares, tales como el cultivo en monocapa de células Caco-2, utilizadas para estudios de absorción de nutrientes y medicamentos. Son particularmente empleadas ya que, como ya se ha mencionado, desarrollan microvellosidades y uniones estrechas similares a las de los enterocitos del intestino delgado. Por otro lado, las células HT-29 de carcinoma de colon humano también son empleadas en estos estudios debido a que son capaces de secretar mucina y formar una capa de mucosa bajo determinadas condiciones. De este modo, son útiles cuando se desea imitar la capa mucosa del intestino delgado (313).

Por último, los métodos de digestión *in vivo* realizados en animales pueden resultar apropiados en algunas situaciones particulares. Sin embargo, los costos elevados, la mayor complejidad de los protocolos, las instalaciones requeridas y los aspectos éticos limitan considerablemente su aplicación en estudios de digestión gastrointestinal (312).

En la actualidad existen numerosos estudios de digestión gastrointestinal *in vitro* que evalúan el proceso de digestión de diferentes alimentos o medicamentos, la influencia de las interacciones entre los componentes de la matriz alimentaria sobre dicho proceso y la liberación de CBs a partir de diferentes sistemas de encapsulación (18,317). Con respecto a la digestión gastrointestinal *in vitro* de OVA y de agregados de OVA (obtenidos mediante tratamiento térmico bajo condiciones controladas de pH, temperatura, tiempo y concentración), se observó que todos los agregados proteicos fueron más susceptibles

a la digestión causada por enzimas gastrointestinales en comparación con la OVA en su forma nativa (118). Mas del 60% de OVA permaneció intacta luego de la digestión gástrica y más del 37% después de la digestión intestinal. Además, los agregados obtenidos presentaron morfología lineal, lineal ramificada, esférica y esférica aglomerada. Para todos ellos la digestión fue total, con excepción de los agregados esféricos aglomerados que evidenciaron un 30% de monómeros aún después de la digestión intestinal. A partir de estos resultados, los autores sugirieron que la modificación estructural de la proteína (desnaturalización y agregación) inducida por el tratamiento térmico aumentaría la accesibilidad de los sitios de clivaje de las enzimas digestivas. Además, otros autores observaron que OVA resultó resistente a la acción de la pepsina a valores de pH iguales o superiores a 2,0 (318). En estas condiciones, la proteína intacta y su principal producto de degradación (un fragmento de 40 kDa resultante de la escisión del extremo N-terminal) persistieron durante al menos 2 h de digestión, aunque también se observó la presencia de un fragmento de 10 kDa. A este pH la proteína adoptaría una conformación muy estable, desprovista de interacciones de estructura terciaria, resistiendo la acción de la pepsina. Posteriormente, la proteína se sometió a una digestión con tripsina y quimotripsina. En este caso, los autores hallaron que tanto la OVA como su fragmento de 40 kDa resistieron la hidrólisis durante al menos 60 min. En otro trabajo, se evaluó la digestión con pepsina de EW conteniendo OVA, ovotransferrina y lisozima, durante 10 min a pH 1,5 (319). Los autores observaron fragmentos de diferente PM (12, 14, 17, 27 y 40 kDa), atribuidos a la digestión de OVA. Además, EW fue tratada térmicamente a 60 y 80°C y, posteriormente, sometida al proceso de digestión bajo las mismas condiciones. Se pudo observar que la digestibilidad de las proteínas no fue afectada por el calentamiento a 60°C. Sin embargo, el calentamiento a 80°C aumentó significativamente la susceptibilidad de OVA a la digestión enzimática, ya que no se hallaron fragmentos proteicos luego de la digestión. Los autores sugieren que el tratamiento térmico a elevada temperatura resultaría en un aumento de la digestibilidad de las proteínas de EW debido a cambios estructurales inducidos por calor. De este modo, los sitios de clivaje que se encontraban inaccesibles para las enzimas digestivas estarían más expuestos luego de dicha modificación estructural.

Aunque existen diversos trabajos que analizan la digestión *in vitro* de OVA y EWP, la mayoría de ellos sigue su propia metodología estableciendo parámetros experimentales de forma independiente, lo que conlleva a que la comparación de resultados entre los estudios sea compleja o inadecuada. En un trabajo más reciente, Visentini y col. (2020) (320) evaluaron la digestión gastrointestinal *in vitro* de OVA y de nanopartículas de OVA obtenidas mediante tratamiento térmico a través de un modelo secuencial conforme a un protocolo de consenso ampliamente aceptado por la comunidad científica. Los autores indicaron que a partir de la digestión de OVA con pepsina y pancreatina se obtuvieron fragmentos proteicos de 20 y 40 kDa. Sin embargo, cuando las nanopartículas de OVA fueron sometidas al mismo proceso de digestión *in vitro* no se observaron fragmentos proteicos, indicando la presencia de péptidos pequeños o la hidrólisis total de la proteína. En consistencia con lo mencionado anteriormente, los resultados sugieren que las



modificaciones estructurales que ocurren durante el tratamiento térmico de OVA incrementarían la accesibilidad de las enzimas digestivas a sus sitios de clivaje.

Por otro lado, la digestión *in vitro* de coacervados complejos ha sido ampliamente estudiada en las últimas décadas. Al respecto, se obtuvieron coacervados complejos de aislado de proteína de semilla de chía y mucílago de semilla de chía con el objetivo de evaluar su comportamiento frente a un proceso de digestión *in vitro* (321). Los autores observaron que las proteínas no sufrieron hidrólisis en la fase oral de la digestión, pero fueron marcadamente hidrolizadas en péptidos de bajo PM por acción de la pepsina durante la fase gástrica. Sin embargo, al analizar la digestión gástrica del aislado proteico en ausencia del PS (a modo de control) se evidenció mayor susceptibilidad de las proteínas a la pepsina. Finalmente, cuando el coacervado complejo fue sometido a digestión intestinal las proteínas fueron hidrolizadas en péptidos aún más pequeños debido a la acción de la pancreatina y, nuevamente, el aislado proteico en ausencia del PS resultó más susceptible a la enzima bajo condiciones intestinales. En otro estudio, Wang y col. (2017) (322) desarrollaron coacervados complejos de lactoferrina y alginato de sodio, los cuales fueron sometidos a un protocolo de consenso internacional de digestión *in vitro*. Los autores informaron que la fase oral no provocó cambios en la estructura de la lactoferrina presente en el coacervado. Sin embargo, el 73% de la proteína que formaba parte del coacervado complejo fue degradada a péptidos pequeños de PMs cercanos a 10 kDa en la fase gástrica. Por último, se evidenció hidrólisis completa de la lactoferrina presente en el coacervado luego de la fase intestinal. Cabe destacar que, al analizar la digestión de la lactoferrina sin la protección del PS, el total de la proteína fue hidrolizada a péptidos pequeños de PMs cercanos a 10 kDa luego de la digestión gástrica. A partir de estos resultados, fue posible hipotetizar que el alginato de sodio protegería a la proteína de la degradación enzimática gracias a la formación de complejos insolubles, bloqueando algunos de los sitios de clivaje de la pepsina. Además, los autores compararon dos relaciones másicas de biopolímeros e informaron que la protección de la lactoferrina por parte del alginato de sodio luego de la digestión gástrica fue mayor para la relación 8:1 que para la relación 16:1 (proteína-PS). En el primer caso, los sitios sensibles a la proteólisis estarían más bloqueados por las moléculas de alginato. Por otro lado, la mayor viscosidad del coacervado obtenido en una relación 8:1 disminuiría la difusión de la pepsina y de su sustrato en la matriz afectando la acción enzimática.

#### 4.1.3.1. Actividad biológica de digestos

Cuando un CB es incorporado en un sistema de encapsulación con el objetivo de que sea vehiculizado a través del TGI y liberado de forma controlada sin que pierda el efecto biológico deseado, es fundamental analizar el impacto de la digestión gastrointestinal sobre la estructura del sistema y la bioaccesibilidad del compuesto encapsulado (323). Además, es importante comprobar la actividad biológica del sistema luego de cada fase de la digestión y obtener, de este modo, información sobre el comportamiento del CB bajo las diferentes condiciones (324). Para analizar todos estos aspectos, los modelos de digestión gastrointestinal

*in vitro* constituyen herramientas experimentales simples y económicas de gran utilidad. En un trabajo, [Li y col. \(2020\) \(325\)](#) propusieron la incorporación de isoquercetina en coacervados complejos de gelatina y pectina con el objetivo de proteger su propiedad hipoglucémica luego de atravesar el TGI. Al evaluar la capacidad de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa, el CB en su forma libre evidenció elevada actividad inhibitoria (96,8%). Sin embargo, cuando la isoquercetina libre fue sometida a un proceso de digestión *in vitro*, dicha actividad disminuyó considerablemente hasta un valor de 41,7%. Según lo previsto, la capacidad de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa de isoquercetina cargada en el coacervado resultó de 78,4% luego del proceso de digestión, es decir, la actividad inhibitoria del CB fue significativamente mayor cuando se encontró incorporado en el coacervado. De este modo, los autores resaltaron que el sistema biopolimérico desarrollado otorgaría a la isoquercetina protección eficiente frente a la descomposición inducida por enzimas digestivas y el medio ácido del entorno gástrico.

El efecto de la digestión sobre la bioactividad de compuestos incorporados en coacervados complejos ha sido escasamente estudiado hasta el momento. En contraste, existen numerosos trabajos que han analizado dicho efecto cuando el CB fue encapsulado en otros sistemas biopoliméricos. Al respecto, [Vulić y col. \(2019\) \(326\)](#) encapsularon un extracto del residuo industrial de pimienta roja en aislado de proteína de suero con el objetivo de evaluar la actividad biológica de los CBs luego de cada paso del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. A partir de los resultados obtenidos se observó que, en general, la actividad antioxidante del extracto encapsulado disminuyó luego de la digestión gástrica respecto a la condición inicial antes de la digestión, pero aumentó nuevamente bajo condiciones intestinales. Adicionalmente, se determinó la capacidad de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa del extracto encapsulado antes y después de la digestión gástrica e intestinal. La mayor actividad inhibitoria fue obtenida antes del proceso de digestión, mientras que la fase gástrica evidenció la menor inhibición enzimática. Bajo condiciones intestinales el extracto encapsulado exhibió considerable actividad inhibitoria, la cual resultó significativamente mayor que la actividad obtenida luego de la digestión gástrica. Finalmente, se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto encapsulado antes y después de la digestión gástrica e intestinal. A partir de los resultados obtenidos, se observó que la actividad disminuyó considerablemente luego de la digestión gástrica respecto a la condición inicial (sin digerir). Bajo condiciones intestinales, la actividad antiinflamatoria del extracto encapsulado fue significativamente mayor que la actividad exhibida en la fase gástrica. Sin embargo, la actividad antiinflamatoria antes del proceso de digestión resultó notablemente mayor que la actividad determinada en ambos pasos de la digestión *in vitro*. Por otro lado, [Ferreira Santos y col. \(2021\) \(327\)](#) evaluaron el efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la actividad antioxidante de un extracto de corteza de pino rico en compuestos fenólicos en su forma libre y encapsulado en maltodextrina mediante el método de secado *spray*. Para ello, determinaron el poder reductor de iones  $\text{Fe}^{+3}$ , la capacidad de captación de radicales DPPH y el nivel intracelular de ROS en células Caco-2. En primer lugar, el extracto libre disminuyó considerablemente su poder reductor en todas las fases de la digestión (oral, gástrica e intestinal) y su capacidad para captar radicales bajo condiciones gástricas e intestinales,

respecto al extracto libre sin digerir. Sin embargo, cuando el extracto se encontró encapsulado el poder reductor en la fase oral se mantuvo aproximadamente igual que el exhibido por el extracto encapsulado antes del proceso de digestión, mientras que en la fase gástrica evidenció una actividad significativamente mayor que el extracto libre bajo las mismas condiciones. En relación con la capacidad de captación de radicales DPPH, el extracto encapsulado exhibió menor reducción de la actividad antioxidante que el extracto libre luego de la digestión gástrica e intestinal. Por otro lado, las células Caco-2 sometidas a estrés oxidativo exógeno incubadas en presencia del extracto libre y encapsulado disminuyeron considerablemente la producción de ROS respecto a las células control. Sin embargo, luego de la digestión gastrointestinal *in vitro* de ambos extractos (libre y encapsulado) se observó una menor actividad antioxidante. Los extractos digeridos presentaron menor efecto preventivo en cuanto a la generación intracelular de ROS que los extractos sin digerir, aunque el extracto encapsulado evidenció un nivel de ROS significativamente menor luego del proceso de digestión respecto al extracto libre bajo la misma condición, sugiriendo una función protectora de la maltodextrina sobre los CBs. En otro trabajo, [de Alencar y col. \(2023\) \(328\)](#) estudiaron el efecto del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* utilizando un modelo de tipo dinámico sobre la actividad antioxidante y antiinflamatoria de un extracto de propóleo rojo en su forma libre y encapsulado en goma arábica mediante liofilización. En general, la digestión gastrointestinal *in vitro* disminuyó la capacidad antioxidante del extracto tanto en su forma libre como encapsulada, respecto del extracto libre sin digerir. Sin embargo, la encapsulación en goma arábica potenció el efecto antioxidante de los CBs luego del proceso de digestión. Además, los autores evaluaron la activación de NF- $\kappa$ B y la liberación de TNF- $\alpha$  en cultivos de macrófagos incubados en presencia del extracto libre y encapsulado luego de la digestión *in vitro*. En ambos ensayos de actividad antiinflamatoria, el extracto libre digerido exhibió mayor bioactividad que el extracto encapsulado digerido.

## 4.2. OBJETIVOS

Los objetivos específicos del capítulo son:

**Objetivo 1:** Estudiar y caracterizar la formación de coacervados proteína-polisacárido que encapsulan aceites esenciales.

**Objetivo 2:** Evaluar la expresión de genes relacionados con diabetes mellitus tipo 2 en células Caco-2 incubadas en presencia de aceites esenciales encapsulados.

**Objetivo 3:** Evaluar la digestibilidad y bioaccesibilidad de aceites esenciales encapsulados en coacervados proteína-polisacárido mediante un método estático de digestión gastrointestinal *in vitro*.

**Objetivo 4:** Evaluar el efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la actividad biológica de aceites esenciales encapsulados.

### 4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.3.1. Materiales

Para los estudios desarrollados en el presente capítulo se utilizó clara de huevo (EW) industrial, aceite esencial de tomillo (TOM) y aceite esencial de orégano (ORE) descritos en la [Sección 3.3.1](#). Además, se utilizó pectina de alto metoxilo (PAM) comercial extraída de cáscara de cítricos con grado de esterificación de  $68,0 \pm 2,0\%$ , la cual fue provista por Cargill (Argentina). La composición de PAM en base seca según datos del fabricante fue 87,0% de azúcares, 11,0% de humedad y 2,0% de cenizas, incluyendo  $\text{Na}^+$  (480 mg/100 g),  $\text{K}^+$  (160 mg/100 g),  $\text{Ca}^{+2}$  (200 mg/100 g),  $\text{Mg}^{+2}$  (30 mg/100 g), and  $\text{Fe}^{+2}$  (2 mg/100 g). El contenido de ácido galacturónico resultó 74% (valor informado por el fabricante) y el PM resultó de 189 kDa, el cual fue determinado según [Hosseini y col. \(2013\) \(329\)](#) y [Masuelli \(2011\) \(330\)](#). Los reactivos analíticos fueron suministrados por Cicarelli (Argentina), Biopack (Argentina) y Merck (Alemania).

#### 4.3.2. Obtención de coacervados EWPn-AE-PAM

Con el objetivo de obtener coacervados EWPn-AE-PAM (EWPn-TOM-PAM y EWPn-ORE-PAM), una solución de PAM 2% m/v fue adicionada a una solución de nanocomplejo EWPn-AE (EWPn-TOM o EWPn-ORE, según corresponda) a pH 11,4 (cuya metodología de obtención se describió en la [Sección 3.3.4](#)), en una relación 1:1 (EWPn-AE:PAM) en masa y bajo agitación magnética (169). Como coacervado control, la misma solución de PAM fue adicionada a una solución del control EWPn a pH 11,4, siguiendo el mismo procedimiento ([Sección 3.3.4](#)). Los coacervados EWPn-AE-PAM y el control EWPn-PAM fueron mantenidos a 4°C durante toda la noche con el objetivo de alcanzar la estabilización.

#### 4.3.3. Caracterización de coacervados EWPn-AE-PAM

##### 4.3.3.1. Comportamiento de fase

El comportamiento de fase de los coacervados EWPn-AE-PAM obtenidos previamente fue evaluado mediante mediciones de ABS, potencial  $\zeta$  (mV) y apariencia visual de las mezclas de biopolímeros (232,331). Para ello, las muestras fueron diluidas con agua desionizada de manera de obtener una concentración de proteína de 0,1% m/v y una concentración de PAM de 0,05% m/v. Luego, el pH de las soluciones obtenidas fue corregido a diferentes valores en un rango de 2,0 a 7,0, incrementándose este cada 0,5 unidades. Inmediatamente después del procedimiento mencionado, los valores de ABS (indicativos de la turbidez de las muestras) fueron registrados a 400 nm utilizando un espectrofotómetro UV-vis Jenway 7305 (Reino Unido), y el potencial  $\zeta$  fue determinado utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) ejecutado bajo el *software* Zetasizer versión 7.12. Además, la apariencia visual de las muestras fue registrada a 0 y 24 h de su preparación mediante una cámara fotográfica

Cyber-shot 12.1 mpx (Sony, Estados Unidos), para lo cual fueron mantenidas a 25°C durante todo el ensayo. Como controles, los nanocomplejos EWPn-AE, EWPn y PAM fueron evaluados siguiendo la misma metodología. Las determinaciones de ABS y potencial  $\zeta$  fueron llevadas a cabo a 25°C y se realizaron por triplicado.

#### 4.3.3.2. Microscopía

Las características estructurales de los coacervados EWPn-AE-PAM y del control EWPn-PAM fueron examinadas utilizando un microscopio óptico Leica DM E (Austria) equipado con lentes objetivos de 10x, 40x y 100x y una cámara digital Leica EC3 (Austria). Para ello, las muestras fueron diluidas con agua desionizada, de forma de obtener una concentración de proteína de 0,04% m/v, y llevadas a pH 3,0.

Por otro lado, los coacervados EWPn-AE-PAM y el control EWPn-PAM fueron analizados por AFM (21). Las imágenes fueron obtenidas por adsorción de 2  $\mu$ L de muestra sobre la superficie de mica exfoliada (1  $\text{cm}^2$ ) en cámara de vacío, a valor de pH de coacervación determinado por el estudio de comportamiento de fase y concentración de proteína 0,0002% m/v, utilizando un microscopio Agilent 5400 (Estados Unidos) en modo intermitente. Para ello, se utilizaron cantilevers recubiertos con aluminio (OPUS modelo: 160AC-NA), de 160  $\mu$ m de longitud, radio de punta menor a 7 nm,  $40 \pm 2$   $\mu$ m de ancho medio,  $4 \pm 0,5$   $\mu$ m de grosor, altura de la punta de 14  $\mu$ m, fuerza del resorte de 26  $\text{N m}^{-1}$  y frecuencia de oscilación de 280 kHz. Las muestras fueron escaneadas a 1 línea  $\text{s}^{-1}$ . Las imágenes topográficas fueron obtenidas utilizando el *software* Gwyddion 2.44.

#### 4.3.4. Modulación de la expresión génica en células Caco-2

##### 4.3.4.1. Cultivo celular

Las células Caco-2 fueron amablemente proporcionadas por el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, CONICET-UNLP-CIC) y cultivadas en DMEM (Gibco BRL Life Technologies, Estados Unidos) conteniendo 10% v/v de suero fetal bovino (PAA Laboratories, GmbH, Austria), 1% v/v de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL Life Technologies, Estados Unidos) y 1% v/v de una solución de penicilina-estreptomicina (100  $\text{U mL}^{-1}$  de penicilina y 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de estreptomicina en 0,85% de solución de NaCl). Las células fueron incubadas a 37°C en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% y un 95% de humedad relativa. Luego de 21 días de incubación, las células estuvieron disponibles para ser sembradas durante 48 h en DMEM, previo a cada ensayo.

#### 4.3.4.2. Viabilidad celular

Los ensayos en cultivos de células Caco-2 exigen que, previamente, se determine la viabilidad celular a fin de corroborar que los sistemas a analizar no presenten efecto citotóxico en las concentraciones propuestas y, de este modo, establecer las condiciones óptimas de cultivo. El ensayo de viabilidad celular se basó en la capacidad de las células viables de internalizar el MTT soluble en agua (amarillo) y transformarlo en un compuesto de color azul-violeta insoluble en agua denominado formazán. La posterior disolución de formazán en DMSO permite su cuantificación mediante espectroscopía a 550 nm, siendo la ABS directamente proporcional al número de células viables.

El ensayo de viabilidad celular fue llevado a cabo siguiendo la metodología de [Ontawong y col. \(2021\) \(332\)](#), con algunas modificaciones. En primer lugar, las células Caco-2 fueron sembradas en placa de 24 pocillos (densidad  $5 \times 10^4$  células/pocillo). Posteriormente, se adicionó a cada pocillo un volumen de 500  $\mu\text{L}$  de solución (diluciones 1/10, 1/20 y 1/200 en DMEM detalladas en la [Tabla 9](#)) de nanocomplejos EWPn-AE, coacervados EWPn-AE-PAM, el control EWPn, el coacervado control EWPn-PAM y un control de etanol. Las placas se incubaron durante 72 h a  $37^\circ\text{C}$ , en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% y un 95% de humedad relativa. Una vez transcurrido el tiempo correspondiente, las células fueron lavadas con 500  $\mu\text{L}$  de PBS ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,144 g  $\text{L}^{-1}$ , NaCl 9,00 g  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  g  $\text{L}^{-1}$ ) y se adicionó un volumen de 400  $\mu\text{L}$  de MTT (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 1 mg  $\text{mL}^{-1}$ . Las células fueron incubadas durante 2 h a  $37^\circ\text{C}$ , en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% y un 95% de humedad relativa. Seguidamente, se removió el MTT y se adicionó un volumen de 500  $\mu\text{L}$  de DMSO. Finalmente, la ABS del formazán diluido en DMSO fue determinada a 550 nm utilizando un espectrofotómetro Synergy HT (BioTek Instruments Inc., Estados Unidos). Por otro lado, el mismo volumen de DMEM en reemplazo de la muestra fue adicionado para la preparación del blanco. Las determinaciones de ABS fueron llevadas a cabo a  $25^\circ\text{C}$  y se realizaron por triplicado.

La viabilidad celular fue calculada como:

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{DO_{\text{muestra}}}{DO_{\text{blanco}}} \quad (\text{Ecuación 21}),$$

donde  $DO_{\text{muestra}}$  y  $DO_{\text{blanco}}$  corresponden a la densidad óptica de la muestra y del blanco, respectivamente.

**Tabla 9.** Valores de concentración de EWPn, AE, PAM y etanol, expresados en  $\text{mg mL}^{-1}$ , correspondientes a cada dilución de los sistemas.

Dilución	Concentración de EWPn	Concentración de AE	Concentración de PAM	Concentración de etanol
	(mg mL <sup>-1</sup> )			
<b>1/10</b>	1,818	0,115	1,000	4,250
<b>1/20</b>	0,909	0,058	0,500	2,125
<b>1/200</b>	0,091	0,006	0,005	0,213

#### 4.3.4.3. Tratamiento de las células

Con el objetivo de evaluar la expresión de SGLT1 y GLUT2, las células Caco-2 fueron sembradas en placa de 24 pocillos (densidad  $5 \times 10^4$  células/pocillo). Posteriormente, se adicionó a cada pocillo un volumen de 500  $\mu\text{L}$  de DMEM y se incubó durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$ , en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% y un 95% de humedad relativa. Una vez transcurrido el tiempo correspondiente, se removió el DMEM y se adicionó un volumen de 500  $\mu\text{L}$  de solución (dilución 1/25 en DMEM; 0,727  $\text{mg mL}^{-1}$  de EWPn, 0,046  $\text{mg mL}^{-1}$  de AE, 0,400  $\text{mg mL}^{-1}$  de PAM y 1,700  $\text{mg mL}^{-1}$  de etanol) de nanocomplejos EWPn–AE, coacervados EWPn–AE–PAM, el control EWPn, el coacervado control EWPn–PAM y un control de etanol. Para evaluar la expresión génica a diferentes tiempos de incubación, una placa se incubó durante 6 h y otra placa, conteniendo las mismas muestras, se incubó durante 24 h. Luego, se removió el DMEM y las células se lavaron con PBS. Se adicionó un volumen de 50  $\mu\text{L}$  de tripsina y se incubó durante 10 min. Para detener la reacción enzimática, se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de DMEM. La suspensión de células se colocó en tubo Eppendorf y se centrifugó a 10.000 g durante 10 min. Se descartó el sobrenadante de DMEM y el *pellet* se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de PBS. Finalmente, un volumen de 400  $\mu\text{L}$  de *buffer* de preservación RNA later RNA Stabilization Reagent (QIAGEN GmbH, Alemania) fue adicionado a la solución. Por otro lado, el mismo volumen de DMEM en reemplazo de la muestra fue adicionado para la preparación del blanco. Las muestras se mantuvieron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta el momento de ser examinadas.

#### 4.3.4.4. Expresión génica de SGLT1 y GLUT2

Con el objetivo de evaluar la expresión de SGLT1 y GLUT2, el ARN total de las células Caco-2 cultivadas en la [Sección 4.3.4.3](#) fue aislado utilizando el reactivo Bio-Zol (PBL Biomedical Laboratories, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se determinó utilizando un espectrofotómetro de microvolúmenes Nano Drop ND-1000 (Thermo Scientific, Estados Unidos). La integridad del ARN se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, el

ARN fue tratado con DNasa (RQ1 RNase-Free DNase, Promega Corporation, Estados Unidos) y transcripto inversamente con la transcriptasa reversa Hi-Fi RT (Applied Biosystem, Estados Unidos), según las condiciones sugeridas por el fabricante.

La PCR cuantitativa (qPCR, por sus siglas en inglés *Quantitative Polymerase Chain Reaction*) en tiempo real se llevó a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ L usando el kit iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Estados Unidos) en un equipo Bio-Rad (Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de la amplificación fueron: 3 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 20 s a 95°C y 20 s a 60°C. La especificidad del proceso de amplificación se verificó con la curva de disociación al final del ciclo de PCR (333).

Las secuencias de los oligos utilizados para cada gen se detallan a continuación:

HsSGLT1	<i>Forward</i>	AAGGTTGTTTATCCTGGTGCTG
HsSGLT1	<i>Reverse</i>	TGAAATCCCAATCAGAAGTCCT
HsGLUT2	<i>Forward</i>	TGAACTGCCCACAATCTCATACT
HsGLUT2	<i>Reverse</i>	ATACAGACAGGGACCAGAGCAT
Hs $\beta$ -actin	<i>Forward</i>	GCGAGAAGATGACCCAGA
Hs $\beta$ -actin	<i>Reverse</i>	CAGAGGCGTACAGGGATA

Los niveles de expresión de los genes SGLT1 y GLUT2 fueron normalizados a los del gen de actina (gen normalizador) respecto a las células del blanco (el mismo volumen de DMEM en reemplazo de la muestra). Los niveles relativos de transcripto se calcularon mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  y se expresaron como expresión relativa (334).

#### 4.3.5. Obtención de polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub>

Con el objetivo de obtener polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub> (EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub> y EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub>), el pH del medio acuoso de los coacervados EWPn–AE–PAM obtenidos previamente fue ajustado utilizando HCl 2 M según la evaluación del comportamiento de fase, para facilitar el fenómeno de separación de fases asociativas, conduciendo a la formación de *pellet* rico en coacervados complejos EWPn–AE–PAM (169). Las muestras fueron mantenidas a 4°C durante toda la noche y, posteriormente, fueron centrifugadas a 2.000 g durante 1 h y a 25°C. El sobrenadante y el *pellet* obtenidos fueron separados y mantenidos a -20°C hasta su posterior utilización.

Finalmente, el proceso de liofilización del *pellet* de los coacervados EWPn–TOM–PAM y EWPn–ORE–PAM fue llevado a cabo a -80°C y 30 mT durante 48 h utilizando un equipo Flexi–Dry MP



(FTS Systems, Inc., Estados Unidos). El mismo procedimiento fue realizado para el control EWPn–PAM. Los polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub> y el polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub> fueron conservados en recipientes herméticamente cerrados a -20°C hasta ser requeridos para futuros análisis.

#### 4.3.5.1. Recuperación de sólidos

La recuperación de sólidos (RS), expresada como %, se define como la relación entre la masa de polvo obtenida al final del proceso de liofilización y la masa de sólidos totales presentes en la mezcla inicial, y fue calculada como (36):

$$RS = \frac{M_P}{M_{ST}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 22}),$$

donde  $M_P$  y  $M_{ST}$  corresponden a las masas de polvo obtenido luego de la liofilización y de sólidos totales presentes en la mezcla inicial, respectivamente.

Las determinaciones de RS de los polvos EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub> y EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub> y del polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub> se llevaron a cabo a 25°C y se realizaron por triplicado.

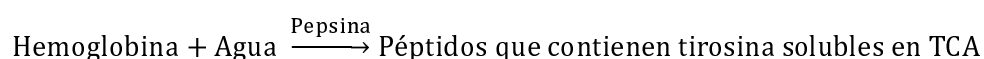
#### 4.3.6. Digestión gastrointestinal *in vitro* de polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub>

Con el objetivo de evaluar la digestibilidad de los polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub> obtenidos previamente y la subsecuente liberación de AE, se llevó a cabo un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* ampliamente aceptado, con algunas modificaciones (320,335).

##### 4.3.6.1. Actividad enzimática

La actividad enzimática de la pepsina gástrica y de la tripsina de pancreatina fue determinada según lo recomendado por Minekus y col. (2014) (314).

**Pepsina gástrica:** El ensayo para determinar la actividad de la pepsina de mucosa gástrica porcina se basó en la siguiente reacción:



según la cual una unidad de enzima produce una variación de ABS a 280 nm de 0,001 min<sup>-1</sup> a pH 2,0 y 37°C, medido como productos solubles en ácido tricloroacético (TCA, por sus siglas en inglés *Trichloroacetic Acid*). Para realizar el ensayo, se utilizó como sustrato enzimático hemoglobina (H2500, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 2% m/v a pH 2,0. En primer lugar, se preparó una solución *stock* de pepsina de mucosa gástrica porcina (P7000, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 1 mg mL<sup>-1</sup> disolviendo la

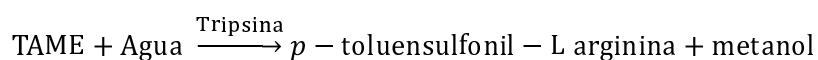
enzima sólida en NaCl 150 mM-Tris 10 mM ajustado a pH 6,5 y se mantuvo a 4°C. Antes de comenzar con el ensayo, se prepararon entre 5 y 10 concentraciones de pepsina en HCl 10 mM.

Se colocó un volumen de 1.000 µL de hemoglobina en un tubo Eppendorf y se incubó en estufa a 37°C por 3-4 min para alcanzar una temperatura homogénea en el sustrato. Se adicionaron 200 µL de la solución de pepsina para cada concentración y se incubó 10 min a 37°C de manera de que se produzca la reacción enzimática. Para detener la reacción se agregaron 2 mL de TCA 5% m/v en cada tubo. Se centrifugó para obtener una solución clara (6.000 g durante 30 min). La fase acuosa fue traspasada a un tubo Eppendorf nuevo y fue estabilizada a 20°C. Finalmente, se determinó la ABS de la fase acuosa a 280 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-vis Jenway 7305 (Reino Unido). El blanco fue obtenido mediante la misma metodología, pero agregando la pepsina a las diferentes concentraciones luego de la adición del TCA. La actividad enzimática fue calculada como:

$$\text{Actividad enzimática} \left( \frac{U}{mg} \right) = \frac{(ABS_C - ABS_{blanco})}{t * C} \times 1000 \quad (\text{Ecuación 23}),$$

donde  $ABS_C$  y  $ABS_{blanco}$  corresponden a la ABS a 280 nm de las diferentes concentraciones de enzima y del blanco, respectivamente,  $t$  es el tiempo de la reacción y  $C$  es la concentración de pepsina en la cubeta ( $mg\ mL^{-1}$ ).

**Tripsina de pancreatina:** El ensayo para determinar la actividad tripsina de pancreatina de páncreas porcino se basó en la siguiente reacción:



según la cual una unidad de enzima hidroliza 1 µmol de  $p$ -toluensulfonil-L arginina metil éster (TAME, T4626, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) en 1 min a 25°C y pH 8,1. Para realizar el ensayo se preparó el sustrato de la enzima TAME 10 mM y el *buffer* de reacción Tris/HCl 46 mM conteniendo  $CaCl_2$  11,5 mM. Se ajustó el pH a 8,1 a 25°C. Se preparó una solución *stock* de pancreatina de páncreas porcino (P7545, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 1 mg  $mL^{-1}$  disolviendo la enzima en HCl 1,0 mM. Antes de realizar el ensayo se prepararon al menos dos concentraciones en HCl 1,0 mM y se mantuvieron a 4°C.

En la cubeta, se mezclaron 2,6 mL de buffer de reacción y 0,3 mL de TAME a 25°C. Seguidamente, se adicionaron 100 µL de tripsina y la mezcla se homogeneizó suavemente. Inmediatamente después, se comenzó a medir la ABS a 247 nm durante 10 min, utilizando un espectrofotómetro UV-vis Jenway 7305 (Reino Unido). El blanco fue obtenido mediante la misma metodología, pero sin el agregado de enzima.

Para calcular la pendiente, los datos seleccionados deben corresponder a la parte lineal del gráfico de ABS en función del tiempo. En el caso del blanco, la pendiente del gráfico de ABS en función del tiempo debe ser cercana a cero.

La actividad tripsina de pancreatina se determinó a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad enzimática} \left( \frac{U}{mg} \right) = \frac{(ABS_{PE} - ABS_{PB})}{540 * X} \times 1000 \times 3 \quad (\text{Ecuación 24}),$$

donde  $ABS_{PE}$  corresponde a la pendiente de la parte lineal ( $ABS \text{ min}^{-1}$ ) para la enzima,  $ABS_{PB}$  es la pendiente de la parte lineal ( $ABS \text{ min}^{-1}$ ) para el blanco, el factor 3 corresponde a la cantidad de mL de la mezcla de reacción, 540 es el coeficiente de extinción molar del TAME ( $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y X son los mg de pancreatina en la mezcla de reacción.

Una vez determinada la actividad enzimática de pepsina o tripsina de pancreatina, las enzimas se utilizaron por un periodo máximo de 6 meses. Transcurrido este tiempo, la actividad enzimática se calculó nuevamente para continuar con los ensayos debido a que durante el almacenamiento las enzimas pueden perder gradualmente su actividad.

A partir de las actividades enzimáticas determinadas se calculó la cantidad de enzima necesaria para llevar a cabo el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* según lo establecido en el protocolo utilizado en la presente tesis y descripto a continuación (314).

#### 4.3.6.2. Método estático consenso

El proceso gastrointestinal *in vitro* consiste en una fase oral, una fase gástrica y una fase intestinal *in vitro*, basadas en un método consenso internacional (314). En general, el alimento es sometido a un fluido salival simulado (FSS), a un fluido gástrico simulado (FGS) y a un fluido intestinal simulado (FIS), los cuales consisten en una mezcla de electrolitos, enzimas,  $CaCl_2$ , sal biliar y agua. En este ensayo, la fase oral conteniendo el FSS fue omitida debido a que la enzima presente en este fluido ( $\alpha$ -amilasa) no es capaz de hidrolizar ninguno de los componentes de los polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> a evaluar (336).

**Fase gástrica:** Durante esta fase el alimento es digerido e hidrolizado en el estómago por la acción de enzimas, HCl y movimientos peristálticos.

Antes de comenzar con el ensayo, se preparó una solución *stock* de FGS 1,25X conteniendo KCl 6,9 mM,  $KH_2PO_4$  0,9 mM,  $NaHCO_3$  25 mM, NaCl 47,2 mM,  $MgCl_2$  0,1 mM y  $(NH_4)_2CO_3$  0,5 mM (Tabla 10) a la cual, posteriormente, se le adicionó una solución de  $CaCl_2$  0,3 M hasta alcanzar una concentración final de 0,075 mM.

En primer lugar, 0,1 g de polvo EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> fueron disueltos en 2 mL de agua desionizada, en tubo de vidrio con tapa de cierre hermético. Luego, se adicionaron 2 mL de FGS 1,25X. Se ajustó el pH a 3,0 utilizando HCl y se adicionó una solución de pepsina de mucosa gástrica porcina ( $8 U \text{ mg}^{-1}$  sustrato). El pH final de las muestras fue chequeado y, en caso de ser necesario, corregido a 3,0. Por último, se adicionó la cantidad adecuada de agua para la correcta dilución del FGS (1X). Inmediatamente después, las muestras fueron incubadas a  $37^\circ C$  en un agitador rotatorio Rotator Multi Bio RS-24 (Boeco, Alemania) a 60 rpm durante 2 h. Por último, las muestras destinadas a digestión intestinal simulada continuaron con la

siguiente fase, mientras que a las muestras correspondientes a la digestión gástrica simulada (obtenidas por triplicado) se les adicionó el *cocktail* inhibidor de proteasas (P2714, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 2 mM y fueron analizadas inmediatamente o almacenadas a -20°C hasta el momento de ser utilizadas.

**Tabla 10.** Volumen de cada solución de electrolito necesario para preparar 400 mL de FGS 1,25X.

Solución	Concentración <i>stock</i>		Volumen <i>stock</i>	Concentración en FGS
	g L <sup>-1</sup>	mol L <sup>-1</sup>	mL	mmol L <sup>-1</sup>
KCl	37,3	0,5	6,9	6,9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	0,5	0,9	0,9
NaHCO <sub>3</sub>	84	1	12,5	25
NaCl	117	2	11,8	47,2
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	30,5	0,15	0,4	0,1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	48	0,5	0,5	0,5

**Fase intestinal:** En el intestino delgado se produce la digestión de proteínas, grasas y carbohidratos de manera de que puedan ser absorbidos por el organismo.

Antes de comenzar con la fase intestinal, se preparó previamente una solución *stock* de FIS 1,25X conteniendo KCl 6,8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,8 mM, NaHCO<sub>3</sub> 85 mM, NaCl 38,4 mM y MgCl<sub>2</sub> 0,33 mM (Tabla 11) a la cual, posteriormente, se le adicionó una solución de CaCl<sub>2</sub> hasta alcanzar una concentración final de 0,3 mM.

En esta fase, el mismo volumen de FIS 1,25X (4 mL) fue adicionado a las muestras provenientes de la etapa anterior. Además, una solución de SB (extracto de bilis porcino, B8631, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) fue añadida de forma de obtener 0,0008 mmol mg<sup>-1</sup> sustrato. El pH fue ajustado a 7,0. Por otro lado, se disolvió pancreatina de páncreas porcino en FIS 1,25X (0,8 U mg<sup>-1</sup> sustrato, basado en la actividad de la tripsina) y se añadió a la solución. El pH final de las muestras fue chequeado y, en caso de ser necesario, corregido a 7,0. Por último, se adicionó la cantidad adecuada de agua para la correcta dilución del FIS (1X). Inmediatamente después, las muestras fueron incubadas a 37°C en un agitador rotatorio Rotator Multi Bio RS-24 (Boeco, Alemania) a 60 rpm durante 2 h. Una vez finalizada la digestión intestinal, el *cocktail* inhibidor de proteasas 2 mM fue adicionado. Las muestras se obtuvieron por triplicado y fueron analizadas inmediatamente o almacenadas a -20°C hasta el momento de ser utilizadas.

La misma cantidad de agua desionizada en reemplazo de la muestra fue adicionada y sometida al mismo proceso gastrointestinal *in vitro* con el objetivo de obtener controles correspondientes a las soluciones FGS y FIS. Además, el mismo procedimiento fue realizado para el polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub>, EWPn y PAM. Para el caso de EWPn y PAM, se prepararon soluciones con la misma cantidad de proteína y PS, respectivamente, que presentan los polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub>.

Los digestos provenientes de la fase gástrica e intestinal obtenidos por triplicado fueron conservados a -20°C hasta su posterior utilización.

**Tabla 11.** Volumen de cada solución de electrolito necesario para preparar 400 mL de FIS 1,25X.

Solución	Concentración <i>stock</i>		Volumen <i>stock</i>	Concentración en FIS
	g L <sup>-1</sup>	mol L <sup>-1</sup>	mL	mmol L <sup>-1</sup>
KCl	37,3	0,5	6,8	6,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	0,5	0,8	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	84	1	42,5	85
NaCl	117	2	9,6	38,4
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	30,5	0,15	1,1	0,33

#### 4.3.6.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Los polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub>, el polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub> y el control EWPn antes y después de la digestión gástrica e intestinal fueron evaluados mediante SDS-PAGE (320). Las muestras fueron preparadas adicionando SDS, *buffer* compuesto por Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), glicerol y azul de bromofenol. Luego, el gel de poliacrilamida al 12% fue cargado con un volumen de muestra de 10 µL, permitiendo la separación de los fragmentos proteicos en un rango de PM de 12 a 100 kDa. Posteriormente, se llevó a cabo la tinción con azul de Coomassie para permitir la visualización de las bandas proteicas. El PM de las bandas proteicas fue determinado utilizando marcadores de peso molecular (MPM) *standard* (MA14 Protein Marker, PB-L). Además, se analizaron los controles FGS + pepsina y FIS + pancreatina + SB.

#### 4.3.6.4. Distribución de tamaño de partícula y potencial $\zeta$

Los polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub>, el polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub> y el control EWPn antes y después de la digestión gástrica e intestinal fueron evaluados mediante DLS utilizando un equipo Zetasizer Nano

ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) conteniendo un láser de He-Ne de longitud de onda de salida de 632,8 nm y ángulo fijo 173°, ejecutado bajo el *software* Zetasizer versión 7.12 (166). El  $d_H$  (nm) fue obtenido a partir de la PSDi (%). La PSDv (%) también fue considerada para el análisis. Los índices de refracción utilizados para el solvente (agua) y la proteína fueron 1,33 y 1,50, respectivamente. La viscosidad del solvente (agua) se consideró 0,8872 cP. Las determinaciones se llevaron a cabo a 25°C y se realizaron por triplicado.

Por otro lado, los polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub>, el polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> y los controles EWPn y PAM antes y después de la digestión gástrica e intestinal fueron evaluados en función del potencial  $\zeta$  (mV) utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) ejecutado bajo el *software* Zetasizer versión 7.12. Los valores se obtuvieron a partir de la distribución de movilidad electroforética por medio de la técnica de velocidad Doppler láser, y fueron calculados según el modelo de Smoluchowski. Las mediciones se llevaron a cabo a 25°C y se realizaron por triplicado.

Las determinaciones de PSD y potencial  $\zeta$  fueron realizadas a pH 6,0 antes de la digestión, y a pH 3,0 y 7,0 después de la digestión gástrica e intestinal, respectivamente.

#### 4.3.6.5. Estabilidad y bioaccesibilidad de AE

Luego del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*, la estabilidad y bioaccesibilidad de los AEs fueron evaluadas según la metodología descripta previamente en la literatura (27,337,338). En primer lugar, se determinó el AE presente en el digesto total, proveniente del proceso de digestión. Por otro lado, se consideró que el AE liberado a partir de los polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> fue el AE determinado en el sobrenadante (fase micelar), luego de centrifugar el digesto a 10.000 g durante 30 min y a 25°C, con el objetivo de eliminar material sólido insoluble. Este AE correspondiente a la fracción micelar podría ser considerado disponible para la absorción y representar, de este modo, a la fracción bioaccesible.

Para ello, un volumen de 0,3 mL de digesto total o sobrenadante fue adicionado a 3 mL de acetato de etilo y la mezcla se agitó mecánicamente (vórtex) durante 1 min. Con el objetivo de lograr la estabilización, cada tubo conteniendo la mezcla permaneció en reposo durante 5 min. La fase superior de acetato de etilo fue analizada utilizando un espectrofotómetro UV-vis Jenway 7305 (Reino Unido) evaluando la ABS a 274 nm para la determinación de TOM y a 276 nm para la determinación de ORE (339,340). La concentración de AE fue calculada a partir de curvas de calibrado de TOM y ORE en acetato de etilo, detalladas en la Sección 3.3.5.3.

Como controles, TOM y ORE libres (no encapsulados) fueron evaluados mediante la misma metodología. Todas las determinaciones se llevaron a cabo a 25°C y se realizaron por triplicado.

La estabilidad ( $E^*$ ) del AE fue definida como la fracción que permanece en el intestino en estado no transformado luego del proceso de digestión *in vitro*, calculada como:

$$E^* = \frac{C_{Digesto}}{C_{Inicial}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 25}),$$

donde  $C_{Digesto}$  y  $C_{Inicial}$  son las concentraciones de AE en el digesto total luego de la fase intestinal y en la muestra inicial (antes del proceso de digestión *in vitro*), respectivamente.

La bioaccesibilidad ( $B^*$ ) del AE fue definida como la fracción que fue liberada y solubilizada en la fase micelar luego del proceso de digestión *in vitro*, calculada como:

$$B^* = \frac{C_{Micelar}}{C_{Digesto}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 26}),$$

donde  $C_{Micelar}$  y  $C_{Digesto}$  son las concentraciones de AE en la fracción micelar y en el digesto total luego de la fase intestinal, respectivamente.

Finalmente, la bioaccesibilidad efectiva (BE) fue definida como la fracción de AE ingerido presente en la fase micelar, dependiente de los valores de  $E^*$  y  $B^*$ , calculada como:

$$BE = E^* \times B^* = \frac{C_{Micelar}}{C_{Inicial}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 27}),$$

donde  $C_{Micelar}$  y  $C_{Inicial}$  son las concentraciones de AE en la fracción micelar luego del proceso de digestión *in vitro* y en la muestra inicial (antes del proceso de digestión *in vitro*), respectivamente.

#### 4.3.6.6. Actividad antioxidante

##### 4.3.6.6.1. Capacidad de captación de radical ABTS<sup>+</sup>

La capacidad de captación de radical ABTS<sup>+</sup> ( $C_{ABTS^+}$ , %) de los polvos EWPn-AE-PAM<sub>Iiof</sub>, antes y después de la digestión gástrica e intestinal fue determinada por espectroscopía, de acuerdo con [Cian y col. \(2014\) \(171\)](#), siguiendo algunas modificaciones. En primer lugar, la solución de radical ABTS<sup>+</sup> fue preparada haciendo reaccionar 10 mL de reactivo ABTS (A1888, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 2 mM con 0,04 mL de persulfato de potasio 70 mM y mantenida por 16 h a 25°C y en oscuridad. Posteriormente y previo a realizar el ensayo, la solución de radical ABTS<sup>+</sup> fue diluida con PBS 0,01 M (pH 7,4) de forma de obtener un valor de ABS de  $0,80 \pm 0,03$  a 734 nm. Luego, un volumen de 0,1 mL de muestra (diluida 1/5 con agua desionizada) fue adicionado a 1,9 mL de solución de radical ABTS<sup>+</sup> y la mezcla fue incubada en oscuridad a 25°C durante 6 min. Luego de transcurrido el tiempo correspondiente, la ABS fue determinada a 734 nm utilizando un espectrofotómetro UV-vis Jenway 7305 (Reino Unido). Como controles, el polvo EWPn-PAM<sub>Iiof</sub> y TOM y ORE libres (AEs no encapsulados) antes y después de la digestión gástrica e intestinal fueron evaluados mediante la misma metodología. Por otro lado, el mismo volumen de PBS en reemplazo de la muestra fue adicionado para la preparación del blanco. Todas las determinaciones se llevaron a cabo a 25°C y se realizaron por triplicado.

El porcentaje de captación de radical  $\text{ABTS}^+$  ( $C_{\text{ABTS}^+}$ , %) fue calculado tal como se detalló en la Sección 3.3.6.1.

#### 4.3.6.6.2. Poder reductor

El poder reductor (PR, mg de equivalentes de ácido ascórbico (EAA)  $\text{mL}^{-1}$  digesto) de los polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub>, antes y después de la digestión gástrica e intestinal fue determinada por espectroscopía de acuerdo con [Cian y col. \(2015\) \(172\)](#), siguiendo algunas modificaciones. Un volumen de 0,2 mL de muestra fue adicionado a 0,5 mL de *buffer* fosfato 0,2 M (pH 6,6) y 0,5 mL de solución de ferricianuro de potasio 1% m/v. La mezcla fue incubada a 50°C durante 20 min y, posteriormente, 0,5 mL de una solución de ácido tricloroacético al 10% m/v fue adicionada. Luego, se centrifugó a 8.000 g durante 5 min a 25°C y 1,0 mL de sobrenadante fue mezclado con 0,2 mL de cloruro férrico 0,1% m/v y 1 mL de agua desionizada. La mezcla se mantuvo en oscuridad a 50°C durante 10 min y, una vez transcurrido el tiempo correspondiente, la ABS fue determinada a 700 nm utilizando un espectrofotómetro UV-vis Jenway 7305 (Reino Unido). Como controles, el polvo EWPn-PAM<sub>liof</sub> y TOM y ORE libres (AEs no encapsulados) antes y después de la digestión gástrica e intestinal fueron evaluados mediante la misma metodología. Por otro lado, el mismo volumen de agua desionizada en reemplazo de la muestra fue adicionado para la preparación del control negativo y el mismo volumen de agua desionizada en reemplazo de la muestra y en reemplazo del cloruro férrico fue adicionado para la preparación del blanco. Las determinaciones fueron llevadas a cabo a 25°C y realizadas por triplicado. Los resultados fueron expresados como mg de equivalentes de ácido ascórbico (EAA)  $\text{mL}^{-1}$  digesto, utilizando una curva de calibrado de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) como reactivo *standard* en un rango de concentración de 0,01 a 0,10  $\text{g L}^{-1}$ .

#### 4.3.6.7. Actividad antidiabética

##### 4.3.6.7.1. Actividad inhibitoria de $\alpha$ -amilasa

La actividad inhibitoria de  $\alpha$ -amilasa ( $A_{\text{ami}}$ ,  $\text{IC}_{50}$  expresado como  $\mu\text{g AE mL}^{-1}$  y como mg proteína  $\text{mL}^{-1}$ ) de los polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> después de la digestión gastrointestinal *in vitro* fue determinada según el método previamente descrito por [Donkor y col. \(2012\) \(341\)](#). Para ello, un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de muestra fue adicionado a 100  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilasa de páncreas porcino (A3306, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) (23  $\text{U mg}^{-1}$  sólido) y la mezcla fue incubada a 37°C durante 5 min. Posteriormente, un volumen de 250  $\mu\text{L}$  de una solución de almidón en *buffer* fosfato (pH 6,8) 1% m/v fue añadido como sustrato para comenzar la reacción, la cual fue llevada a cabo a 37°C durante 5 min. Una vez transcurrido el tiempo correspondiente, un volumen de 200  $\mu\text{L}$  de reactivo formado por ácido 3,5-dinitrosalicílico (D0550, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 1% m/v y tartrato de sodio y potasio 12% m/v en NaOH 0,4 M, fue adicionado a la mezcla con el objetivo de interrumpir la reacción enzimática. Luego, la mezcla fue calentada a 100°C durante 15 min, diluida con 2 mL de agua desionizada y colocada en baño de hielo. Como controles,



el polvo EWPn-PAM<sub>liof</sub> y TOM y ORE libres (AEs no encapsulados) después de la digestión gastrointestinal *in vitro* fueron evaluados mediante la misma metodología. Por otro lado, el mismo volumen de agua desionizada en reemplazo de la muestra fue adicionado para obtener el blanco de muestra y el mismo volumen de *buffer* en reemplazo de la solución de almidón fue adicionado para obtener el blanco de reactivo. La ABS de la mezcla de reacción fue determinada a 540 nm utilizando un espectrofotómetro Biochrom Asys UVM-340 (Reino Unido). Todas las mediciones fueron llevadas a cabo a 25°C y realizadas por triplicado.

El porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -amilasa ( $I_{ami}$ , %) fue calculado como:

$$I_{ami} = \frac{(ABS_E - ABS_{BR}) - ((ABS_M - ABS_{BM}) - ABS_{BR})}{(ABS_E - ABS_{BR})} \times 100 \quad (\text{Ecuación 28}),$$

donde  $ABS_E$  es la ABS de la enzima,  $ABS_{BR}$  corresponde a la ABS del blanco de reactivo,  $ABS_M$  es la ABS de la muestra y  $ABS_{BM}$  representa la ABS del blanco de muestra.

Además, para determinar la  $A_{ami}$  se obtuvo el valor de  $IC_{50}$ , definido como la concentración de muestra necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima, según [Cian y col. \(2022\) \(342\)](#). En primer lugar, se prepararon diluciones seriadas de las muestras de 0 a 12  $\mu\text{g AE mL}^{-1}$  y de 0 a 6 mg proteína  $\text{mL}^{-1}$ . Los datos experimentales obtenidos fueron ajustados según la ecuación:

$$y = y_0 + A * \exp^{R_0 x} \quad (\text{Ecuación 29}),$$

donde  $y$  es la tasa de inhibición,  $y_0$ ,  $A$  y  $R_0$  son parámetros de regresión, y  $x$  es la concentración de muestra. Por último, el valor de  $IC_{50}$  fue obtenido como:

$$IC_{50} = \ln \frac{(50 - \frac{y_0}{A})}{R_0} \quad (\text{Ecuación 30}),$$

donde  $y_0$ ,  $A$  y  $R_0$  son parámetros de regresión.

#### 4.3.6.7.2. Actividad inhibitoria de $\alpha$ -glucosidasa

La actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa ( $A_{glu}$ ,  $IC_{50}$  expresado como  $\mu\text{g AE mL}^{-1}$  y como mg proteína  $\text{mL}^{-1}$ ) de los polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> después de la digestión gastrointestinal *in vitro* fue determinada según el método previamente descrito por [Donkor y col. \(2012\) \(341\)](#). En primer lugar, la enzima  $\alpha$ -glucosidasa (G5003, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) ( $1 \text{ U mL}^{-1}$ ) fue disuelta en 100  $\mu\text{L}$  de *buffer* fosfato de potasio 0,1 M (pH 6,8), a la cual se le añadió un volumen de 50  $\mu\text{L}$  de muestra. La mezcla fue incubada a 37°C durante 10 min y, posteriormente, se adicionó el sustrato *p*-nitrofenol 5 mM a partir de 50  $\mu\text{L}$  de reactivo pNPG (N1377, Sigma-Aldrich, Estados Unidos). La reacción enzimática fue llevada a cabo a 37°C durante 30 min y detenida mediante el agregado de 1 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 M. Como controles, el polvo EWPn-PAM<sub>liof</sub> y TOM y ORE libres (AEs no encapsulados) después de la digestión gastrointestinal *in vitro*

fueron evaluados mediante la misma metodología. Por otro lado, el mismo volumen de *buffer* fosfato de potasio 0,1 M en reemplazo de la muestra y en reemplazo del sustrato fue adicionado para la preparación del control y del blanco, respectivamente. La liberación de *p*-nitrofenol se determinó midiendo la ABS de la mezcla a 400 nm, utilizando un espectrofotómetro Biochrom Asys UVM-340 (Reino Unido). Todas las determinaciones fueron llevadas a cabo a 25°C y realizadas por triplicado.

El porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa ( $I_{glu}$ , %) fue calculado como:

$$I_{glu} = \left(1 - \frac{ABS_{muestra} - ABS_{blanco}}{ABS_{control}}\right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 31}),$$

donde  $ABS_{muestra}$  es la ABS de la muestra,  $ABS_{blanco}$  representa la ABS del blanco y  $ABS_{control}$  es la ABS del control.

Además, para determinar la  $A_{glu}$  se obtuvo el valor de  $IC_{50}$ , definido como la concentración de muestra necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima, según [Cian y col. \(2022\) \(342\)](#). En primer lugar, se prepararon diluciones seriadas de las muestras de 0 a 12  $\mu\text{g AE mL}^{-1}$  y de 0 a 6 mg proteína  $\text{mL}^{-1}$ . Los datos experimentales obtenidos fueron ajustados según la ecuación:

$$y = y_0 + A * \exp^{R_0 x} \quad (\text{Ecuación 32}),$$

donde  $y$  es la tasa de inhibición,  $y_0$ ,  $A$  y  $R_0$  son parámetros de regresión, y  $x$  es la concentración de muestra. Por último, el valor de  $IC_{50}$  fue obtenido como:

$$IC_{50} = \ln \frac{(50 - \frac{y_0}{A})}{R_0} \quad (\text{Ecuación 33}),$$

donde  $y_0$ ,  $A$  y  $R_0$  son parámetros de regresión.

#### 4.3.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de todas las determinaciones analíticas se realizó por medio de análisis de variancia (ANOVA), utilizando el *software* R con interfaz RStudio versión 1.4.1717. Las diferencias significativas entre medias fueron determinadas utilizando test LSD con 95% de confianza ( $p < 0,05$ ). Para determinar los parámetros derivados del ajuste de modelos matemáticos se utilizó el *software* Origin versión 8.0724.

## 4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.4.1. Caracterización de coacervados EWPn-AE-PAM

#### 4.4.1.1. Comportamiento de fase

Con el objetivo de obtener información acerca del proceso de formación del complejo proteína-PS, se llevó a cabo un análisis de comportamiento de fase dependiente del pH de la solución acuosa. Para ello, los coacervados EWPn-AE-PAM fueron evaluados en términos de la ABS a 400 nm, el potencial  $\zeta$  y la apariencia visual a 0 y 24 h luego de su obtención. Las soluciones de PAM y EWPn y los nanocomplejos EWPn-AE también fueron examinados a modo de control.

En primer lugar, la Fig. 11A muestra la ABS a 400 nm en función del pH del medio acuoso, comenzando en el valor de pH 2,0 e incrementándose cada 0,5 unidades hasta el valor de pH 7,0, para los sistemas PAM, EWPn, EWPn-TOM, EWPn-ORE, EWPn-TOM-PAM y EWPn-ORE-PAM. Como se puede observar, la ABS de PAM resultó cercana a cero en todo el rango de pH evaluado, y este comportamiento fue consistente con su apariencia visual, evidenciada en la Fig. 12. Del mismo modo, Tian y col. (2023) (343) informaron que una solución de PSs de origen fúngico (de concentración 0,1% m/m) no exhibió turbidez en el rango de pH 2,0-7,0.

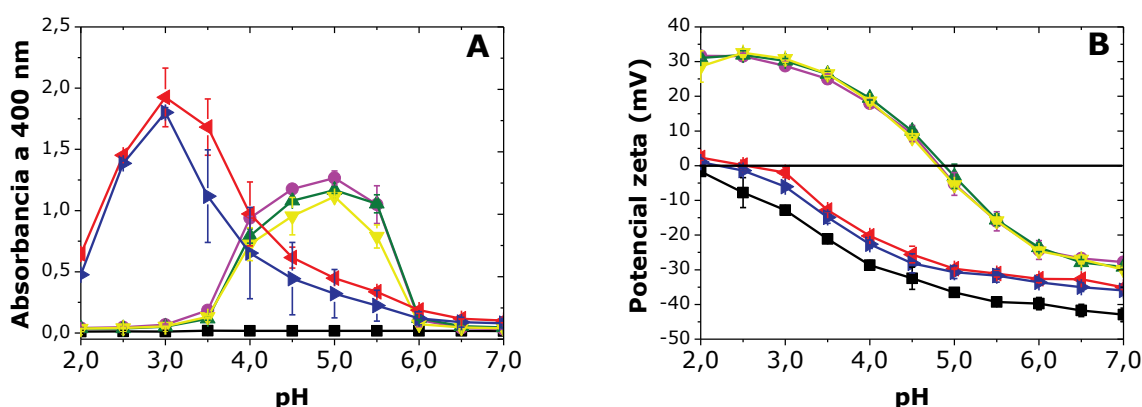
Por otro lado, la solución de EWPn y los nanocomplejos EWPn-TOM y EWPn-ORE evidenciaron curvas similares en el gráfico de ABS en función del pH, presentando bajos valores en los rangos de pH 2,0-3,0 y 6,0-7,0 (Fig. 11A). A partir de la Fig. 12 se puede observar que estas soluciones permanecieron traslúcidas en los rangos de pH 2,0-3,0 y 6,5-7,0.

Tanto en la curva de EWPn como en la de los nanocomplejos EWPn-AE, los valores de ABS aumentaron en el rango de pH 3,5-5,5, evidenciando un pico a pH 5,0 (Fig. 11A). Por otro lado, en el ensayo de apariencia visual se exhibió un aumento de la turbidez entre los valores de pH 3,5 y 6,0, lo que sugiere la presencia de entidades macromoleculares más grandes (Fig. 12). Este comportamiento podría ser atribuido al pI de la principal proteína de EWP (OVA), registrado en pH 4,7, aproximadamente (232). Bajo esta condición, la reducción de la carga neta de la proteína promovería asociaciones macromoleculares, incrementando el tamaño de partícula (343).

Es importante destacar que la encapsulación de AE en EWPn no alteró el valor del pI, lo que sugiere que el comportamiento de los nanocomplejos EWPn-AE estaría gobernado por la nanopartícula proteica. Sin embargo, EWPn precipitó en el rango de pH de 4,0 a 5,0 luego de 24 h, mientras que los nanocomplejos EWPn-TOM y EWPn-ORE exhibieron también un precipitado a pH 5,5 (Fig. 12). Este fenómeno podría resultar de las asociaciones macromoleculares causadas por una disminución en la carga neta de la nanopartícula proteica.

Por otro lado, los sistemas EWPn-TOM-PAM y EWPn-ORE-PAM exhibieron curvas de ABS en función del pH similares, con un pico a pH 3,0, seguido por una disminución gradual de los valores de ABS

hasta pH 7,0 (Fig. 11A). Este comportamiento sugiere la inducción de la coacervación compleja o separación de fase asociativa a valores de pH bajos, donde la interacción entre los biopolímeros es óptima y la neutralización de las cargas conduce al punto de máxima ABS (pH 3,0) (343). Además, este análisis evidenció la dependencia del pH en la formación de los coacervados EWPn-AE-PAM, reflejando su potencial para experimentar procesos de transiciones de fase compleja e interacciones entre los componentes en solución acuosa.



**Figura 11.** Absorbancia a 400 nm (A) y potencial  $\zeta$  (B) como función del pH del medio acuoso para PAM (■), EWPn (●), EWPn-TOM (▲), EWPn-ORE (▼), EWPn-TOM-PAM (◄) y EWPn-ORE-PAM (►). Condiciones experimentales: concentración de proteína 0,1% m/v, concentración de PS 0,05% m/v. Resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar.

La Fig. 11B muestra el potencial  $\zeta$  (expresado en mV) en función del pH del medio acuoso, comenzando en el valor de pH 2,0 e incrementándose cada 0,5 unidades hasta el valor de pH 7,0, para los sistemas PAM, EWPn, EWPn-TOM, EWPn-ORE, EWPn-TOM-PAM y EWPn-ORE-PAM. Como se puede observar, la solución de PAM evidenció los valores de potencial  $\zeta$  más bajos en todo el rango de pH evaluado, lo cual se corresponde con la naturaleza aniónica de este PS (232).

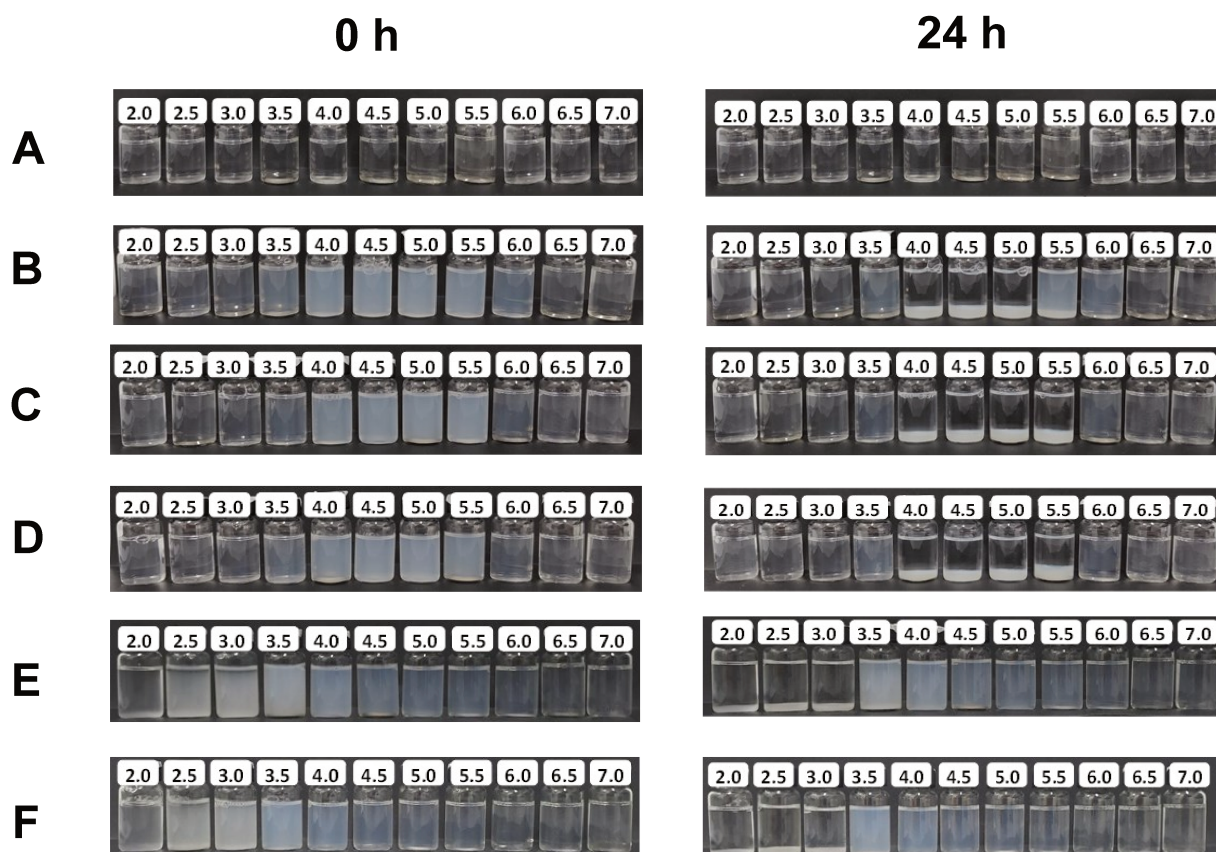
Tanto la solución de EWPn como los nanocomplejos EWPn-TOM y EWPn-ORE exhibieron valores de potencial  $\zeta$  positivos en el rango de pH 2,0-4,5 y negativos en el rango 5,0-7,0 (Fig. 11B). Esta transición en el signo del potencial  $\zeta$  (indicando carga neta cero) reflejaría el pI de los sistemas, el cual resultó cercano a pH 5,0 en todos los casos. Asimismo, el valor aproximado del pI fue el esperado según las observaciones derivadas de la Fig. 12, discutida anteriormente.

Por otro lado, los sistemas EWPn-TOM-PAM y EWPn-ORE-PAM presentaron valores de potencial  $\zeta$  intermedios, siendo menores que los valores de los controles EWPn, EWPn-TOM y EWPn-ORE, pero mayores que el control de PAM (Fig. 11B). Este comportamiento sugiere que los grupos carboxilo aniónicos

de PAM estarían siendo neutralizados por los grupos amino catiónicos de EWPn y EWPn-AE. Además, las curvas de potencial  $\zeta$  de los sistemas EWPn-AE-PAM siguieron una tendencia similar a aquella exhibida por la solución de PAM, indicando que PAM gobernaría el comportamiento general de dichos sistemas en el rango de pH evaluado.

Luego de 24 h de la obtención de los coacervados EWPn-TOM-PAM y EWPn-ORE-PAM, se pudo apreciar un precipitado en el rango de pH 2,0-3,0 (Fig. 12). Cuando el valor de pH fue superior a 3,0, las soluciones presentaron elevada turbidez, la cual disminuyó gradualmente hasta que las soluciones se tornaron traslúcidas a valores de pH mayores a 6,0. Este fenómeno de precipitación bajo la condición de pH mencionada confirmaría la formación de coacervados complejos de tamaño considerable, resultantes de las interacciones asociativas que existirían entre los biopolímeros (343).

Finalmente, es importante destacar que la naturaleza química de los compuestos presentes en los AEs (TOM y ORE) no influiría (o lo haría en baja medida) en el comportamiento de fase dependiente del pH de los coacervados EWPn-AE-PAM. Además, el análisis del comportamiento de fase permitió establecer la condición más favorable para la obtención de precipitados que contengan alta concentración de coacervados EWPn-AE-PAM, la cual se correspondió con un valor de pH de 3,0.



**Figura 12.** Apariencia visual de PAM (A), EWPn (B), EWPn-TOM (C), EWPn-ORE (D), EWPn-TOM-PAM (E) y EWPn-ORE-PAM (F) en función del pH del medio acuoso luego de 0 y 24 h de preparación. Condiciones experimentales: concentración de proteína 0,1% m/v, concentración de PS 0,05% m/v.

#### 4.4.1.2. Microscopía

La microscopía óptica es una valiosa herramienta que permite determinar características estructurales generales de sistemas biopoliméricos. Numerosos autores han estudiado la formación de complejos proteína-PS mediante la observación de imágenes obtenidas por microscopía óptica (344–346).

La Fig. 13 corresponde a imágenes de microscopía óptica a 100x de los coacervados EWPn-TOM-PAM y EWPn-ORE-PAM, y del coacervado control EWPn-PAM, a pH 3,0. Como se puede observar, las partículas del control EWPn-PAM tendieron a agregarse y presentaron formas variadas e irregulares, con dimensiones menores a 20  $\mu\text{m}$ . Además, su estructura interna resultó compacta, la cual se encontró rodeada por una pared más clara. Del mismo modo que en la sección anterior, estas observaciones sugieren la formación de coacervados complejos con una organización definida, mediada por interacciones electrostáticas atractivas y puentes de hidrógeno entre EWPn y PAM (347–349).

Contrariamente, los coacervados EWPn-AE-PAM presentaron morfología más esférica y menos agregación con respecto al control EWPn-PAM (Fig. 13). Nuevamente, se observó una estructura interna

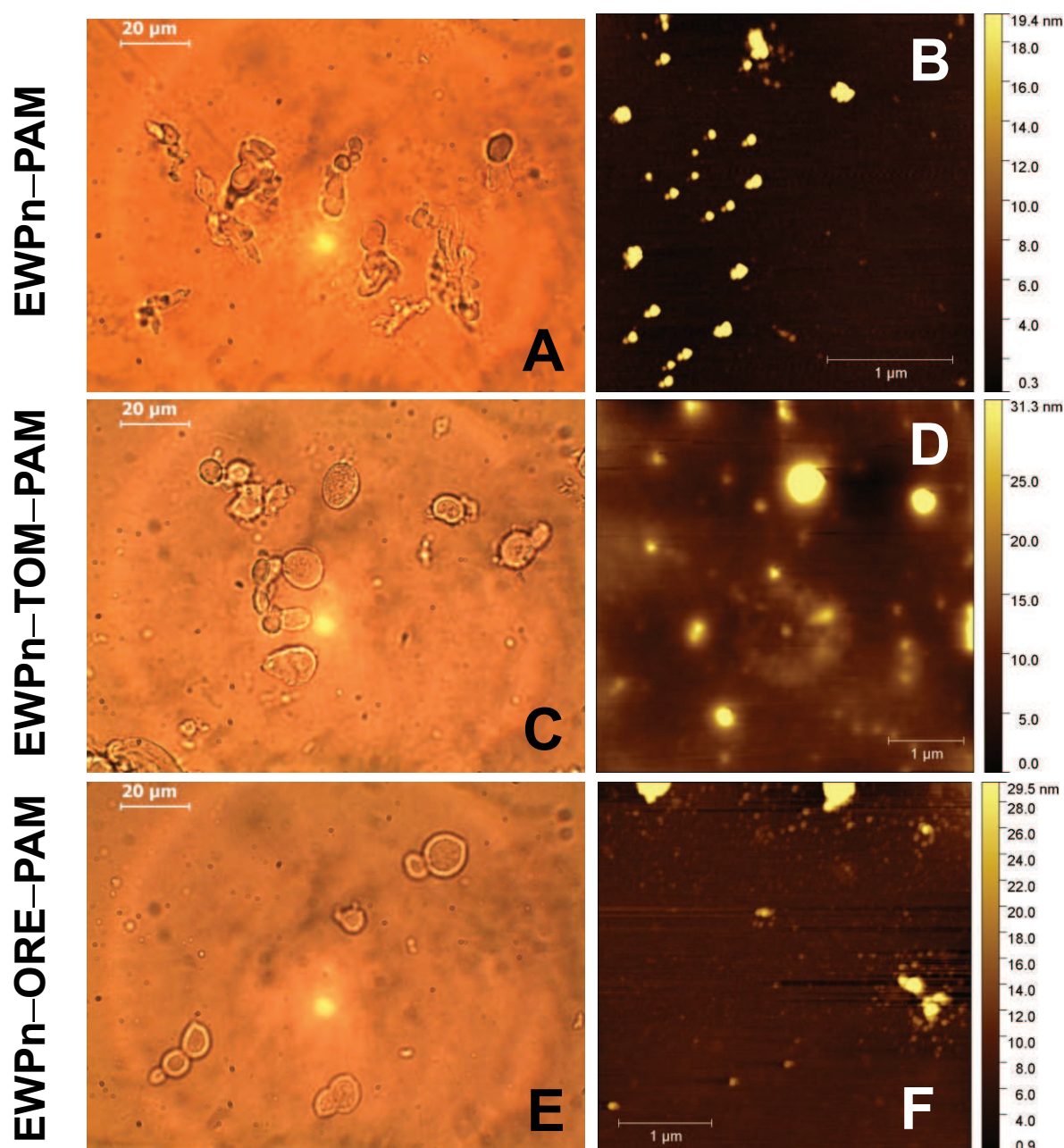
compacta rodeada por una pared más clara. Interesantemente, esta pared resultó más definida en ambos coacervados EWPn–AE–PAM que en el caso del coacervado control. Las diferencias mencionadas podrían ser atribuidas a la presencia de AE encapsulado, el cual podría modificar la estructura y comportamiento coloidal de los coacervados complejos a través de interacciones adicionales con los componentes del sistema (44). Por otro lado, se pudo apreciar que los componentes de TOM y ORE, de distinta naturaleza química, no afectaron sustancialmente la microestructura de los coacervados complejos.

Además, la caracterización estructural de los coacervados EWPn–AE–PAM analizada a través de imágenes de microscopía óptica fue complementada utilizando AFM. La AFM es una técnica avanzada de microscopía empleada frecuentemente para proporcionar información acerca del tamaño, la morfología y la topografía de la superficie de distintas nanopartículas (350).

En la Fig. 13 se presentan las imágenes topográficas obtenidas por AFM de los coacervados EWPn–TOM–PAM y EWPn–ORE–PAM, y del coacervado control EWPn–PAM, a pH 3,0. Como se puede observar, los coacervados EWPn–AE–PAM evidenciaron mayor altura (cerca de 30,0 nm) que el coacervado control (19,4 nm). Este fenómeno podría deberse a la incorporación de AE (TOM y ORE) en EWPn–PAM.

De este modo, ambas técnicas microscópicas fueron efectivas para describir aspectos estructurales y morfológicos de los coacervados complejos obtenidos en el presente trabajo.





**Figura 13.** Imágenes de microscopía óptica a 100x (**A**, **C**, **E**) y de topografía por AFM (**B**, **D**, **F**) de los sistemas EWPn-PAM, EWPn-TOM-PAM y EWPn-ORE-PAM examinados a pH 3,0.

#### 4.4.2. Modulación de la expresión génica en células Caco-2

##### 4.4.2.1. Viabilidad celular

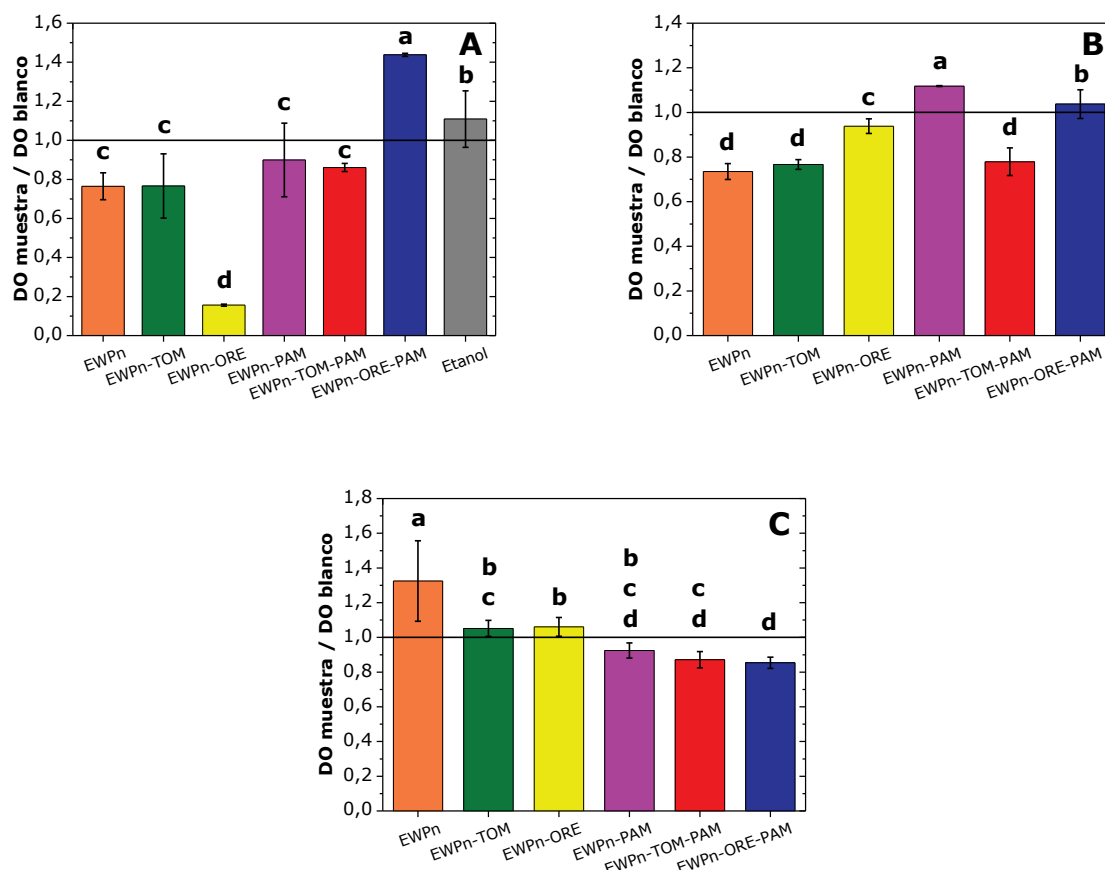
La expresión de genes claves en el transporte de glucosa hacia el interior de los enterocitos y el torrente sanguíneo puede ser evaluada en cultivos de células Caco-2. Este método, como todos aquellos basados en cultivo celular, exige que se lleve a cabo un ensayo previo de viabilidad celular a fin de



corroborar que las muestras a analizar no presenten efecto citotóxico en las concentraciones utilizadas y, de este modo, establecer las condiciones óptimas de cultivo.

La Fig. 14 muestra la viabilidad celular de células Caco-2 en presencia de los sistemas EWPn, EWPn-TOM, EWPn-ORE, EWPn-PAM, EWPn-TOM-PAM y EWPn-ORE-PAM diluidos 1/10, 1/20 y 1/200, determinada mediante el ensayo MTT. Como se puede observar, ninguno de los sistemas evaluados resultó citotóxico para las células Caco-2 independientemente de la concentración ensayada, con excepción del sistema EWPn-ORE, que afectó de manera significativa la viabilidad de las células únicamente para la dilución 1/10 (Fig. 14A). En este caso, la relación de ABS resultó  $0,16 \pm 0,01$ , es decir que solo un 16% de las células cultivadas permanecieron viables luego de ser incubadas en presencia de EWPn-ORE durante 72 h. Cabe mencionar que cuando ORE se encontró encapsulado en EWPn-PAM la viabilidad celular no fue afectada. Este comportamiento confirmaría la protección del nanocomplejo EWPn-ORE mediante la deposición electrostática de PAM sobre su superficie y sugeriría una liberación controlada de ORE (327). De forma consistente, de Oliveira y col. (2019) (351) observaron que la viabilidad celular de fibroblastos incubados en presencia de *trans*-cinamaldehído, geraniol y eugenol encapsulados en nanopartículas de zeína fue mayor respecto a cuando estuvieron incubados frente a los mismos compuestos sin encapsular. Los autores señalaron que la matriz proteica fue capaz de modular la cantidad de *trans*-cinamaldehído, geraniol y eugenol libre que provocaría los efectos citotóxicos.

Finalmente, la viabilidad celular no fue afectada cuando las células Caco-2 fueron incubadas en presencia del control de etanol (dilución 1/10) durante 72 h (Fig. 14A).



**Figura 14.** Viabilidad celular de células Caco-2 incubadas en presencia de los sistemas EWPn (■), EWPn-TOM (■), EWPn-ORE (■), EWPn-PAM (■), EWPn-TOM-PAM (■) y EWPn-ORE-PAM (■) diluidos 1/10 (A), 1/20 (B) y 1/200 (C) expresada como una relación de ABS medidas a 550 nm. Etanol (■) fue utilizado como control de solvente (dilución 1/10). Cada barra representa el promedio ± desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

#### 4.4.2.2. Expresión génica de SGLT1 y GLUT2

Los genes SLC5A1 y SLC2A2 son centrales en el mecanismo de absorción de la glucosa ingerida, y su implicancia en la fisiopatología de la DM2 ha sido ampliamente estudiada. Ambos codifican a importantes proteínas transportadoras de glucosa denominadas SGLT1 y GLUT2 (50). Por este motivo, la evaluación de la expresión génica de SGLT1 y GLUT2 en enterocitos resulta fundamental para identificar el mecanismo de acción mediante el cual los AEs podrían ejercer un efecto antidiabético.

En la Fig. 15 se muestra la expresión relativa de SGLT1 y GLUT2 en células Caco-2 evaluada a 6 y 24 h de incubación en presencia de los sistemas EWPn, EWPn-TOM, EWPn-ORE, EWPn-PAM, EWPn-TOM-PAM y EWPn-ORE-PAM diluidos 1/25 (dilución seleccionada a partir de los resultados obtenidos en el ensayo previo de viabilidad celular, Sección 4.4.2.1). Los niveles de expresión, normalizados al gen de actina (gen normalizador), refieren a las células incubadas en presencia de DMEM.

Como se puede observar, el nivel de expresión relativa de los genes SGLT1 y GLUT2 dependió tanto del sistema evaluado como del tiempo de incubación de las células. En primer lugar, el nivel de expresión de SGLT1 fue altamente inducido por los sistemas EWPn-ORE y EWPn-PAM luego de 6 h de incubación, mientras que los sistemas EWPn, EWPn-TOM, EWPn-TOM-PAM y EWPn-ORE-PAM provocaron una disminución en la expresión del gen al cabo del mismo tiempo (Fig. 15A). Además, no hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre estos sistemas que disminuyeron la expresión de SGLT1, aunque la expresión relativa de EWPn-ORE-PAM ( $0,15 \pm 0,01$ ) resultó notablemente menor que la expresión relativa de EWPn, EWPn-TOM y EWPn-TOM-PAM ( $0,79 \pm 0,09$ ,  $0,60 \pm 0,08$  y  $0,88 \pm 0,15$ , respectivamente). Una vez transcurridas 24 h de incubación, las células incubadas en presencia de EWPn-TOM aumentaron notablemente el nivel de expresión de SGLT1 ( $12,97 \pm 0,76$ ), mientras que la expresión relativa de EWPn-PAM y EWPn-TOM-PAM ( $0,64 \pm 0,02$  y  $0,45 \pm 0,05$ , respectivamente) disminuyó respecto al nivel expresado luego de 6 h de tratamiento (Fig. 15B).

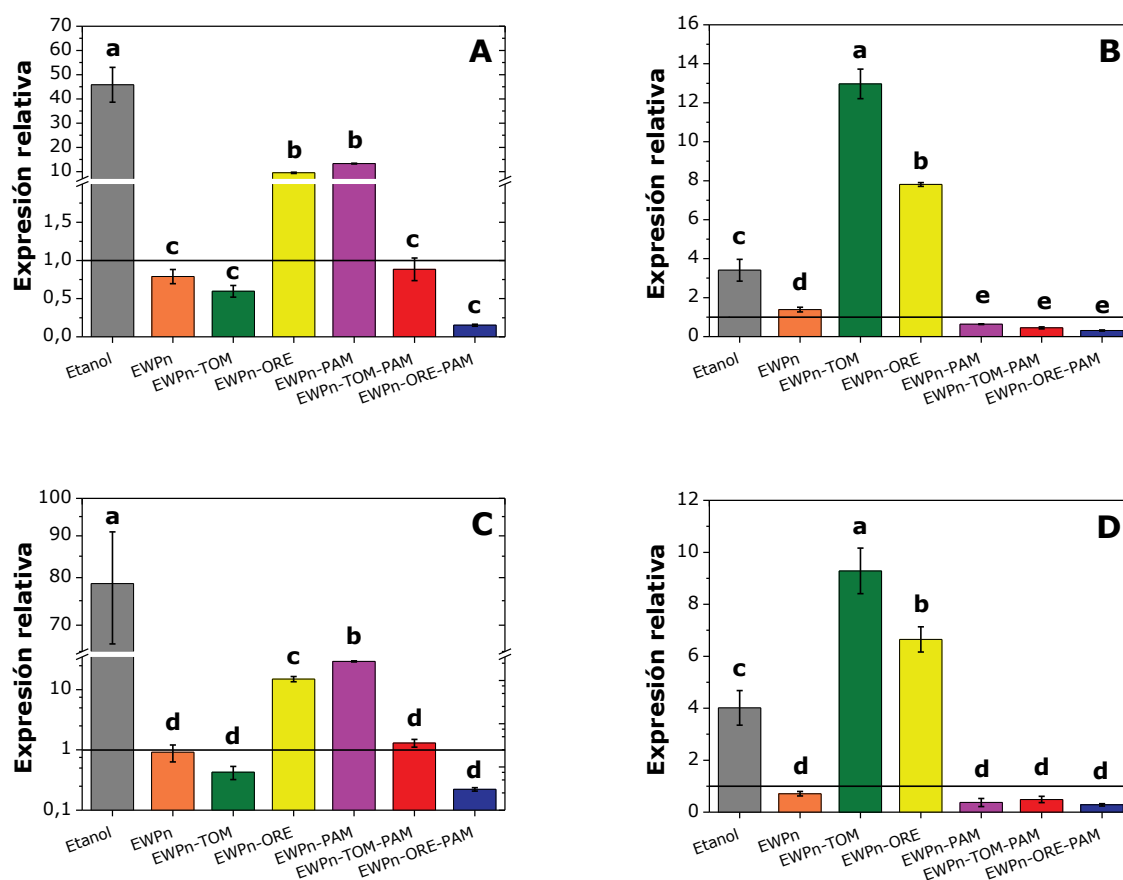
Por otro lado, prácticamente no se observó modulación de la expresión de GLUT2 por parte de los sistemas EWPn y EWPn-TOM-PAM ( $0,92 \pm 0,29$  y  $1,30 \pm 0,19$ , respectivamente) en células incubadas durante 6 h, mientras que el nivel de expresión de dicho gen fue notablemente incrementado en células incubadas en presencia de EWPn-ORE y EWPn-PAM ( $15,04 \pm 1,51$  y  $29,45 \pm 0,63$ , respectivamente) al cabo del mismo tiempo (Fig. 15C). Contrariamente, GLUT2 fue expresado en bajos niveles cuando las células fueron enfrentadas a los sistemas EWPn-TOM y EWPn-ORE-PAM ( $0,43 \pm 0,11$  y  $0,22 \pm 0,01$ , respectivamente) durante 6 h. Sin embargo, cuando las células se incubaron durante 24 h se observó el mismo comportamiento que en el análisis de la expresión de SGLT1. En este caso, la expresión relativa de GLUT2 aumentó considerablemente cuando las células fueron incubadas en presencia de EWPn-TOM hasta alcanzar un valor de  $9,28 \pm 0,88$ , mientras que los niveles de expresión inducidos por EWPn-PAM y EWPn-TOM-PAM ( $0,37 \pm 0,16$  y  $0,49 \pm 0,12$ , respectivamente) disminuyeron notablemente respecto al nivel expresado luego de 6 h de tratamiento (Fig. 15D).

Además, la expresión de SGLT1 y GLUT2 en células Caco-2 fue altamente inducida por el etanol (control de solvente), fundamentalmente luego de 6 h de incubación. Este comportamiento podría deberse a un efecto agudo del etanol residual como modulador transitorio de la permeabilidad y señalización celular en enterocitos (352). Sin embargo, ninguno de los sistemas evaluados exhibió tal efecto, lo que podría sugerir que una fracción o la totalidad del etanol empleado en la obtención de los sistemas podría haberse evaporado en cualquiera de las etapas de producción, o bien permanecer entrampado dentro de la matriz, evitando su interacción con las células.

A partir de estos resultados, fue posible observar que el sistema EWPn-ORE-PAM presentó un destacado efecto inhibitor de la expresión de SGLT1 y GLUT2 en células Caco-2, luego de 6 y 24 h de incubación. Así, los valores de expresión relativa de estos genes resultaron notablemente menor al valor de

referencia en ambas condiciones de tiempo de incubación únicamente cuando las células fueron enfrentadas al sistema EWPn-ORE-PAM.

Finalmente, los bajos niveles de expresión de ambos genes observados para los sistemas EWPn-TOM-PAM y EWPn-ORE-PAM luego de 24 h de incubación, y los altos niveles inducidos por EWPn-TOM y EWPn-ORE, confirmarían nuevamente la protección de los nanocomplejos EWPn-AE mediante la deposición electrostática de PAM sobre su superficie. Además, el PS promovería la liberación controlada del AE, atenuando la interacción con los componentes de las vías de señalización.



**Figura 15.** Expresión relativa de SGLT1 evaluada a 6 h (A) y 24 h (B) y de GLUT2 evaluada a 6 h (C) y 24 h (D) en células Caco-2 incubadas en presencia de los sistemas EWPn (■), EWPn-TOM (■), EWPn-ORE (■), EWPn-PAM (■), EWPn-TOM-PAM (■) y EWPn-ORE-PAM (■). Etanol (■) fue utilizado como control de solvente. Cada barra representa el promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4.3. Obtención de polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub>

##### 4.4.3.1. Recuperación de sólidos

La recuperación de sólidos (RS), expresada como %, de los polvos EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub> y EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub> y del polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub> se presenta en la [Tabla 12](#). Como se puede observar, el polvo que encapsuló TOM evidenció una RS significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el polvo que encapsuló ORE ( $60,95 \pm 4,41$  y  $51,40 \pm 6,94\%$ , respectivamente). Sin embargo, los valores de RS de EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub> y EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub> resultaron significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que el valor del polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub> ( $97,30 \pm 0,90\%$ ). Este comportamiento indicaría que la cantidad de polvo recuperada tras la liofilización de los coacervados complejos estaría influenciada por la presencia o ausencia de AE encapsulado y, en el caso de polvos con AE incorporado, por el tipo específico de AE encapsulado.

**Tabla 12.** Valores de RS (%) correspondientes a los polvos EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub>, EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub> y al polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub>. Resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Polvo	RS (%)
EWPn–PAM <sub>liof</sub>	$97,30 \pm 0,90^a$
EWPn–TOM–PAM <sub>liof</sub>	$60,95 \pm 4,41^b$
EWPn–ORE–PAM <sub>liof</sub>	$51,40 \pm 6,94^c$

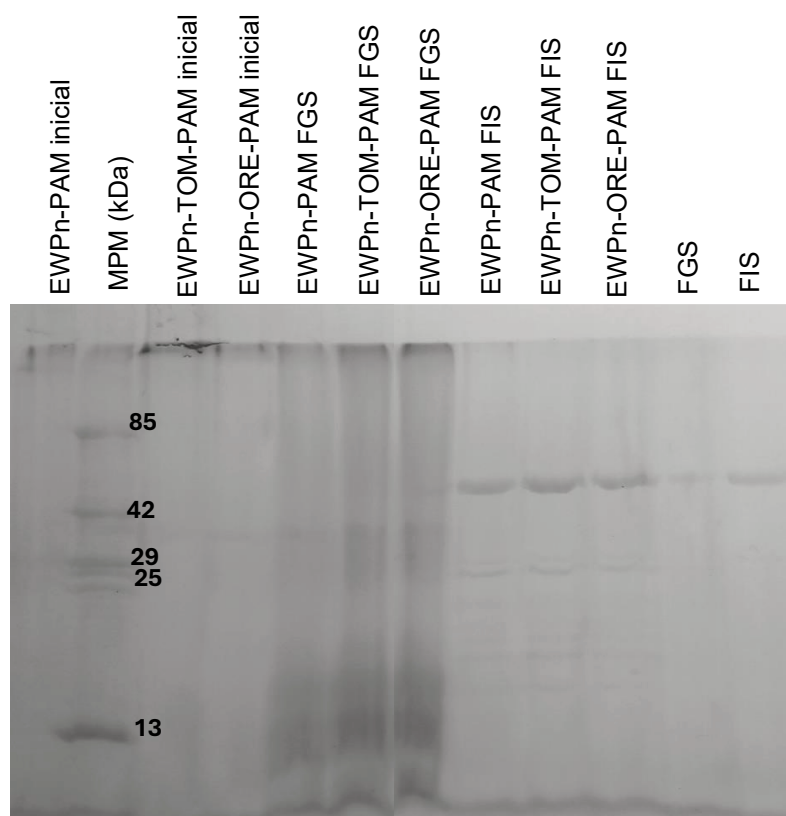
#### 4.4.4. Digestión gastrointestinal *in vitro* de polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub>

##### 4.4.4.1. SDS-PAGE

Una vez que los polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub> fueron sometidos al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*, se llevó a cabo el análisis de los digestos obtenidos mediante SDS-PAGE.

La [Fig. 16](#) muestra el gel obtenido a través de SDS-PAGE correspondiente a los polvos EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub> y EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub> antes (inicial) y después de la digestión gástrica e intestinal *in vitro*. El polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub> fue evaluado del mismo modo y, además, se agregaron los controles FGS + pepsina (FGS en la [Fig. 16](#)) y FIS + pancreatina + SB (FIS en la [Fig. 16](#)). Como se puede observar, el control FGS + pepsina exhibió una delgada banda de aproximadamente 60 kDa, la cual correspondería a la pepsina. Asimismo, el control FIS + pancreatina + SB evidenció una banda de PM similar pero mayor intensidad, la cual correspondería a la pancreatina ([320](#)).

Antes de la digestión *in vitro*, los polvos EWPn-AE-PAM<sub>ltof</sub> y el polvo control EWPn-PAM<sub>ltof</sub> exhibieron una delgada banda que no ingresó al gel. Este comportamiento sugiere que los coacervados presentarían gran tamaño y, por lo tanto, permanecen en el gel de apilamiento.



**Figura 16.** SDS-PAGE para EWPn-PAM<sub>ltof</sub>, EWPn-TOM-PAM<sub>ltof</sub> y EWPn-ORE-PAM<sub>ltof</sub> antes (inicial) y después de la digestión gástrica e intestinal. Las enzimas pepsina (FGS) y pancreatina + sal biliar (FIS) fueron incluidas como control. MPM: marcador de peso molecular en kDa.

Por otro lado, la Fig. 17 muestra el gel obtenido a través de SDS-PAGE correspondiente a EWPn antes (inicial) y después de la digestión gástrica (FGS) e intestinal (FIS) *in vitro*. Como se puede observar, EWPn sin digerir (inicial) evidenció un comportamiento similar a EWPn-AE-PAM<sub>ltof</sub> y EWPn-PAM<sub>ltof</sub> bajo la misma condición, presentando una banda en el gel de apilamiento que no fue capaz de ingresar al gel separador. Esto fue consistente con lo reportado por Visentini y col. (2020) (320), quienes observaron que nanopartículas de OVA obtenidas mediante tratamiento térmico no ingresaron al gel separador debido a su tamaño.

El polvo control EWPn-PAM<sub>ltof</sub> sometido a digestión gástrica evidenció dos comportamientos (Fig. 16). En primer lugar, exhibió una banda en el gel de apilamiento, indicando que esa fracción proteica no

fue capaz de ingresar al gel separador. En segundo lugar, se observó una tinción difusa abarcando todo el rango de PMs, sin la presencia de bandas definidas. Esto indicaría la existencia de partículas biopoliméricas de gran tamaño aún posteriormente a la digestión gástrica, sugiriendo que PAM protegería de forma parcial a EWPn de la hidrólisis provocada por la pepsina. Bajo condiciones gástricas (pH 3), PAM presentaría carga neta negativa mientras que EWPn carga neta positiva, tal como fue evaluado en la Fig. 11B. De este modo, las interacciones electrostáticas asociativas entre ambos biopolímeros harían que EWPn se encuentre menos susceptible a la hidrólisis por pepsina (353,354). Sin embargo, la tinción que abarcó desde altos hasta bajos PMs sugiere que una fracción de EWPn habría sido parcialmente digerida, liberando fragmentos de polipéptidos.

Como se puede observar en la Fig. 17, EWPn sometida a digestión gástrica presentó un comportamiento similar al polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub>. En este caso, la modificación estructural que sufre la proteína debido al tratamiento térmico (desnaturalización y agregación) incrementaría la accesibilidad de la pepsina a los sitios de clivaje en la digestión enzimática (118,355). Es importante resaltar que la deposición electrostática de PAM sobre la superficie de EWPn otorgaría solo protección parcial contra la acción de la pepsina gástrica.

Luego de la digestión gástrica, los polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub> exhibieron un comportamiento similar al polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub> bajo las mismas condiciones (Fig. 16).

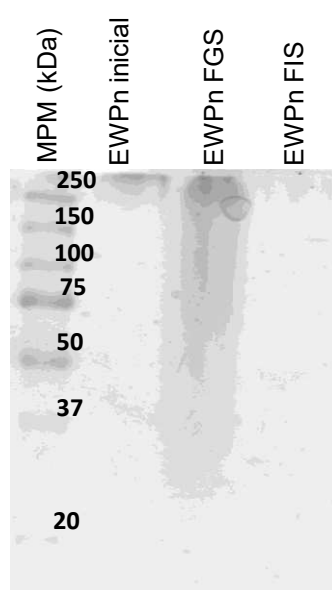
Por otro lado, el polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub> sometido a digestión intestinal evidenció una banda definida cerca de los 60 kDa, la cual podría corresponder a la pancreatina, y dos bandas delgadas más tenues de 13 y 29 kDa, aproximadamente (Fig. 16). La presencia de estas bandas definidas sugiere que ciertos fragmentos de polipéptidos resistirían al proceso de digestión intestinal *in vitro*.

Al analizar la Fig. 17, se puede observar que EWPn no presentó bandas luego de la digestión intestinal. Esto sugiere la hidrólisis completa de la nanopartícula o la generación de péptidos pequeños (menores a 12 kDa), los cuales no podrían ser retenidos por el gel. Otros autores también reportaron una digestión completa al evaluar la digestión intestinal de nanopartículas de OVA bajo condiciones similares (118,320). Bajo condiciones intestinales (pH 7), ambos biopolímeros (EWPn y PAM) presentarían carga neta negativa, según lo discutido anteriormente (Fig. 11B). De este modo, se promoverían las interacciones electrostáticas repulsivas entre la proteína y el PS y, consecuentemente, EWPn permanecería expuesta a la hidrólisis por acción de la tripsina. Alternativamente, se podría considerar que las SB con alta actividad superficial desplazarían al PS y desestabilizarían la conformación de la proteína, acelerando la proteólisis (354).

Nuevamente, los polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub> sometidos a digestión intestinal exhibieron un comportamiento similar al polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub> bajo las mismas condiciones (Fig. 16). Por su parte, Xiang y col. (2020) (356) desarrollaron sistemas OVA-pectina para encapsular vitamina D3 y evaluaron su comportamiento luego de la digestión gastrointestinal *in vitro*, obteniendo resultados

comparables con los del presente trabajo. A partir del análisis de SDS-PAGE, los autores concluyeron que el PS se asociaría a los aminoácidos hidrofóbicos del núcleo proteico y generaría una capa protectora, reduciendo de este modo la velocidad y el grado de digestión de la enzima.

Finalmente, es importante resaltar que la encapsulación de los AEs (TOM y ORE) no influyó en la proteólisis del coacervado proteína-PS. Además, este fenómeno tampoco sufrió alteraciones al variar la naturaleza química de los compuestos encapsulados. Estos resultados sugieren que el adecuado transporte y liberación de AEs en el organismo dependería principalmente del comportamiento del coacervado EWPn-PAM al ser sometido a la digestión gastrointestinal.



**Figura 17.** SDS-PAGE para EWPn antes (inicial) y después de la digestión gástrica (FGS) e intestinal (FIS). MPM: marcador de peso molecular en kDa.

#### 4.4.4.2. Distribución de tamaño de partícula y potencial $\zeta$

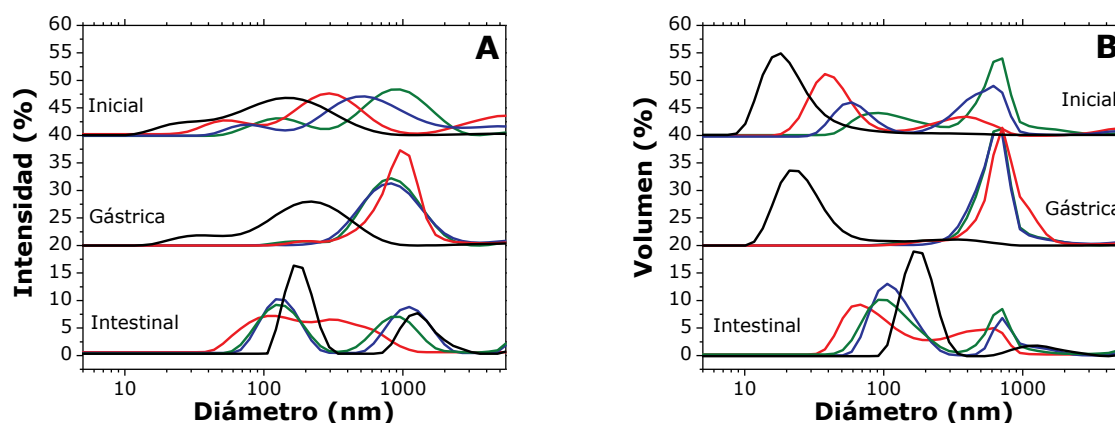
El efecto de las condiciones del tracto gastrointestinal sobre las propiedades coloidales de los coacervados desarrollados y la liberación de los AEs encapsulados en ellos puede evaluarse determinando el tamaño de partícula y el potencial  $\zeta$  luego de atravesar el proceso de digestión *in vitro* (321).

En la Fig. 18 se observan los gráficos de PSDi y PSDv (expresados en %) correspondientes a los polvos EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> antes (inicial) y después de la digestión gástrica (FGS + pepsina) e intestinal (FIS + pancreatina + SB). El polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> y EWPn también fueron evaluados del mismo modo y, además, se analizaron los controles FGS + pepsina y FIS + pancreatina + SB. Sin embargo, los controles FGS y FIS no evidenciaron picos en el gráfico PSDv (datos no mostrados), por



lo que no fueron incluidos en la discusión de los resultados. Con el objetivo de facilitar el análisis de los resultados, los valores de  $d_H$  (expresados en nm) y sus correspondientes volúmenes (expresados en porcentaje) también fueron registrados (Tabla 13).

Como se observa en la Fig. 18B, el control EWPn exhibió una curva monomodal en el gráfico de PSDv antes de la digestión gastrointestinal (pH 6). El pico se correspondió con un  $d_H$  de  $21 \pm 2$  nm, el cual representó un volumen del 98% (Tabla 13). Bajo esta misma condición, el polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> presentó un comportamiento diferente, exhibiendo una curva bimodal en el gráfico de PSDv (Fig. 18B). El  $d_H$  de la población de partículas más pequeñas resultó de  $146 \pm 50$  nm (35%) y el de las partículas más grandes fue de  $985 \pm 205$  nm (64%). Debido a que PAM tiene un  $d_H$  de aproximadamente 900 nm, fue posible deducir que la población de mayor tamaño correspondería al coacervado proteína-PS, mientras que la presencia de una población de menor tamaño podría atribuirse a la formación de algunas asociaciones macromoleculares secundarias entre EWPn y PAM (331,357). Además, este resultado fue consistente con el análisis de SDS-PAGE, en el cual se reportó que el coacervado proteína-PS fue retenido en el gel de apilamiento debido a su gran tamaño (Fig. 16).



**Figura 18.** Distribución de tamaño de partícula (PSD) en función de la intensidad (%) (A) y del volumen (%) (B) para EWPn (■), EWPn-PAM<sub>liof</sub> (■), EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> (■) y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> (■) antes (inicial) y después de la digestión gástrica (FGS + pepsina) e intestinal (FIS + pancreatina + sal biliar).

En la Fig. 19 se presenta el potencial  $\zeta$  (expresado en mV) correspondiente a los polvos EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> antes (inicial) y después de la digestión gástrica (FGS + pepsina) e intestinal (FIS + pancreatina + SB). El polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub>, EWPn y PAM también fueron evaluados del mismo modo y, además, se analizaron los controles FGS + pepsina y FIS + pancreatina + SB. Como se mencionó anteriormente, los controles FGS y FIS no evidenciaron picos en el gráfico de PSDv (datos no mostrados), por lo que no fueron considerados en la discusión. Como se puede observar,

antes de la digestión (pH 6) EWPn y PAM exhibieron valores de potencial  $\zeta$  de  $-28,0 \pm 1,0$  mV y  $-19,2 \pm 0,6$  mV, respectivamente, mientras que el polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> presentó un valor de potencial  $\zeta$  negativo e intermedio a los dos anteriores ( $-24,9 \pm 0,2$  mV), lo que sugiere la interacción entre ambos biopolímeros.

Por otro lado, el polvo EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> evidenció una curva bimodal en el gráfico de PSDv antes de la digestión (pH 6), con una población de partículas de menor tamaño con  $d_H$  de  $60 \pm 7$  nm (70%) y otra de mayor tamaño cuyo  $d_H$  resultó de  $328 \pm 47$  nm (29%) (Fig. 18B y Tabla 13). El polvo EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> también exhibió una curva bimodal en el gráfico de PSDv bajo las mismas condiciones. Sin embargo, las poblaciones de partículas presentaron  $d_H$  de  $83 \pm 9$  nm (34%) y  $844 \pm 220$  nm (60%).

Antes de la digestión (pH 6), el potencial  $\zeta$  de los polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> fue de -27 mV, aproximadamente. Este valor fue significativamente más negativo ( $p < 0,05$ ) que el polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub>, sugiriendo que las cargas en los AEs modificarían la interacción entre EWPn y PAM (Fig. 19).

Las diferencias que existieron en la PSD de los polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> y el polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> podrían deberse a las interacciones fisicoquímicas que ocurren entre los componentes involucrados. Específicamente, la naturaleza química de los componentes de TOM y ORE podría ser un factor determinante en la formación de asociaciones macromoleculares entre los biopolímeros, lo que daría lugar a modificaciones en la PSD. Además, las propiedades intrínsecas de cada AE determinarían el modo de unión a EWPn, motivo por el cual el comportamiento coloidal de EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> habría resultado diferente al de EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub>. De este modo, se resalta la importancia de considerar la naturaleza química de los compuestos bioactivos al momento de diseñar y optimizar sistemas de encapsulación.

Luego de la digestión gástrica (pH 3), EWPn evidenció una población de partículas claramente predominante (86%), con un  $d_H$  de  $37 \pm 13$  nm (Tabla 13). Como se expone en la Tabla 13, no hubo cambios significativos ( $p < 0,05$ ) en los valores de  $d_H$  de EWPn antes (inicial) y después de la digestión gástrica. Este comportamiento sería inconsistente con el análisis de SDS-PAGE, en el cual se evidenciaron bandas no definidas luego de la digestión gástrica de EWPn (Fig. 17). Sin embargo, se debe considerar que ciertas diferencias experimentales entre ambas técnicas pueden conducir a resultados diferentes. Como puede observarse en la Tabla 13, la digestión gástrica de EWPn presentó una población minoritaria de partículas con  $d_H$  de  $249 \pm 34$  nm (11%), la cual podría ser el resultado de asociaciones entre fragmentos de péptidos (interacciones hidrofóbicas, principalmente).

Al evaluar el polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> luego de la digestión gástrica (pH 3), se observó una curva monomodal en el gráfico de PSDv, cuya población de partículas evidenció un  $d_H$  de  $919 \pm 90$  nm (94%) (Fig. 18B y Tabla 13). Nuevamente, las diferencias con el análisis de SDS-PAGE sugieren que este pico podría corresponder a asociaciones entre fragmentos de péptidos de bajo PM. Además, bajo esta

condición de pH EWPn obtuvo un valor de potencial  $\zeta$  positivo ( $18,2 \pm 0,4$  mV), mientras que PAM exhibió un valor negativo ( $-11,1 \pm 0,6$  mV), por lo que el pico en la PSDv podría deberse también a las interacciones electrostáticas (atracción) entre estos biopolímeros, las cuales no ocurrirían en el gel debido a las condiciones propias de la técnica.

Por otro lado, los polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub> sometidos a digestión gástrica (pH 3) evidenciaron un comportamiento similar al polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub> (bajo las mismas condiciones) en el gráfico de PSDv (Fig. 18B). En este caso, los valores de  $d_H$  de EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub> y EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub> resultaron  $998 \pm 60$  nm (97%) y  $972 \pm 50$  nm (98%), y no hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre ellos (Tabla 13).

Luego de la digestión gástrica (pH 3), tanto los polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub> como el polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub> exhibieron valores de potencial  $\zeta$  cercanos a -10 mV, sugiriendo que PAM determinaría la carga eléctrica de los digestos (Fig. 19). Estos resultados indicarían que la incorporación de los AEs no influiría sobre el comportamiento coloidal del coacervado proteína-PS durante la digestión gástrica. Además, dado que los polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub> no presentaron variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) en su  $d_H$  respecto al polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub>, se podría considerar la estabilidad coloidal del coacervado cuando vehiculiza AE a nivel gástrico.

Finalmente, la PSD de EWPn fue evaluada luego de la digestión intestinal (pH 7), evidenciando una población de partículas claramente predominante con un  $d_H$  de  $181 \pm 14$  nm (87%) (Tabla 13). El aumento de tamaño con respecto a la condición inicial podría deberse a asociaciones entre fragmentos de polipéptidos hidrofóbicos generados a partir de la proteólisis enzimática. Sin embargo, estas asociaciones no se observaron en el gel de SDS-PAGE, ya que bajo condiciones intestinales EWPn no presentó bandas (Fig. 17). Este fenómeno sugiere que los péptidos de bajo PM que no pudieron ser retenidos en el gel separador sólo podrían interactuar y formar ensamblados más grandes en la técnica de DLS. Otros autores informaron resultados similares luego de la digestión de nanopartículas de OVA obtenidas mediante tratamiento térmico (320,358).

Como se puede observar en la Fig. 18B, el polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub> exhibió una PSDv bimodal bajo condiciones intestinales (pH 7). La población de partículas que presentó el mayor volumen (67%) evidenció un  $d_H$  de  $139 \pm 3$  nm, mientras que el  $d_H$  de la población con menor volumen (32%) resultó de  $961 \pm 63$  nm (Tabla 13). El comportamiento coloidal del polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub> luego de la digestión intestinal fue similar al que presentó antes del proceso de digestión, pero difirió sustancialmente del comportamiento expuesto bajo condiciones gástricas. Los picos observados en la Fig. 18B podrían corresponder a PAM, asociaciones entre PAM y péptidos derivados de la proteólisis de EWPn, o asociaciones entre fragmentos de polipéptidos.

En el caso de los polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub>, se evidenció comportamiento coloidal dependiente del AE encapsulado. Aunque tanto EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub> como EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub> presentaron PSDv

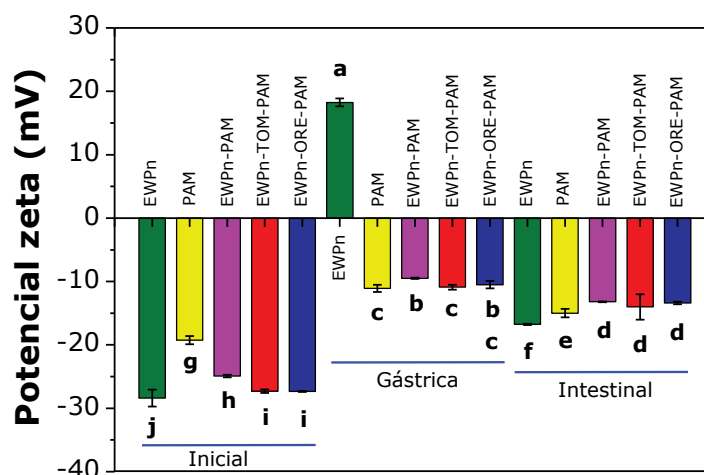
bimodal, se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los valores de  $d_H$  de sus poblaciones de partículas (Fig. 18B y Tabla 13). El polvo EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub> evidenció una población de menor tamaño con  $d_H$  de  $109 \pm 32$  nm (63%) y una de mayor tamaño con  $d_H$  de  $440 \pm 197$  nm (37%). Por su parte, la población de partículas de menor tamaño correspondiente al polvo EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub> presentó un  $d_H$  de  $125 \pm 15$  nm (68%), y la de mayor tamaño un  $d_H$  de  $942 \pm 197$  nm (32%).

**Tabla 13.** Valores de diámetro hidrodinámico ( $d_H$ , nm) y volumen (%) de EWPn, EWPn-PAM<sub>liof</sub>, EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> antes (inicial) y después de la digestión gástrica e intestinal. Resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Fase	Sistema	$d_H$ (nm)	Volumen (%)
Inicial	EWPn	$21 \pm 2^g$	$98 \pm 2$
	EWPn-PAM <sub>liof</sub>	$146 \pm 50^{e,f}$	$35 \pm 10$
		$985 \pm 205^a$	$64 \pm 10$
	EWPn-TOM-PAM <sub>liof</sub>	$60 \pm 7^f$	$70 \pm 8$
		$328 \pm 47^{c,d}$	$29 \pm 8$
	EWPn-ORE-PAM <sub>liof</sub>	$83 \pm 9^f$	$34 \pm 6$
		$844 \pm 220^b$	$60 \pm 6$
Gástrica	EWPn	$37 \pm 13^g$	$86 \pm 1$
		$249 \pm 34^{d,e}$	$11 \pm 5$
	EWPn-PAM <sub>liof</sub>	$919 \pm 90^{a,b}$	$94 \pm 1$
	EWPn-TOM-PAM <sub>liof</sub>	$998 \pm 60^a$	$97 \pm 1$
	EWPn-ORE-PAM <sub>liof</sub>	$972 \pm 50^a$	$98 \pm 1$
Intestinal	EWPn	$181 \pm 14^{e,f}$	$87 \pm 6$
	EWPn-PAM <sub>liof</sub>	$139 \pm 3^{e,f}$	$67 \pm 1$
		$961 \pm 63^{a,b}$	$32 \pm 2$
	EWPn-TOM-PAM <sub>liof</sub>	$109 \pm 32^f$	$63 \pm 3$
		$440 \pm 197^c$	$37 \pm 3$
	EWPn-ORE-PAM <sub>liof</sub>	$125 \pm 15^{e,f}$	$68 \pm 8$
		$942 \pm 197^{a,b}$	$32 \pm 8$

Como se aprecia en la Fig. 19, los valores de potencial  $\zeta$  del polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> y de los polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> resultaron negativos (cerca de -14 mV) y no presentaron diferencias significativas entre ellos ( $p < 0,05$ ). Estos resultados sugieren la influencia de las condiciones intestinales sobre la estabilidad coloidal de los sistemas, e indicarían posibles interacciones entre los AEs, el coacervado

proteína-PS y los componentes de la fase intestinal, lo que podría afectar la liberación y bioaccesibilidad de los compuestos activos.



**Figura 19.** Potencial  $\zeta$  (mV) de EWPn (■), PAM (■), EWPn-PAM<sub>liof</sub> (■), EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> (■) y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> (■) antes (inicial) y después de la digestión gástrica e intestinal. Cada barra representa el promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Es importante resaltar que los resultados derivados de la técnica de DLS no podrían ser comparados directamente con aquellos obtenidos mediante SDS-PAGE sin considerar las diferencias elementales que existen entre ambas metodologías. En primer lugar, las muestras gástricas e intestinales evaluadas a partir de la técnica DLS se encontraron a pH 3,0 y 7,0, respectivamente. De este modo, diversas interacciones hidrofóbicas y electrostáticas podrían ocurrir entre los componentes presentes en la muestra. Contrariamente, al evaluar las muestras mediante SDS-PAGE, es necesaria la adición de un *buffer* conteniendo Tris-HCl 50 mM a pH 6,8 y SDS. Como ya se conoce, el SDS es un surfactante que debilita las interacciones hidrofóbicas, desnaturaliza proteínas y neutraliza sus cargas, otorgando carga negativa proporcional a su PM (359). Por este motivo, las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas que podrían analizarse en DLS no existirían en las muestras de SDS-PAGE.

Los resultados obtenidos mediante DLS indicarían un considerable impacto del entorno gastrointestinal en las propiedades coloidales de EWPn-PAM<sub>liof</sub> y EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> y en la liberación de los AEs. Antes de la digestión, la deposición electrostática de PAM sobre la superficie de EWPn provocó cambios en la PSD, aún en presencia de AE. Por otro lado, la presencia de AE no pareció influir significativamente en el comportamiento coloidal durante la digestión gástrica.

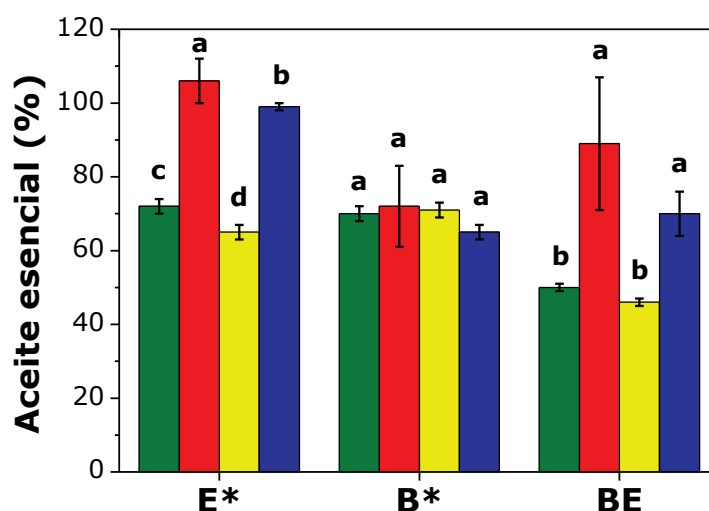
Durante la digestión intestinal, los resultados obtenidos para el polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> fueron similares, pero la PSD<sub>v</sub> y los valores de d<sub>H</sub> variaron considerablemente al analizar el polvo EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub>. Este comportamiento sugiere la influencia de la naturaleza química de los compuestos presentes en los AEs sobre la estabilidad coloidal de los sistemas bajo condiciones intestinales. De este modo, se resalta la importancia de considerar la composición química de los AEs al momento de diseñar sistemas de encapsulación capaces de vehicular compuestos bioactivos por el tracto digestivo para asegurar su eficacia y estabilidad.

#### 4.4.4.3. Estabilidad y bioaccesibilidad de AE

En la Fig. 20 se presenta el gráfico de estabilidad (E\*), bioaccesibilidad (B\*) y bioaccesibilidad efectiva (BE), expresadas como porcentaje de AE, correspondientes a los polvos EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> y a TOM y ORE libres (AEs no encapsulados) después de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

En primer lugar, la concentración de AE que no sufrió transformaciones luego del proceso de digestión (E\*) fue significativamente más alta ( $p < 0,05$ ) para los polvos EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> (aproximadamente 100% en ambos casos) que para los AEs libres ( $72,2 \pm 6,8\%$  para TOM y  $65,3 \pm 0,1\%$  para ORE). Estos resultados indicarían que el coacervado proteína-PS utilizado para encapsular los AEs presentó un efecto protector, siendo capaz de reducir y/o prevenir la degradación química del AE durante la digestión gastrointestinal *in vitro*. La degradación de AE libre podría atribuirse a cambios en el pH (a medida que transcurre el proceso de digestión), y a interacciones entre los compuestos presentes en el AE y componentes de los jugos digestivos, tales como enzimas y electrolitos (340,360,361). Por otro lado, la diferencia en la E\* reportada entre TOM y ORE sugiere que ciertos compuestos bioactivos presentes en los AEs podrían ser más sensibles que otros a los cambios de pH durante la digestión y/o a los componentes de los fluidos.

Posteriormente, la B\* de TOM y ORE (libres y encapsulados en el coacervado proteína-PS) fue evaluada determinando la concentración de AE en la fase micelar luego de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Como se observa en la Fig. 20, no hubo diferencias significativas en la B\* de EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub>, EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub>, TOM y ORE, la cual resultó en todos los casos cercana al 70%. Estos resultados permiten hipotetizar que la encapsulación de AE del modo que fue indicado en el presente trabajo no optimizaría la B\*, y podrían explicarse considerando que EWPn-PAM inhibiría la liberación de AE intacto (sin transformaciones químicas) hacia las micelas formadas por los componentes del fluido intestinal. Como se ha reportado previamente, los AEs incorporados en micelas mixtas serían accesibles para la absorción en el intestino delgado, lo que facilita su biodisponibilidad (337). No obstante, cabe destacar que la cantidad de AE bioaccesible correspondiente a los polvos EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> fue considerablemente alta.



**Figura 20.** Estabilidad (E\*), bioaccesibilidad (B\*) y bioaccesibilidad efectiva (BE) de TOM (■), EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> (■), ORE (■) y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> (■) después de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Cada barra representa el promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ). El ANOVA fue realizado independientemente para cada parámetro.

Por otro lado, el análisis de los polvos EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> mediante SDS-PAGE expuso la digestión extensiva sufrida por la proteína en condiciones intestinales (Fig. 16). Bajo esta situación, se liberarían péptidos de bajo PM y, consecuentemente, se expondrían los AEs. Debido a que los AEs libres y encapsulados presentaron similar B\*, es posible hipotetizar que los componentes digeridos impedirían la transferencia de AE hacia micelas mixtas. Así, los AEs estarían interactuando o asociándose a péptidos hidrofóbicos generados en el proceso de digestión, lo que disminuiría su disponibilidad para ser incorporados en las micelas.

Del mismo modo, Cheng y col. (2019) (362) reportaron que la B\* de luteína disminuyó un 42% luego de su encapsulación en nanopartículas de zeína. Por otro lado, Gaur y col. (2018) (363) encapsularon carvacrol y ORE en complejos de inclusión de  $\beta$ -ciclodextrina e informaron que la B\* de carvacrol disminuyó de 54 a 7% y la B\* de ORE se redujo de 78 a 7,7% luego de la incorporación en los complejos. Los autores indicaron que el comportamiento observado podría deberse a una limitada degradación de  $\beta$ -ciclodextrina a través de enzimas gástricas y pancreáticas. Contrariamente, Niaz y col. (2021) (364) registraron un incremento en la B\* de carvacrol luego de ser encapsulado en nanopartículas de tipo núcleo-coraza conformadas por quitosano y albúmina sérica bovina. En otro trabajo, se utilizaron partículas de almidón modificado multicapa para encapsular ORE, logrando de este modo el aumento de la B\* de 15 a 50% (340). A partir de lo expuesto, fue posible concluir que la B\* de los AEs dependería fuertemente de



los componentes del sistema de encapsulación, del grado de digestión y de las interacciones con los componentes del fluido intestinal (enzimas, SB, etc.).

Finalmente, se determinó la fracción de AE total ingerido presente en la fase micelar y disponible para la absorción (BE) correspondiente a los polvos EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub> y EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub>, y a TOM y ORE libres, luego de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Como se exhibe en la Fig. 20, la BE fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) cuando TOM y ORE se encontraron encapsulados en el coacervado proteína-PS. El polvo EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub> y TOM libre presentaron BE de  $89 \pm 18\%$  y  $50 \pm 1\%$ , respectivamente, mientras que la BE del polvo EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub> y de ORE libre resultó  $70 \pm 6\%$  y  $46 \pm 1\%$ , respectivamente. Este comportamiento estaría relacionado con la mayor  $E^*$  que presentan los AEs encapsulados en el coacervado proteína-PS, respecto a los AEs libres.

A partir del análisis de  $E^*$ ,  $B^*$  y BE, fue posible concluir que los sistemas EWPn–PAM desarrollados en el presente trabajo serían capaces de proteger a los AEs de la degradación química, lo cual es sustentado por la mayor BE obtenida a partir de los polvos EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub> y EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub> con respecto a la BE de los AEs libres.

#### 4.4.4.4. Actividad antioxidante

##### 4.4.4.4.1. Capacidad de captación de radical ABTS<sup>+</sup>

El desbalance entre ROS y los sistemas antioxidantes endógenos desencadena estrés oxidativo, el cual es un estado fisiológico que juega un rol clave en DM2. Así, compuestos capaces de reducir o neutralizar ROS han sido extensivamente estudiados como una potencial estrategia terapéutica para controlar la DM2 (5).

Numerosos trabajos han demostrado la capacidad antioxidante de TOM y ORE mediante diferentes técnicas *in vitro* (247,254,365,366). Por otro lado, algunos estudios han evaluado el efecto de la digestión gastrointestinal de compuestos fenólicos sobre la actividad antioxidante (324,367). Sin embargo, existen escasos trabajos que reporten la digestión gastrointestinal de coacervados complejos proteína-PS que encapsulan AE y que, posteriormente, evalúen la actividad antioxidante de los compuestos bioactivos. Por lo tanto, el análisis de la actividad antioxidante de los polvos EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub> y EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub>, del polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub> y de TOM y ORE libres, antes y después de la digestión *in vitro* resulta indispensable al momento de evaluar y caracterizar el sistema de encapsulación desarrollado, y su influencia sobre las propiedades biológicas de los AEs.

En la Fig. 21A se presenta la capacidad de captación de radical ABTS<sup>+</sup> ( $C_{ABTS^+}$ , expresada como %) de los polvos EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub> y EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub>, del polvo control EWPn–PAM<sub>liof</sub> y de TOM y ORE libres, antes (condición inicial) y después de la digestión gástrica e intestinal. Siguiendo la misma

metodología, también se evaluó una solución de PAM a modo de control. Sin embargo, no evidenció  $C_{ABTS+}$  (datos no mostrados).

Como se observa en la Fig. 21A, el polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> evidenció baja  $C_{ABTS+}$  antes de la digestión (condición inicial). Sin embargo, luego de atravesar el proceso de digestión gastrointestinal, su capacidad antioxidante se incrementó notablemente, alcanzando un porcentaje de captación de  $57,3 \pm 3,0\%$ . Este comportamiento podría deberse a los péptidos antioxidantes liberados por proteólisis durante el proceso digestivo. Como se ha demostrado previamente, algunos péptidos liberados tienen actividad antioxidante más alta que la correspondiente a la proteína precursora, debido a la exposición de ciertos residuos de aminoácidos antioxidantes (261,368). Asimismo, está bien establecido que péptidos bioactivos provenientes de EWP son potentes antioxidantes (121,369).

Por otro lado, la  $C_{ABTS+}$  de TOM libre antes y después de la digestión gástrica no presentó variación significativa ( $p < 0,05$ ), exhibiendo valores de  $21,7 \pm 0,5\%$  y  $23,7 \pm 0,0\%$ , respectivamente (Fig. 21A). Sin embargo, luego de la digestión intestinal la capacidad antioxidante disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ), hasta un valor de  $19,4 \pm 0,2\%$ . En el caso de ORE libre, la  $C_{ABTS+}$  más alta fue observada antes de la digestión (condición inicial), con un valor de  $38,8 \pm 0,3\%$ , y disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) luego de la digestión gástrica ( $33,9 \pm 0,3\%$ ) e intestinal ( $26,3 \pm 0,5\%$ ) (Fig. 21A). Como se discutió previamente, los AEs libres presentaron valores de  $E^*$  por debajo de 72%, indicando cierta susceptibilidad a la degradación química bajo condiciones gastrointestinales. De este modo, una concentración menor de compuestos en su forma bioactiva resultaría en una pérdida parcial de su actividad antioxidante. Cabe destacar que ORE libre fue significativamente ( $p < 0,05$ ) más efectivo para captar radicales  $ABTS^+$  que TOM libre, tanto antes como después de la digestión gástrica e intestinal, aún cuando sus correspondientes valores de BE resultaron similares (Fig. 20). Este comportamiento sugiere que los compuestos presentes en ORE presentarían mayor  $C_{ABTS+}$  que los compuestos presentes en TOM.

Como se observa en la Fig. 21A, no hubo cambios significativos ( $p < 0,05$ ) en la  $C_{ABTS+}$  correspondiente al polvo EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> antes (inicial) y después de la digestión gástrica ( $44,2 \pm 2,3\%$  y  $42,6 \pm 0,4\%$ , respectivamente). Sin embargo, la actividad antioxidante aumentó notablemente luego de la digestión intestinal, alcanzando un valor de  $67,1 \pm 1,6\%$ .

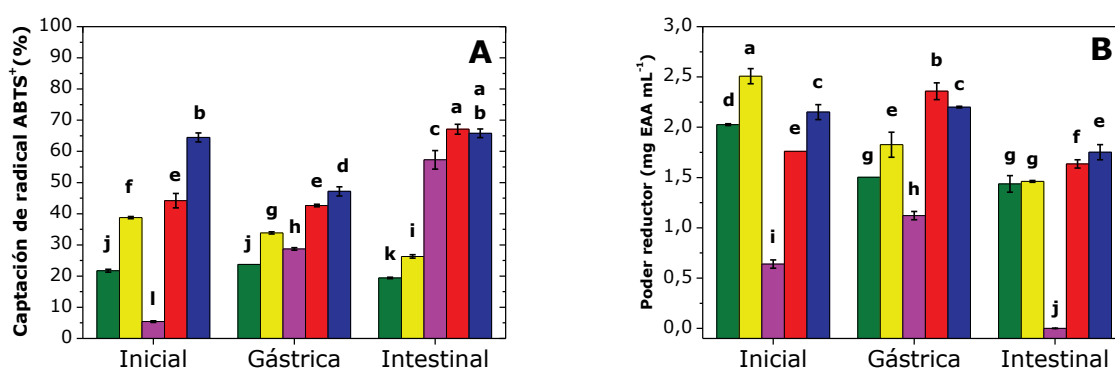
Luego de ser sometido a digestión gástrica, el polvo EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) la  $C_{ABTS+}$  de  $64,5 \pm 1,5\%$  a  $47,2 \pm 1,5\%$  (Fig. 21A). Sin embargo, bajo condiciones intestinales la actividad antioxidante aumentó nuevamente hasta un valor de  $65,8 \pm 1,4\%$ . En contraste, Castaldo y col. (2021) (324) reportaron que cápsulas de hidroxipropilmetilcelulosa o gelatina, cargadas con extractos polifenólicos, presentaron menor  $C_{ABTS+}$  luego del proceso de digestión, con respecto a las cápsulas no digeridas.

Es importante resaltar que los polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> presentaron mayor actividad antioxidante que el polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> y los AEs libres, en todas las fases. Luego de la digestión

gastrointestinal *in vitro*, los polvos exhibieron capacidad de captación de radical cercana al 70%, mientras que los AEs libres sólo alcanzaron valores por debajo del 30%. De este modo, se destaca el beneficio de encapsular los AEs en el coacervado proteína-PS, si se requiere conservar buena actividad antioxidante luego de ser sometido al proceso de digestión completo.

Los resultados sugieren que el coacervado proteína-PS tendría un efecto protector sobre los AEs, previniendo y/o reduciendo su degradación química bajo condiciones gástricas e intestinales. Esta hipótesis sería consistente con lo reportado por Milea y col. (2019) (370), quienes demostraron que compuestos flavonoides encapsulados en hidrolizados de proteína de suero, maltodextrina y pectina fueron protegidos bajo condiciones gástricas e intestinales.

Una hipótesis alternativa para explicar la mayor actividad antioxidante de los polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> respecto al polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> y a los AEs libres sugiere que existiría un efecto aditivo o sinérgico entre los componentes bioactivos de los AEs y péptidos antioxidantes derivados de la digestión de EWPn. En particular, Wang y col. (2020) (228) encapsularon curcumina en EWP y observaron un efecto sinérgico entre estos componentes al evaluar la C<sub>ABTS+</sub>. En contraste, Zhang y col. (2019) (371) encapsularon  $\alpha$ -tocoferol y resveratrol en nanopartículas de zeína e informaron un efecto antagonista entre los componentes del sistema al estudiar la C<sub>ABTS+</sub>. Las diferencias entre los resultados de los estudios previos mencionados podrían atribuirse a que en ellos se emplean diversos materiales de encapsulación y compuestos bioactivos con diferentes propiedades intrínsecas, considerando también que las condiciones experimentales podrían variar entre un ensayo y otro.



**Figura 21.** Capacidad de captación de radical ABTS<sup>+</sup> (%) (A) y poder reductor (mg de equivalentes de ácido ascórbico (EAA) por mL de solución o digesto) (B) de TOM (■) y ORE (■) libres y polvos EWPn-PAM<sub>liof</sub> (■), EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> (■) y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> (■), antes (inicial) y después de la digestión gástrica e intestinal. Cada barra representa el promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.4.4.2. Poder reductor

En la Fig. 21B se muestra el poder reductor (PR, expresado como mg de EAA mL<sup>-1</sup> de solución o digesto) de los polvos EWPn–TOM–PAM<sub>lío</sub>f y EWPn–ORE–PAM<sub>lío</sub>f, del polvo control EWPn–PAM<sub>lío</sub>f y de TOM y ORE libres, antes (condición inicial) y después de la digestión gástrica e intestinal. Siguiendo la misma metodología, también se evaluó una solución de PAM a modo de control. Sin embargo, no evidenció PR (datos no mostrados).

En primer lugar, el PR del polvo control EWPn–PAM<sub>lío</sub>f aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) luego de ser sometido a digestión gástrica de  $0,6 \pm 0,0$  mg EAA mL<sup>-1</sup> a  $1,1 \pm 0,0$  mg EAA mL<sup>-1</sup> (Fig. 21B). Sin embargo, este mismo sistema bajo condiciones intestinales presentó un valor de PR cercano a cero. La carencia de actividad antioxidante de EWPn–PAM<sub>lío</sub>f luego de atravesar el proceso de digestión completo sugiere que el incremento en el grado de hidrólisis de EWPn (promovido por enzimas digestivas) influiría de forma negativa sobre su PR. Este comportamiento fue consistente con lo reportado en trabajos previos (369,372).

Como se observa en la Fig. 21B, TOM libre exhibió el mayor PR bajo condiciones iniciales ( $2,0 \pm 0,0$  mg EAA mL<sup>-1</sup>), y no hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los valores de PR luego de la digestión gástrica e intestinal ( $1,5 \pm 0,0$  y  $1,4 \pm 0,1$  mg EAA mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Por otro lado, ORE libre presentó un valor de PR significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) antes de la digestión ( $2,5 \pm 0,1$  mg EAA mL<sup>-1</sup>), y también se observó diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los valores de PR bajo condiciones gástricas y bajo condiciones intestinales ( $1,8 \pm 0,1$  y  $1,5 \pm 0,0$  mg EAA mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Del mismo modo que cuando se analizó la actividad antioxidante mediante la C<sub>ABTS+</sub>, el PR de los AEs libres fue negativamente influenciado por la digestión gastrointestinal. Bajo estas condiciones, los componentes de los AEs podrían sufrir modificaciones estructurales que afecten su actividad antioxidante. Además, la composición química de los AEs podría presentar variaciones luego del proceso de digestión, influenciando sus propiedades biológicas.

Antes de la digestión, el polvo EWPn–TOM–PAM<sub>lío</sub>f exhibió un valor de PR de  $1,8 \pm 0,0$  mg EAA mL<sup>-1</sup>, el cual aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) luego de la digestión gástrica, alcanzando un valor de  $2,4 \pm 0,1$  mg EAA mL<sup>-1</sup> (Fig. 21B). Luego de la digestión intestinal, dicho valor disminuyó nuevamente hasta  $1,6 \pm 0,0$  mg EAA mL<sup>-1</sup>, evidenciando la menor actividad antioxidante de EWPn–TOM–PAM<sub>lío</sub>f bajo estas condiciones. Con respecto al polvo EWPn–ORE–PAM<sub>lío</sub>f, no hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los valores de PR obtenidos antes ( $2,2 \pm 0,1$  mg EAA mL<sup>-1</sup>) y después de la digestión gástrica ( $2,2 \pm 0,0$  mg EAA mL<sup>-1</sup>). El valor de PR disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) hasta  $1,8 \pm 0,1$  mg EAA mL<sup>-1</sup> cuando EWPn–ORE–PAM<sub>lío</sub>f fue sometido a digestión intestinal. Es importante resaltar que, aunque el PR de los polvos EWPn–AE–PAM<sub>lío</sub>f resultó siempre menor bajo condiciones intestinales, los valores permanecieron considerablemente altos (cerca de  $1,7$  mg EAA mL<sup>-1</sup>).

Al analizar la fase intestinal, fue posible destacar que los AEs encapsulados exhibieron mayor poder reductor que los AEs libres, lo que sugiere, nuevamente, que existiría un efecto protector del coacervado proteína-PS sobre los compuestos bioactivos derivados de los AEs durante la digestión gastrointestinal *in vitro*. Debido a que el polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> no presentó poder reductor bajo condiciones intestinales, se descartarían efectos aditivos o sinérgicos entre los componentes de EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub>. Hasta el momento, escasos trabajos han reportado el poder reductor de compuestos fenólicos luego de la digestión gastrointestinal. En uno de ellos, los autores estudiaron compuestos fenólicos de extractos de pulpa de algarrobo libres y encapsulados, e informaron que el mayor poder reductor de los extractos libres fue alcanzado luego de la digestión oral y gástrica, mientras que los extractos encapsulados presentaron elevado poder reductor luego de la digestión intestinal.

#### 4.4.4.5. Actividad antidiabética

##### 4.4.4.5.1. Actividad inhibitoria de $\alpha$ -amilasa y $\alpha$ -glucosidasa

Como es bien sabido, el control de los niveles de glucosa en sangre es una importante herramienta para prevenir complicaciones de la DM2. Las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa hidrolizan el almidón liberando moléculas de glucosa y, cuando esto ocurre, los niveles de glucosa se incrementan en el torrente sanguíneo (373). La inhibición de estas enzimas de manera controlada podría prevenir potencialmente la elevación de los niveles de glucosa en sangre retardando la absorción de glucosa (374).

En la Fig. 22 se presenta la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -amilasa ( $A_{ami}$ ,  $IC_{50}$  expresado como  $\mu\text{g AE mL}^{-1}$  y como  $\text{mg proteína mL}^{-1}$ ) de los polvos EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub>, del polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> y de TOM y ORE libres, después de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

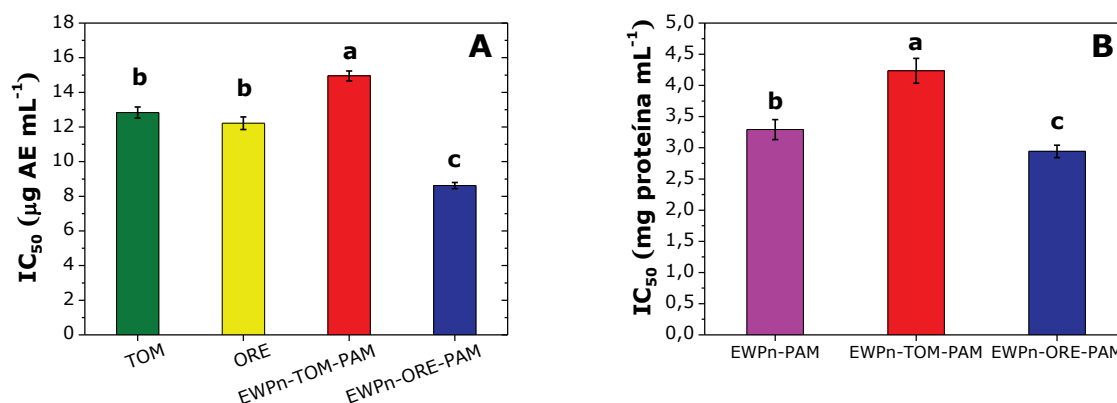
En primer lugar, al evaluar la  $A_{ami}$  de TOM y ORE libres se obtuvieron valores de  $IC_{50}$  de  $12,8 \pm 0,3 \mu\text{g AE mL}^{-1}$  y  $12,2 \pm 0,4 \mu\text{g AE mL}^{-1}$ , respectivamente (Fig. 22A). Numerosos autores han reportado la capacidad de inhibición de  $\alpha$ -amilasa de AEs extraídos de especies de tomillo y orégano. Haile y col. (2021) (375) estudiaron la capacidad inhibitoria de AE de *Thymus serrulatus*, e informaron un valor de  $IC_{50}$  de  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ . Por otro lado, Aazza y col. (2016) (376) reportaron valores de  $IC_{50}$  entre 1,1 y  $9,2 \text{ mg mL}^{-1}$  para AEs derivados de 5 especies diferentes de tomillo. Otros autores indicaron valores de  $IC_{50}$  de  $0,13 \text{ mmol g}^{-1}$ , aproximadamente, para AEs de 2 subespecies de *Origanum vulgare* (247). Además, se evidenció la capacidad de inhibición de  $\alpha$ -amilasa de carvacrol, el principal componente de ORE, el cual presentó un valor de  $IC_{50}$  de  $34,64 \mu\text{g mL}^{-1}$  (222). Sin embargo, el estudio de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -amilasa de AEs sometidos a digestión gastrointestinal es escaso. Siahbalaei y Kavosi (2021) (90) reportaron actividad inhibitoria de  $\alpha$ -amilasa por parte de extractos de *Thymus kotschyanus*, con un valor de  $IC_{50}$  de  $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ . En otro trabajo, se analizaron extractos derivados de 3 especies de orégano luego de la digestión gastrointestinal, los cuales evidenciaron capacidad inhibitoria de  $\alpha$ -amilasa con porcentajes de inhibición entre 36 y 52% (377). Aunque estos estudios brindan información relevante sobre la potencial actividad

antidiabética de compuestos fenólicos luego de ser sometidos al proceso de digestión, es importante resaltar que no se han utilizado AEs en los ensayos. Por lo tanto, la comparación directa con los resultados obtenidos en el presente trabajo podría conducir a conclusiones equivocadas.

Con respecto a la  $A_{ami}$  de los polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub>, se observó un comportamiento claramente dependiente del AE encapsulado (Fig. 22A). El valor de  $IC_{50}$  de EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> resultó significativamente mayor ( $15,0 \pm 0,3 \mu\text{g AE mL}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ) al de TOM libre, indicando una disminución de la capacidad de inhibición de  $\alpha$ -amilasa luego de la encapsulación de TOM en el coacervado proteína-PS. Este efecto sugiere que los péptidos liberados a partir de EWPn por acción de proteasas digestivas podrían interactuar con los componentes de TOM limitando su actividad antidiabética. Por el contrario, EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> evidenció un valor de  $IC_{50}$  significativamente menor ( $8,6 \pm 0,2 \mu\text{g AE mL}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ) al de ORE libre, indicando mayor  $A_{ami}$  para el caso de ORE encapsulado.

Por otro lado, la Fig. 22B presenta la  $A_{ami}$  de los polvos EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub>, y del polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub>, en la cual los valores de  $IC_{50}$  son expresados como mg proteína  $\text{mL}^{-1}$ . Como se puede observar, el polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> exhibió un valor de  $IC_{50}$  de  $3,3 \pm 0,2 \text{ mg proteína mL}^{-1}$ , indicando que los péptidos liberados a partir de EWPn debido a la proteólisis digestiva serían capaces de inhibir la enzima  $\alpha$ -amilasa, tal como fue confirmado por otros autores (378). Como se discutió anteriormente, las interacciones electrostáticas entre EWPn y PAM estarían debilitadas bajo condiciones intestinales (pH 7). De este modo, la proteína estaría más expuesta a la acción de la tripsina y se liberarían péptidos de diferentes PMs, los cuales actuarían inhibiendo la actividad de  $\alpha$ -amilasa (378–380).

Al analizar la  $A_{ami}$  del polvo EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub>, se observó un valor de  $IC_{50}$  significativamente mayor ( $4,2 \pm 0,2 \text{ mg proteína mL}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ) al del polvo control, lo que indicaría una reducción de la actividad antidiabética luego de la encapsulación de TOM en el coacervado proteína-PS (Fig. 22B). Por el contrario, el polvo EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> evidenció un valor de  $IC_{50}$  de  $2,9 \pm 0,1 \text{ mg proteína mL}^{-1}$ , significativamente menor ( $p < 0,05$ ) al polvo control.



**Figura 22.** Actividad inhibitoria de  $\alpha$ -amilasa expresada como  $IC_{50}$  ( $\mu g$  de AE  $mL^{-1}$ ) (A) y como  $IC_{50}$  (mg de proteína  $mL^{-1}$ ) (B) de TOM (■) y ORE (■) libres y polvos EWPn-PAM<sub>liof</sub> (■), EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> (■) y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> (■), después de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Cada barra representa el promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

En la Fig. 23 se presenta la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa ( $A_{glu}$ ,  $IC_{50}$  expresado como  $\mu g$  AE  $mL^{-1}$  y como mg proteína  $mL^{-1}$ ) de los polvos EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub>, del polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> y de TOM y ORE libres, después de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Al evaluar la  $A_{glu}$  de TOM y ORE libres, se observaron valores de  $IC_{50}$  de  $0,31 \pm 0,01$  y  $0,29 \pm 0,01$   $\mu g$  AE  $mL^{-1}$ , respectivamente (Fig. 23A).

Por otro lado, el análisis de la  $A_{glu}$  de los polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> reveló un comportamiento claramente dependiente del AE encapsulado, tal como ocurrió en el caso de la  $A_{ami}$ . Sin embargo, ambos polvos presentaron valores de  $IC_{50}$  significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) que los valores de AEs libres, indicando una disminución de la capacidad de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa luego de la encapsulación de los AEs en el coacervado proteína-PS. Además, el polvo EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> exhibió un valor de  $IC_{50}$  significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el polvo EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> ( $1,08 \pm 0,07$  y  $0,81 \pm 0,02$   $\mu g$  AE  $mL^{-1}$ , respectivamente). Tal como se discutió para la  $A_{ami}$ , este comportamiento sugiere que los péptidos liberados a partir de EWPn por acción de proteasas digestivas podrían interactuar con los componentes de TOM y ORE, limitando su actividad antidiabética.

Es importante resaltar que el efecto inhibitorio de enzimas de un AE depende fuertemente de la especie y subespecie de planta de la cual proviene, del método de extracción utilizado y de los compuestos bioactivos presentes. Haile y col. (2021) (375) evaluaron la capacidad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa de AE extraído de *Thymus serrulatus*, e informaron un valor de  $IC_{50}$  de  $0,11 \pm 0,01$  mg  $mL^{-1}$ . Por otro lado, Aazza y col. (2016) (376) hallaron valores de  $IC_{50}$  menores a  $0,1$  mg  $mL^{-1}$  al evaluar la  $A_{glu}$  de AEs derivados de 5 subespecies diferentes de tomillo. En otro estudio, se reportó que el porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa fue mayor para TOM que para ORE, los cuales presentaron valores de 98 y 50%,

respectivamente (72). Es relevante mencionar que el análisis de la composición química de ORE no evidenció la presencia de carvacrol, tal como en el presente trabajo. Finalmente, Sarikurku y col. (2015) (247) evaluaron la capacidad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa de AEs extraídos de 2 subespecies de *Origanum vulgare*, los cuales exhibieron valores de  $IC_{50}$  de 0,88 y 6,04 mmol g<sup>-1</sup>.

Tal como se discutió anteriormente, aunque existen numerosos reportes en la literatura sobre la  $A_{glu}$  que poseen TOM y ORE, la información es escasa cuando se desea evaluar el efecto de la encapsulación de AE y del proceso de digestión gastrointestinal sobre la capacidad de inhibir  $\alpha$ -glucosidasa de los componentes bioactivos presentes.

Por otro lado, la Fig. 23B presenta la  $A_{glu}$  de los polvos EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub>, y del polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub>, en la cual los valores de  $IC_{50}$  son expresados como mg proteína mL<sup>-1</sup>. Como se puede observar, el polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> exhibió un valor de  $IC_{50}$  de  $0,25 \pm 0,02$  mg proteína mL<sup>-1</sup>. Este resultado sugiere que los péptidos bioactivos liberados a partir de EWPn en el proceso digestivo inhibirían la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, comportamiento que ya fue observado para la enzima  $\alpha$ -amilasa.

Al analizar la  $A_{glu}$  de los polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub>, se observaron valores de  $IC_{50}$  significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) al del polvo control, lo que indicaría una reducción de la actividad antidiabética luego de la encapsulación de TOM y ORE en el coacervado proteína-PS (Fig. 23B). Este comportamiento podría ser atribuido a la interacción entre péptidos derivados de EWPn con capacidad de inhibir la  $\alpha$ -glucosidasa y componentes de los AEs, las cuales limitarían la interacción libre entre los péptidos bioactivos y la enzima o entre los compuestos bioactivos de los AEs y la enzima, evitando parcial o totalmente que estos componentes puedan actuar como inhibidores.

A diferencia de lo observado para la  $A_{ami}$ , los valores correspondientes a los polvos EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> no presentaron diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre ellos, resultando de  $0,31 \pm 0,02$  mg proteína mL<sup>-1</sup> en ambos casos.

Finalmente, aunque la encapsulación de los AEs en el coacervado proteína-PS provocó una disminución en la  $A_{glu}$ , es importante señalar que la capacidad inhibitoria de los polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> se mantuvo considerablemente alta y comparable a las reportadas por otros autores (72,247,375,376).

Adicionalmente, es relevante considerar que la encapsulación incrementó la solubilidad acuosa de los AEs y los protegió contra la digestión gastrointestinal *in vitro*, ventajas tecnológicas que se deben analizar frente a la disminución de la actividad inhibitoria de enzimas observada.

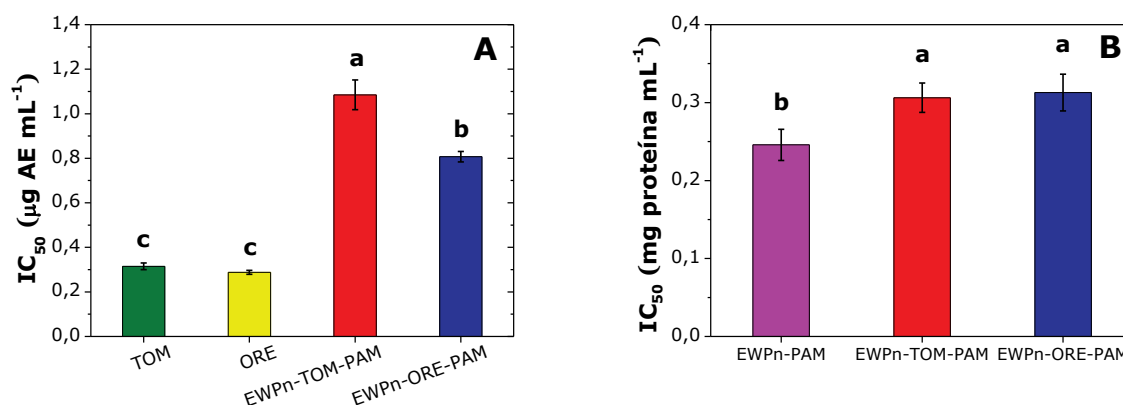
Para comprender más detalladamente los resultados presentados, es necesario el estudio de los mecanismos de inhibición que ocurren en las enzimas digestivas. Numerosos autores han demostrado el rol crucial de los grupos hidroxilo en la bioactividad de compuestos fenólicos. Con respecto a la capacidad antidiabética, se ha reportado el efecto de los grupos hidroxilo sobre los sitios activos de las enzimas



involucradas en la digestión de carbohidratos (381). Por otro lado, Lim y col. (2022) (382) sugirieron que el número y la posición de grupos hidroxilo en la estructura química de flavonoides representarían factores críticos para la inhibición de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa. Adicionalmente, se encontró que un mayor número de grupos hidroxilo en ácidos fenólicos se relacionaría con una mayor inhibición de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa (381). En tal sentido, la mayor  $A_{ami}$  y  $A_{glu}$  del polvo EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> con respecto al polvo EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> podría ser explicada considerando el elevado contenido de carvacrol en ORE (CR de 76,73%), frente a un menor contenido de timol en TOM (CR de 44,61%) (Tabla 2).

Por otro lado, la unión de compuestos bioactivos libres y encapsulados a las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa podría llevarse a cabo mediante distintos modos de acción debido a diferencias fundamentales en las estructuras de las proteínas, tales como la localización y la forma de los sitios de acción catalíticos (382). Por este motivo es esperable que, tal como sucedió en el presente trabajo, el efecto inhibitorio de un AE libre o encapsulado difiera según la enzima analizada.

Finalmente, se reporta en la literatura una correlación directa entre la actividad antioxidante y la actividad inhibitoria de enzimas digestivas que poseen diversos extractos de plantas (383,384). Tal como se discutió previamente, ORE resultó ser más efectivo que TOM cuando la actividad antioxidante *in vitro* fue evaluada bajo casi todas las condiciones (libres, encapsulados, digeridos y no digeridos). De este modo, la mayor  $A_{ami}$  y  $A_{glu}$  del polvo EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> con respecto al polvo EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> podría deberse a la mayor actividad antioxidante de ORE la cual, a su vez, estaría relacionada con su alto contenido de carvacrol (Tabla 2).



**Figura 23.** Actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa expresada como IC<sub>50</sub> (µg de AE mL<sup>-1</sup>) (A) y como IC<sub>50</sub> (mg de proteína mL<sup>-1</sup>) (B) de TOM (■) y ORE (■) libres y polvos EWPn-PAM<sub>liof</sub> (■), EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> (■) y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> (■), después de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Cada barra representa el promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 2

El presente capítulo abordó el desarrollo y evaluación de coacervados complejos formados por EWPn y PAM, diseñados para vehicular AEs con potencial actividad antidiabética. A lo largo del mismo, se analizaron aspectos estructurales y funcionales de los sistemas obtenidos, así como su comportamiento frente a condiciones digestivas *in vitro* y su impacto sobre enzimas relevantes en el metabolismo de carbohidratos. A continuación, se presenta una síntesis de los principales hallazgos obtenidos en relación con los objetivos específicos propuestos:

**Formación y caracterización de coacervados proteína-polisacárido con AEs:** Los coacervados obtenidos a partir de EWPn y PAM para vehicular TOM y ORE demostraron una estructura estable y funcional, evidenciada por técnicas de microscopía óptica, microscopía de fuerza atómica, análisis de distribución de tamaño de partícula y potencial  $\zeta$ . Las partículas presentaron una morfología adecuada y un comportamiento bifásico o multimodal acorde a sistemas coloidales complejos. Las interacciones electrostáticas proteína-polisacárido permitieron una deposición efectiva de PAM y la formación de sistemas coloidalmente estables.

**Modulación de la expresión génica en células Caco-2:** El nivel de expresión de genes importantes en el transporte de glucosa a través de la membrana celular (SGLT1 y GLUT2) se vio significativamente reducido en células incubadas en presencia del sistema EWPn–ORE–PAM. En contraste, los sistemas EWPn–TOM y EWPn–ORE (nanocomplejos sin la deposición electrostática de PAM) indujeron su sobreexpresión, principalmente luego de 24 h de incubación, lo que sería contraproducente en un enfoque antidiabético. La inclusión de PAM como recubrimiento fue clave para inhibir esta respuesta, sugiriendo que el coacervado no solo actuaría como barrera física, sino que también modularía la interacción bioquímica de los AEs con los componentes de las células intestinales.

**Digestibilidad y bioaccesibilidad mediante digestión gastrointestinal *in vitro*:** Los coacervados EWPn–TOM–PAM y EWPn–ORE–PAM mostraron una alta estabilidad frente a las condiciones gastrointestinales *in vitro*, con una preservación del 100% del AE encapsulado, en comparación con el 65–72% de estabilidad de los AEs libres. Sin embargo, la bioaccesibilidad final fue similar entre las formas libres y encapsuladas (~70%) lo que sugiere que, aunque la encapsulación protege a los compuestos bioactivos, podría limitar su liberación efectiva en condiciones intestinales.

**Efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la actividad biológica:** En general, la actividad antioxidante de los digestos fue menor que la actividad de los AEs en las formas libres y encapsuladas sin digerir, tal como se esperaba. Sin embargo, los digestos provenientes de los sistemas con AEs encapsulados mantuvieron un mejor perfil bioactivo en comparación con su equivalente AE libre. Esto refuerza la hipótesis de que la matriz del coacervado actuaría como cubierta protectora, preservando compuestos bioactivos y atenuando su degradación química durante la digestión. Por otro lado, el sistema

EWPn-ORE-PAM presentó notable capacidad para inhibir enzimas clave en el metabolismo de carbohidratos después de ser sometido a la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Los resultados del capítulo 2 confirman que la encapsulación de AEs mediante coacervados proteína-polisacárido, no solo protege a los compuestos bioactivos durante la digestión, sino que además potencia su perfil antidiabético al modular favorablemente la expresión de genes clave en el transporte intestinal de glucosa. Estos sistemas demuestran ser promisorios para el diseño de ingredientes funcionales dirigidos a la prevención o al tratamiento complementario de la DM2.

## **5. CAPÍTULO 3**

**Caracterización de panes que incorporan aceites esenciales  
encapsulados con potencial actividad antidiabética**

## 5.1. INTRODUCCIÓN

### 5.1.1. Alimentos funcionales

En las últimas décadas, la demanda de los consumidores en lo que respecta a la elaboración de alimentos por parte de la industria ha cambiado notablemente. En efecto, se ha instalado firmemente la noción de que la alimentación no solo cumple una función nutricional básica, sino que también puede influir directamente en la prevención de enfermedades y en la promoción de la salud. De este modo, un alimento debe proporcionar los nutrientes necesarios para el organismo y, a la vez, contribuir al bienestar físico y mental de los individuos. En tal sentido, los alimentos funcionales desempeñan un papel destacado. Según la Acción Concertada de la Comisión Europea sobre la Ciencia de Alimentos Funcionales en Europa, coordinada por el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida de Europa, un producto alimenticio solo puede considerarse funcional si junto con el impacto nutricional básico posee un efecto beneficioso en una o más funciones del organismo humano, ya sea mejorando las condiciones generales y físicas y/o disminuyendo el riesgo de evolución de enfermedades. Además, la definición añade que la cantidad de ingesta y la forma del alimento funcional deben ser tal como se espera normalmente para fines dietarios (385). Sin embargo, no existe hasta el momento un consenso internacional que unifique las definiciones de alimento funcional, ni regulaciones que incluyan aspectos de su elaboración, comercialización, etc. La mayoría de las instituciones concuerdan en que, para que un alimento natural o procesado pueda ser considerado funcional, debe demostrar mediante evidencias científicas públicamente disponibles que posee un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas del organismo, que mejora el estado de salud y de bienestar, o que reduce el riesgo de una enfermedad. Para ello, estos alimentos deben contener, necesariamente, alguno de los llamados ingredientes funcionales o CBs, tales como vitaminas, minerales, fibras, péptidos bioactivos, fitoquímicos, etc. (386).

Por su parte, el Centro de Alimentos Funcionales ha sugerido una serie de apartados que resultan de gran utilidad para evaluar la inclusión de un alimento dentro de la categoría de alimento funcional, que en este caso profundiza el concepto a alimento natural o procesado que contiene compuestos biológicamente activos que, en cantidades definidas, efectivas y no tóxicas, proporcionan un beneficio para la salud clínicamente probado y documentado utilizando biomarcadores específicos, para promover una salud óptima y reducir el riesgo de enfermedades crónicas/virales y controlar sus síntomas (387). En primer lugar, el alimento debe responder a un objetivo particular previamente establecido, el cual puede estar relacionado con la reducción del riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas o afecciones virales, el control de los síntomas de condiciones específicas, la mejora del rendimiento corporal o, simplemente, la promoción de una salud óptima. Además, es importante la correcta identificación de los compuestos fisiológicamente activos que se encuentran en el potencial alimento funcional para, posteriormente, evaluar la dosis y el mecanismo de acción involucrado. Naturalmente, se espera que la dosis del CB se encuentre dentro del rango terapéutico para asegurar los efectos positivos en el individuo, pero sin pasar por alto su umbral tóxico. Respecto al mecanismo de acción de los CBs, es fundamental que sea adecuadamente caracterizado

ya que, al encontrarse formando parte de una matriz alimentaria compleja, podría verse afectado de diversas maneras según cada CB y alimento involucrado. En este caso, los ensayos clínicos y epidemiológicos resultan de gran utilidad. Otro punto importante en la evaluación de alimentos funcionales está relacionado con la correcta selección de biomarcadores a partir de los cuales se confirman o no los efectos beneficiosos de los CBs sobre el organismo. De este modo, es posible justificar la incorporación de un CB a un determinado alimento y cuantificar su capacidad biológica (387).

Por otro lado, es necesario tener en cuenta que no todos los alimentos reúnen las características deseables para considerarse como alimento funcional. Al respecto, existen factores sociales y culturales (*e.g.*, costumbres, rituales y creencias de grupos étnicos, predisposición al desarrollo de reacciones alérgicas, etc.) que pueden conducir al rechazo de un alimento en poblaciones específicas. Un alimento funcional debe reunir, preferiblemente, los siguientes requisitos: (i) ser consumido por una gran parte de la población; (ii) poder contener una cantidad adecuada del CB que permita detectar el efecto beneficioso sobre la salud; (iii) permitir que el CB permanezca estable luego de su envasado, distribución y almacenamiento; (iv) ser sensorialmente aceptable por los consumidores luego de la incorporación del CB; y (v) estar disponible por un costo razonable y accesible para los consumidores (388).

Antes de evaluar un potencial alimento funcional a través de ensayos clínicos, es necesario determinar su eficacia y seguridad en estudios *in vitro* e *in vivo*, indicando la dosis mínima de CB a partir de la cual se alcanza el objetivo establecido. En una etapa posterior, los ensayos clínicos permiten analizar los efectos secundarios asociados a la administración de dicha dosis y, a su vez, podrían revelar que el alimento ejerce una acción biológica inferior a la esperada. Una vez realizado el proceso de evaluación previamente mencionado, es importante informar los potenciales beneficios para la salud asociados al consumo del alimento, así como la ingesta diaria recomendada, el tipo y la cantidad de CB presente y las precauciones a considerar (387).

Entre los alimentos propuestos como vehículos de ingredientes funcionales, el pan es uno de los más empleados debido a que es un producto alimenticio básico y asequible que se consume diariamente en todo el mundo. Además, el proceso de fabricación es extensamente conocido y simple (389). Hasta el momento, se han llevado a cabo múltiples intentos centrados en optimizar las características nutricionales y funcionales del pan. Al respecto, se han incorporado a la formulación de pan una gran variedad de vegetales crudos o extractos de frutas y subproductos ricos en fibras dietéticas o compuestos fenólicos, para incrementar la capacidad antioxidante, modular la digestión del almidón, entre otros beneficios. Sin embargo, la comunidad científica y la industria alimentaria se ha enfrentado a una serie de inconvenientes relacionados con una baja aceptabilidad sensorial, menor volumen, menor vida útil y variaciones en la textura del pan enriquecido, fortificado o funcional obtenido (390). Cuando los CBs son incorporados al pan de forma directa, una fracción considerable podría perderse debido a que la mayoría de ellos presentan baja estabilidad química, alta volatilidad y baja solubilidad en agua, lo que implicaría una disminución de

las propiedades funcionales del alimento. A su vez, los CBs adicionados directamente podrían afectar el sabor y aroma característico del pan. Por este motivo, un gran número de estudios han reportado la encapsulación de CBs utilizando diversos métodos, previo a su incorporación en pan (391). En este sentido, Ezhilarasi y col. (2014) (392) encapsularon un extracto rico en ácido hidroxicítrico, con potencial efecto regulatorio sobre la síntesis de ácidos grasos, en diferentes biopolímeros a través de secado *spray* y, posteriormente, adicionaron el polvo obtenido a la formulación de pan. Por su parte, Pasrija y col. (2015) (393) encapsularon extracto de té verde mediante secado *spray* y liofilización utilizando maltodextrina, con el objetivo de incorporar las microcápsulas obtenidas en la formulación de pan y aumentar el contenido de polifenoles de dicho alimento. Además, Rasti y col. (2017) (394) desarrollaron nanoliposomas capaces de incorporar ácidos grasos poliinsaturados, valorados por sus excelentes propiedades biológicas, con la finalidad de incorporarlos a una formulación de pan.

### 5.1.2. Generalidades del pan

El pan forma parte de la dieta humana desde la antigüedad (10.000 años a.C.) y es uno de los alimentos básicos más consumidos en todo el mundo. La cantidad de pan consumida difiere ampliamente entre países, siendo Rusia, Irán y Turquía los países con mayor consumo por persona por año (104, 116 y 118 kg por persona por año, respectivamente). En Argentina, particularmente, se consumen alrededor de 50 kg de pan por persona por año (389).

El pan es un producto fermentado cuyos cuatro ingredientes básicos son harina de trigo, agua, levadura y sal. Además, se han desarrollado otros tipos de panes elaborados con ingredientes adicionales tales como harinas de otros cereales y legumbres, azúcares, jarabe de glucosa, sólidos lácteos, grasas y aceites, huevos y aditivos (conservantes, reguladores de acidez, antioxidantes, etc.), entre otros (395).

Generalmente, el proceso de elaboración de pan consta de las siguientes etapas:

El objetivo del **amasado** es mezclar los ingredientes para formar una masa con determinadas propiedades reológicas. Durante el amasado los componentes de la harina absorben agua y las proteínas de trigo se combinan para formar la red de gluten. La intensidad, duración de la operación, así como el tipo de amasadora, determina en parte la calidad de la masa. Durante esta etapa se incorpora la levadura o fermento, ingrediente básico en la elaboración del pan. La levadura industrial (*Saccharomyces cerevisiae*), ya sea fresca o seca, puede utilizarse alternativamente de dos formas. En primer lugar, el método de la esponja consiste en preparar un cultivo previo (denominado esponja) unas horas antes del comienzo del amasado. La esponja se prepara con una parte de harina del total que se va a utilizar, toda la levadura y cantidad de agua suficiente como para conseguir el desarrollo de una masa. En el momento del amasado se incorporan a la amasadora el resto de la harina, el resto del agua y la sal junto con la esponja. La otra forma consiste en añadir la levadura directamente a la amasadora en el momento del comienzo del amasado y se conoce

como método directo. Requiere un periodo de reposo de la masa de unos 45 min antes de ser dividida. Es importante considerar que no es útil en procesos mecanizados con división automática volumétrica (396).

El **reposo** o **pre-fermentación** consiste en un período de descanso de la masa para su recuperación luego del amasado. Esta etapa puede llevarse a cabo a temperatura y humedad relativa ambiente o en cámaras de pre-fermentación bajo condiciones controladas (25-28°C, 80-85% de humedad relativa). En procesos industriales de producción de pan de molde esta etapa no se realiza.

En la **división** y **pesado**, la masa se fracciona en porciones de igual tamaño y peso. El objetivo es asegurar la producción de piezas de pan homogéneas con un peso constante.

El **boleado** consiste en dar forma de bollo a las porciones de masa obtenidas anteriormente, consiguiendo un exterior liso que facilite su manejo en las operaciones siguientes. Durante la división de la masa, la estructura lograda a través del amasado suele romperse y desgarrarse. Por lo tanto, el objetivo de esta etapa es reconstruir la estructura de la masa nuevamente.

El **reposo** consiste en un período de descanso de la masa para su recuperación luego de la desgasificación sufrida durante la división y el boleado. Esta etapa puede llevarse a cabo a temperatura y humedad relativa ambiente o en cámaras de pre-fermentación bajo condiciones controladas (25-28°C, 80-85% de humedad relativa).

El objetivo del **formado** es dar la forma definitiva correspondiente al tipo de pan a elaborar. En caso de que la pieza sea redonda, el boleado proporciona ya dicha forma.

La **fermentación** corresponde al período que transcurre desde que se forma la pieza definitiva hasta el momento en que entra al horno, durante el cual la pieza se desarrolla hasta alcanzar el volumen considerado como óptimo por el panadero. Esta etapa se realiza en cámaras de fermentación, bajo condiciones de temperatura y humedad relativa controladas (25-28°C, 80-85% de humedad relativa). Su duración es variable y depende de factores referidos a las materias primas (*e.g.*, composición y calidad de la harina, cantidad y calidad de la levadura, exceso o escasez de sal, etc.), propios de la masa (*e.g.*, hidratación, temperatura, acidez, etc.) y factores externos (*e.g.*, temperatura, humedad relativa, etc.). El proceso consiste básicamente en una fermentación alcohólica llevada a cabo por las levaduras que transforman los azúcares fermentables presentes en la harina o agregados, en etanol, CO<sub>2</sub> y algunos productos secundarios. En el caso de utilizar masa madre se producen en menor medida otras fermentaciones llevadas a cabo por bacterias lácticas. El objetivo es que el CO<sub>2</sub> formado sea retenido por la masa, incrementando su volumen y mejorando el sabor del pan. En un sentido amplio, se considera que la fermentación tiene lugar durante todo el periodo comprendido entre el amasado y el horneado, comenzando cuando la temperatura interna de la masa alcanza los 50°C (396).

El **corte** es una operación que se realiza en algunos tipos de masas de panes después de la fermentación, justo en el momento en el que la masa de pan va a ser introducida en el horno. Consiste en



efectuar pequeñas incisiones en la superficie de las piezas para permitir el desarrollo del pan en las etapas posteriores.

El objetivo de la **cocción** es la transformación de la masa fermentada en pan. Durante esta etapa se produce la evaporación de todo el etanol producido en la fermentación, la evaporación de parte del agua contenida en el pan, la desnaturalización y coagulación de las proteínas, la transformación del almidón en dextrinas y azúcares menores y el pardeamiento de la corteza. Esta etapa involucra dos reacciones fundamentales para el sabor y el color del pan. En primer lugar, la caramelización es la descomposición térmica de los azúcares presentes a partir de la cual se producen pigmentos de alto PM. Por otro lado, la reacción de Maillard no enzimática ocurre entre azúcares no reductores y aminoácidos dando lugar a la aparición de compuestos carbonílicos. A pesar de que diferentes azúcares y aminoácidos pueden participar de esta reacción, se ha observado que cada uno de ellos influye de diferente forma en el sabor y en la intensidad del color del pan (397). La cocción se realiza en hornos a temperaturas que van desde los 220 a los 260°C, aunque el interior de la masa nunca llega a sobrepasar los 100°C (389,398).

El **enfriamiento, rebanado y envasado** se lleva a cabo inmediatamente después de la cocción. El producto se enfría rápidamente para luego rebanarlo (según el tipo de pan) y finalmente envasarlo.

Las condiciones de **almacenamiento** determinan, en parte, el período de vida útil de estos productos. Los panes envasados pueden almacenarse a temperatura ambiente por períodos cortos (menos de 20 días) o congelarse de forma rápida a -40°C y almacenarse a -20°C por períodos más largos (más de 30 días).

#### **5.1.2.1. Composición y valor nutricional**

Desde el punto de vista nutricional, el pan es un producto cuyo aporte a la dieta es principalmente energético y se estima en unas 200 a 300 Kcal cada 100 g de pan. Si bien la composición nutricional varía de acuerdo con la formulación y proceso de obtención de cada tipo, en general, el pan aporta cantidades significativas de carbohidratos complejos (40-60% m/m), proteínas vegetales (7-11% m/m), grasas o aceites (0,5-9% m/m), fibra dietética (0,5-9% m/m), vitaminas y minerales (menos del 1% m/m). El aporte nutricional es mayor en los panes elaborados con harinas obtenidas a partir de la molienda del grano entero. En las harinas blancas refinadas, la eliminación de algunos de los componentes del grano (como el salvado y el germen) modifica las cualidades nutricionales generales del producto resultante (399). Por otro lado, el pan es un alimento que presenta un elevado índice glucémico, con un valor aproximado de 75. Cuando este valor es alto, los alimentos liberan una gran cantidad de carbohidratos y aumentan los niveles de glucosa en sangre rápidamente al ser consumidos (395).

En las últimas décadas, el consumo de pan ha ido disminuyendo debido a los cambios en las dietas de los consumidores modernos. El mayor conocimiento sobre los efectos adversos del consumo excesivo de grasas, azúcares, carbohidratos y sal, y su relación con la prevalencia de enfermedades tales como

obesidad, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, ciertos tipos de cáncer y DM2, entre otras, ha generado concientización en algunos sectores de la sociedad. Sin embargo, el pan ha sido reconsiderado como un producto clave dirigido a grupos específicos de población que requieren alimentos especiales. Se han elaborado panes con baja densidad calórica para la prevención y el control de la obesidad, sin gluten para pacientes celíacos, productos con alto contenido de fibra para contrarrestar la baja ingesta actual de fibra dietética, productos de bajo índice glucémico para diabéticos y pacientes con síndrome metabólico (389).

### 5.1.3. Caracterización de panes

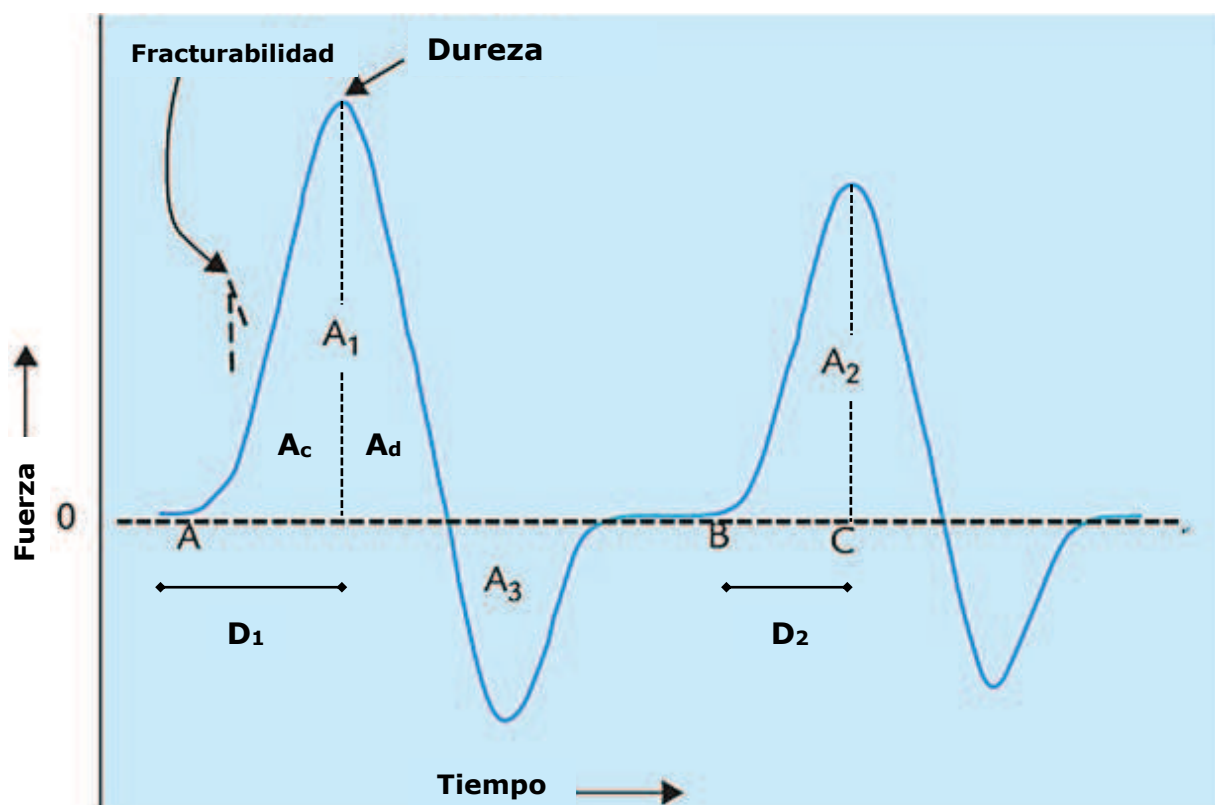
Tanto la textura como el color son atributos muy importantes que determinan la calidad y aceptabilidad de un pan. Por tal motivo, para la industria alimentaria es fundamental su correcta caracterización a través del equipamiento adecuado.

Los métodos instrumentales para determinar la textura de un alimento pueden clasificarse en fundamentales, de imitación o empíricos. Los métodos fundamentales determinan las propiedades reológicas, mientras que los métodos de imitación someten al alimento a condiciones que simulan una situación real. Por su parte, los métodos empíricos determinan las propiedades mecánicas de la muestra en unidades empíricas del instrumento y, por lo tanto, no pueden ser extrapoladas fuera de las condiciones de prueba o muestra específica, ni ser comparadas con las propiedades de otros productos. De este modo, los métodos de imitación presentan el mayor potencial y la mejor adaptabilidad para la comunidad científica y la industria (400).

Entre los métodos de imitación se encuentra el análisis de perfil de textura (TPA, por sus siglas en inglés *Texture Profile Analysis*), que es una de las pruebas de compresión más empleadas para evaluar la textura de pan. Corresponde a un método objetivo instrumental, ya que los atributos estimados a partir de TPA pueden ser correlacionados con los de la evaluación sensorial. El dispositivo que se utiliza es el texturómetro, el cual imita el proceso de masticación para cuantificar una gran variedad de parámetros. El análisis consiste en someter a una muestra de pan a dos ciclos de compresión entre dos superficies paralelas. A partir de los resultados obtenidos se genera una curva de fuerza en función del tiempo (curva de TPA), tal como se observa en la Fig. 24. Los puntos A y B indican el comienzo de la primera y segunda compresión, respectivamente. La altura del pico de fuerza en el primer ciclo de compresión (primer mordisco) se define como dureza. La fracturabilidad (originalmente llamada fragilidad) es la fuerza máxima registrada justo antes de que el alimento se quiebre o fracture durante la primera compresión, que normalmente aparece antes de la dureza (en la Fig. 24 se muestra como una línea discontinua). La relación de las áreas de fuerza positiva bajo la primera y la segunda compresión ( $A_2/A_1$ ) se define como cohesividad. La adhesividad corresponde al área de fuerza negativa del primer mordisco ( $A_3$ ) y representa el trabajo necesario para sacar el émbolo de compresión de la muestra. La elasticidad es la distancia que la muestra

recupera luego de la primera compresión ( $D_2/D_1$ ). La resiliencia es la capacidad del alimento de recuperar su forma inmediatamente después de ser deformado, y se calcula subdividiendo el área de fuerza bajo la primera compresión ( $A_1$ ) en el área de descompresión (descenso de la fuerza,  $A_d$ ) y el área de compresión (ascenso de la fuerza,  $A_c$ ), para luego obtener la relación entre estas dos áreas ( $A_d/A_c$ ). Es un parámetro adimensional que indica la fracción de la estructura original del alimento que se ha quebrado o fracturado por la compresión inicial (401).

Los parámetros de textura definidos previamente se denominan primarios ya que se obtienen directamente de la curva de TPA. A partir de ellos, se derivan otros parámetros secundarios tales como la gomosidad, definida como el producto entre la dureza y la cohesividad, y la masticabilidad obtenida a partir del producto entre la dureza, la cohesividad y la elasticidad. La masticabilidad representa la cantidad de energía necesaria para desintegrar un alimento para su deglución (402).

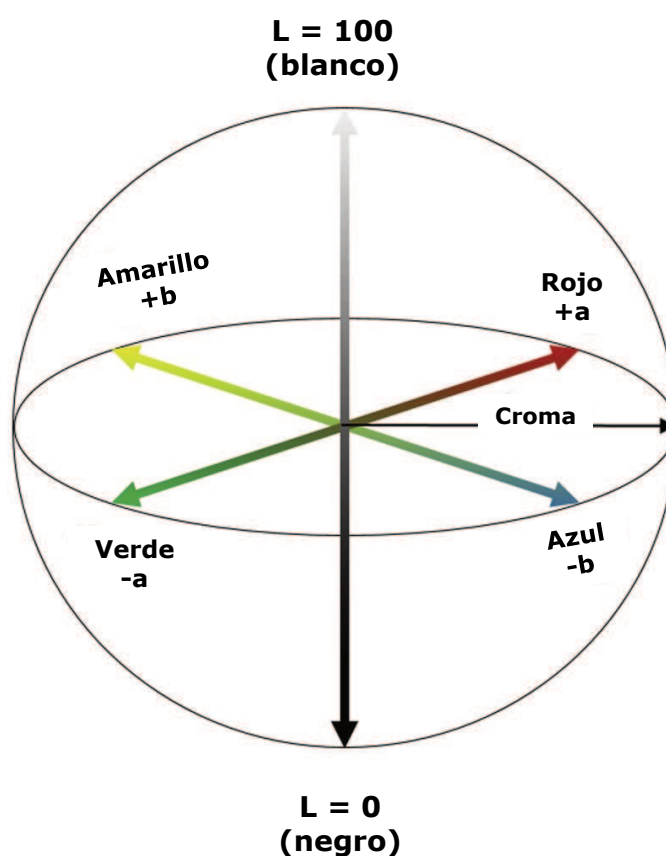


**Figura 24.** Curva de TPA típica obtenida a partir de un texturómetro (Figura modificada de Nishinari y Fang (2018) (401)).

Por otro lado, la caracterización de panes según la apariencia visual puede llevarse a cabo mediante una evaluación sensorial o un análisis instrumental. En el primer caso, la muestra es observada sin la utilización de instrumentos, pero bajo condiciones controladas de iluminación, junto con la referencia a un

conjunto de colores *standard* para la comparación con la muestra. Sin embargo, el color es una percepción subjetiva que cada individuo interpreta de manera distinta. Los análisis instrumentales objetivos constituyen una excelente opción para reducir al mínimo los problemas de subjetividad que presenta la evaluación sensorial de una muestra (403).

Uno de los métodos instrumentales más reportados en la literatura emplea un colorímetro o espectrofotómetro para estimar el color de la corteza y la miga del pan, clasificando el espectro obtenido en un espacio de tres dimensiones determinado por los ejes  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  (sistema CIELab). El parámetro  $L^*$  corresponde a una medida aproximada de la luminosidad, propiedad según la cual cada color puede considerarse equivalente a un nivel de la escala de grises, entre el negro y el blanco. El parámetro  $a^*$  toma valores positivos para colores rojizos y negativos para colores verdosos, mientras que el parámetro  $b^*$  es positivo para colores amarillentos y negativos para colores azulados (Fig. 25). En los métodos instrumentales, el equipo mide el color de la muestra y entrega directamente los valores  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , los cuales representan la forma en que el color sería percibido por el ojo humano. Por otro lado, la croma o saturación del color ( $C^*$ ) es un atributo cuantitativo de la intensidad del color. Se utiliza para determinar el grado de diferencia de un matiz en comparación con un color gris con la misma luminosidad. Cuanto mayor es el valor de  $C^*$ , mayor es la intensidad del color percibida por los humanos (403).



**Figura 25.** Diagrama de espacio de color CIELab (Figura modificada de Ly y col. (2020) (404)).

#### 5.1.4. Digestión gastrointestinal *in vitro* de panes

La digestión *in vitro* de productos panificados ha sido ampliamente estudiada en las últimas décadas. La mayoría de los trabajos evalúa la bioaccesibilidad de diferentes compuestos a partir de panes formulados con diferentes tipos de cereales o pseudocereales (405). Al respecto, Angioloni y Collar (2011) (406) evaluaron la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos presentes en pan de trigo luego de ser sometido a un proceso de digestión *in vitro*. En este caso, los autores reportaron un 58% de bioaccesibilidad en la fase micelar del digesto. Por otro lado, Colantuono y col. (2018) (407) evaluaron la bioaccesibilidad de polifenoles en digestos de panes enriquecidos con polvo de alcachofa, la cual resultó de 82%. Adicionalmente, los autores señalaron que los digestos provenientes de la fase intestinal del método *in vitro* presentaron actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa.

Cuando se desea evaluar la digestión gastrointestinal *in vitro* de alimentos ricos en almidón (tales como los productos panificados) debe considerarse particularmente la simulación de la fase oral, ya que se ha informado que incluso durante 20-30 s de procesamiento del alimento en la cavidad oral, el 50% del almidón puede ser hidrolizado (316). En consecuencia, es importante someter al pan a las condiciones adecuadas que imiten la masticación y secreción de saliva (con el agregado de  $\alpha$ -amilasa), previamente a la digestión gástrica e intestinal, logrando de este modo una correcta simulación del proceso digestivo *in vitro* (405).

## 5.2. OBJETIVOS

Los objetivos específicos del capítulo son:

**Objetivo 1:** Obtener panes que incorporan aceites esenciales encapsulados y evaluar sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales.

**Objetivo 2:** Evaluar la digestibilidad de panes que incorporan aceites esenciales encapsulados mediante un método estático de digestión gastrointestinal *in vitro*.

**Objetivo 3:** Evaluar el efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la actividad biológica de panes que incorporan aceites esenciales encapsulados.

## 5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.3.1. Materiales

Para los estudios desarrollados en el presente capítulo se utilizó clara de huevo (EW) industrial, aceite esencial de tomillo (TOM) y aceite esencial de orégano (ORE), descritos en la Sección 3.3.1, y pectina de

alto metoxilo (PAM) comercial descripta en la [Sección 4.3.1](#). Los reactivos analíticos fueron suministrados por Cicarelli (Argentina), Biopack (Argentina) y Merck (Alemania).

### 5.3.2. Análisis termogravimétrico de polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub>

El proceso de degradación térmica de los polvos EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub> y EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub> obtenidos en la [Sección 4.3.5](#) fue investigado mediante un análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés *Thermogravimetric Analysis*), siguiendo la metodología descripta en [Kozioł y col. \(2022\) \(408\)](#). Para ello, se colocaron entre 4 y 6 mg de cada muestra en una cubeta de platino. Posteriormente, las muestras se calentaron de 30 a 700°C en atmósfera inerte mantenida mediante la inyección de nitrógeno a un caudal de 35 mL min<sup>-1</sup>, con una velocidad de calentamiento de 10°C min<sup>-1</sup>, utilizando un equipo TGA Q500 (TA Instrument, Estados Unidos). Las determinaciones fueron presentadas gráficamente en curvas de masa (%) en función de la temperatura (°C), las cuales fueron denominadas curvas de TGA. Además, para determinar la velocidad de variación de la masa durante el calentamiento, se calculó la primera derivada de las curvas anteriores (% °C<sup>-1</sup>), las cuales fueron graficadas en función de la temperatura (°C) y denominadas curvas de termogravimetría derivada (DTG, por sus siglas en inglés *Derivative Thermogravimetry*). El polvo EWPn–PAM<sub>liof</sub> y los AEs puros (TOM y ORE) también fueron evaluados a modo de control, siguiendo la misma metodología.

### 5.3.3. Obtención de panes que incorporan EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub>

Los panes de molde con agregado de polvos EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub>, EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub> fueron elaborados en el Área de Panificación del Instituto de Tecnología de Alimentos (FIQ-UNL, Santa Fe, Argentina), según la metodología propuesta por [Sponton y col. \(2023\) \(409\)](#). Para su preparación se utilizaron 500 g de harina de trigo refinada, 290 g de agua potable, 25 g de levadura prensada, 10 g de sal, 25 g de azúcar y 9 g de grasa. Además, se agregaron 2,5 g de los polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub> para la obtención de panes con 0,5% (0,5 g cada 100 g de harina) de polvo EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub> o EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub> (TOM–0,5 y ORE–0,5, respectivamente) y 5,0 g de los polvos EWPn–AE–PAM<sub>liof</sub> para la obtención de panes con 1,0% (1,0 g cada 100 g de harina) de polvo EWPn–TOM–PAM<sub>liof</sub> o EWPn–ORE–PAM<sub>liof</sub> (TOM–1 y ORE–1, respectivamente). Todos los ingredientes fueron mezclados durante 5 min en una mezcladora Oster Power 750 W (Estados Unidos). Luego, la masa obtenida fue colocada en una cámara de fermentación con temperatura y humedad relativa controladas (27°C y 75-80%, respectivamente) para una primera fermentación hasta duplicar el volumen (40 min, aproximadamente). Posteriormente, la masa se dividió en 2 porciones de igual peso, las cuales se dejaron reposar durante 10 min. Una vez transcurrido este tiempo, se colocaron en moldes de metal rectangulares lubricados para que se lleve a cabo una segunda fermentación (a 27°C y 75-80% de humedad relativa) hasta cuadruplicar su

volumen (1 h, aproximadamente). Finalmente, las masas se hornearon en un horno rotatorio eléctrico (ZU-95, Zunino, Entre Ríos, Argentina) a 210°C durante 30 min.

Con el objetivo de obtener un pan control, los mismos ingredientes en iguales cantidades, pero sin el agregado de polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub>, fueron utilizados para la preparación de la masa. Luego, se continuó con el procedimiento descrito anteriormente.

### 5.3.4. Caracterización de panes que incorporan EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub>

#### 5.3.4.1. Humedad y actividad acuosa

El efecto de la incorporación de polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> en pan de molde sobre el contenido de humedad (%) y actividad acuosa ( $a_w$ ) se evaluó siguiendo la metodología de Deseta y col. (2021) (170). En primer lugar, el contenido de humedad de los panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 se determinó pesando aproximadamente 2,0 g de muestra en una balanza halógena Radwag modelo PMR 50 NH (Polonia), calentando a 105°C hasta peso constante. El porcentaje de humedad se calculó según:

$$\text{Humedad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (\text{Ecuación 34}),$$

donde  $P_i$  y  $P_f$  es el peso (g) inicial (antes del secado a 105°C) y final (después del secado a 105°C), respectivamente.

Por otra parte, el valor de  $a_w$  de la corteza y la miga de los panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 se determinó utilizando un equipo Aqua LAB modelo CX-2T (Decagon Devices Inc., Estados Unidos) (170). La corteza se definió como la capa externa de color oscuro de aproximadamente 2-3 mm de espesor, la cual fue removida cuidadosamente con bisturí estéril. La miga se obtuvo a partir de la porción interna del pan, a más de 10 mm de la superficie para evitar la zona de transición.

El contenido de humedad y  $a_w$  del pan control (sin agregado de polvo EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub>) se evaluó siguiendo la misma metodología. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado, luego de 24 h de la elaboración de los panes (almacenados a 25°C).

#### 5.3.4.2. Perfil de textura y color

El efecto de la incorporación de polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> en pan de molde sobre sus características de textura y color fue evaluado según Deseta y col. (2021) (170). Para ello, se realizó un análisis de perfil de textura (TPA, por sus siglas en inglés *Texture Profile Analysis*) de muestras de panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 de 50 x 40 mm utilizando un analizador de textura TA-XT Plus (Stable Microsystems, Reino Unido) equipado con un disco plano de aluminio de 75 mm y una celda de carga de 50 kg. Los ajustes del analizador de textura fueron: prueba de doble compresión, velocidad de prueba previa 10 mm s<sup>-1</sup>,

velocidad de prueba 1,7 mm s<sup>-1</sup>, velocidad posterior a la prueba 10 mm s<sup>-1</sup>, distancia 10 mm, tiempo 3 s, fuerza de disparo 0,049 N, área de contacto de 1.963,5 mm<sup>2</sup> y deformación del 25%. Para calcular los valores de dureza (N), masticabilidad (mJ) y resiliencia se utilizó el *software* TA-XT Exponent. Además, los valores de TPA del pan control (sin agregado de polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub>) se evaluaron siguiendo la misma metodología. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado, luego de 24 h de la elaboración de los panes (almacenados a 25°C).

Por otro lado, el color de la corteza y la miga de panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 se determinó utilizando un espectrofotómetro Minolta modelo CM-508d/8 (Japón), equipado con un iluminante estándar D65, con un ángulo de observación de 10° y componente especular excluido (410). Además, el color de la corteza y la miga del pan control (sin agregado de polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub>) se determinó siguiendo la misma metodología.

Se evaluaron los componentes del sistema CIELab, espacio de color definido por las coordenadas rectangulares L\*, a\* y b\*. Estos parámetros en el modelo representan la luminosidad o claridad del color (L\*, donde los valores 0 y 100 corresponden al negro y blanco, respectivamente), su posición entre rojo y verde (a\*, los valores positivos indican rojo mientras que los valores negativos indican verde) y su posición entre amarillo y azul (b\*, los valores positivos indican amarillo mientras que los valores negativos indican azul). Luego, se calculó la diferencia total de color ( $\Delta E^*$ ) entre los panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 y el pan control (sin agregado de polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub>), según Pathare y col. (2013) (403):

$$\Delta E^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{0,5} \quad (\text{Ecuación 35}),$$

donde  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  y  $\Delta b^*$  son las diferencias de los parámetros L\*, a\* y b\*, respectivamente, entre los panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 y el pan control.

Por cada muestra, se realizaron 6 mediciones de color, luego de 24 h de la elaboración de los panes (almacenados a 25°C).

#### 5.3.4.3. Análisis sensorial

El efecto de la incorporación de polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> en pan de molde sobre la aceptabilidad de consumidores se evaluó según Yousif y col. (2012) (411). El análisis se llevó a cabo con 101 voluntarios consumidores habituales de pan (al menos dos veces por semana) de entre 18 y 65 años (57% de participantes mujeres) de la ciudad de Santa Fe (Argentina). Los participantes no recibieron información adicional sobre las muestras antes de la degustación y dieron su consentimiento informado por escrito. El ensayo se realizó en el laboratorio del Departamento de Análisis Sensorial (FIQ-UNL, Santa Fe, Argentina), en cabinas sensoriales individuales, diseñadas de acuerdo con la norma ISO8589 (2007), con luz natural controlada, temperatura constante a 22°C y circulación de aire. Los participantes dispusieron de agua mineral comercial para realizar enjuagues luego de evaluar cada muestra. El orden de la degustación de



cada muestra también fue aleatorio, con el propósito de alcanzar un balance adecuado en las presentaciones y minimizar cualquier sesgo sensorial.

Las muestras de panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 se evaluaron luego de 24 h de su elaboración (almacenados a 25°C), las cuales fueron presentadas a los consumidores en rodajas de 30 g, incluyendo corteza y miga, a 25°C. Cada muestra fue codificada con números aleatorios de 3 dígitos. Los participantes evaluaron la aceptabilidad general de las muestras de pan utilizando una puntuación hedónica horizontal de 9 puntos (donde 9 = me gusta muchísimo, 8 = me gusta mucho, 7 = me gusta moderadamente, 6 = me gusta poco, 5 = no me gusta ni me disgusta, 4 = me disgusta poco, 3 = me disgusta moderadamente, 2 = me disgusta mucho y 1 = me disgusta muchísimo) (412).

Para corroborar que las diferencias de género, edad (entre 18-40 y 41-65 años) y frecuencia de consumo de pan (2 o 4 veces por semana) no sean significantes, se llevó a cabo una prueba Chi-cuadrado (XLSTAT 2014, Addinsoft).

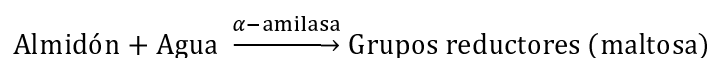
### 5.3.5. Digestión gastrointestinal *in vitro* de panes que incorporan EWPn-AE-PAM<sub>lief</sub>

Con el objetivo de evaluar la digestibilidad de los panes TOM-1 y ORE-1 obtenidos previamente y la subsecuente liberación de AE, se llevó a cabo un modelo *in vitro* de digestión gastrointestinal ampliamente aceptado, con algunas modificaciones (320,335).

#### 5.3.5.1. Actividad enzimática

La actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa, de la pepsina gástrica y de la tripsina de pancreatina fue determinada según lo recomendado por Minekus y col. (2014) (314).

**$\alpha$ -amilasa:** El ensayo para determinar la actividad de la  $\alpha$ -amilasa se basó en la siguiente reacción:



según la cual una unidad de enzima libera 1,0 mg de maltosa a partir del almidón en 3 min a pH 6,9 y a 20°C. Para realizar el ensayo, se utilizó como sustrato enzimático almidón de papa soluble (S2630, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) al 1,0% m/v en *buffer* fosfato de sodio 20 mM conteniendo NaCl 6,7 mM a pH 6,9.

En primer lugar, se preparó una solución de tartrato de sodio y potasio 5,3 M en NaOH 2 M y una solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (D0550, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 96 mM. Luego, se mezclaron 8 mL de la solución de tartrato de sodio y potasio, 20 mL de la solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico y 12 mL de agua desionizada. Además, se preparó una solución *stock* de  $\alpha$ -amilasa

(A9857, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 1 U mL<sup>-1</sup> disolviendo la enzima sólida en agua desionizada y se mantuvo a 4°C.

Se colocó un volumen de 1.000 µL de almidón de papa en tubo Falcon y se incubó en estufa a 37°C por 3-4 min para alcanzar una temperatura homogénea en el sustrato. Posteriormente, se adicionaron de 500 µL a 1.000 µL de la solución de α-amilasa para cada concentración y se incubó 3 min a 20°C de manera de que se produzca la reacción enzimática. Para la detención de la reacción se agregó 1,0 mL de la solución de tartrato de sodio y potasio y ácido 3,5-dinitrosalicílico (reactivo color) en cada tubo. Luego, se completó el volumen de la enzima hasta 1.000 µL, adicionando la cantidad de solución correspondiente en cada tubo. Los tubos fueron calentados a 100°C durante 15 min y, posteriormente, colocados en baño de hielo. Se adicionaron 9 mL de agua desionizada en cada tubo y se mezcló por inversión. Finalmente, se determinó la ABS a 540 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-vis Jenway 7305 (Reino Unido).

El blanco fue obtenido mediante la misma metodología, pero adicionando el volumen completo de la solución de α-amilasa luego de agregar la solución de tartrato de sodio y potasio y ácido 3,5-dinitrosalicílico (reactivo de color) y la mezcla se calentó a 100°C. Para obtener la curva *standard* de maltosa liberada se prepararon 6 soluciones a partir de una solución *stock* de maltosa 0,2% m/v (M5885, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) en agua desionizada y se adicionó 1,0 mL de reactivo de color a cada tubo. Los tubos fueron calentados a 100°C durante 15 min y, posteriormente, colocados en baño de hielo. Se adicionaron 9 mL de agua desionizada en cada tubo y se mezcló por inversión. Finalmente, se determinó la ABS a 540 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-vis Jenway 7305 (Reino Unido). Para la obtención del blanco se reemplazó la solución de maltosa por agua desionizada.

La actividad enzimática fue calculada obteniendo los parámetros de la ecuación obtenida por regresión lineal ( $R^2$  adj. 0,999) correspondiente a la curva *standard* de maltosa liberada y aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad enzimática} \left( \frac{U}{mg} \right) = \frac{(ABS_C - ABS_{\text{blanco}}) - b}{a * X} \quad (\text{Ecuación 36}),$$

donde  $ABS_C$  y  $ABS_{\text{blanco}}$  corresponden a la ABS a 540 nm de las diferentes concentraciones de enzima y del blanco, respectivamente,  $X$  es la cantidad de α-amilasa (mg) adicionada luego de la detención de la reacción y  $a$  y  $b$  corresponden a la pendiente y ordenada al origen de la ecuación lineal de la curva *standard* de maltosa liberada, respectivamente.

La actividad enzimática de la pepsina gástrica y de la tripsina de pancreatina fue determinada tal como se detalló en la [Sección 4.3.6.1](#).

### 5.3.5.2. Método estático consenso

El proceso gastrointestinal *in vitro*, basado en un método consenso internacional, fue llevado a cabo tal como se detalló en la Sección 4.3.6.2, con algunas modificaciones (314).

**Fase oral:** Durante esta fase la textura de los alimentos sólidos es significativamente alterada por la masticación y la acción de la saliva en la cavidad oral. Debido al corto tiempo de retención, solo una pequeña fracción de almidón es hidrolizada por la enzima  $\alpha$ -amilasa en la boca.

Antes de comenzar el ensayo se preparó previamente una solución *stock* de FSS 1,25X conteniendo KCl 15,1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,7 mM,  $\text{NaHCO}_3$  13,6 mM,  $\text{MgCl}_2$  0,15 mM y  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0,06 mM (Tabla 14) a la cual, posteriormente, se le adicionó una solución de  $\text{CaCl}_2$  0,3 M hasta alcanzar una concentración final de 0,75 mM.

En primer lugar, 0,5 g de pan (TOM-1 u ORE-1) fueron mezclados con 2,5 mL de FSS 1X en tubo de vidrio con tapa de cierre hermético. Se ajustó el pH a 7,0 y se adicionó una solución de  $\alpha$ -amilasa ( $75 \text{ U mL}^{-1}$ ). El pH final de las muestras fue chequeado y corregido a 7,0. Inmediatamente después, las muestras fueron incubadas a  $37^\circ\text{C}$  en un agitador rotatorio Rotator Multi Bio RS-24 (Boeco, Alemania) a 60 rpm durante 2 min. Por último, las muestras destinadas a digestión gástrica simulada continuaron con la siguiente fase, mientras que las muestras correspondientes a la digestión oral simulada (obtenidas por triplicado) fueron calentadas a  $100^\circ\text{C}$  durante 5 min para detener la reacción enzimática y analizadas inmediatamente o almacenadas a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el momento de ser utilizadas.

**Tabla 14.** Volumen de cada solución de electrolito necesario para preparar 400 mL de FSS 1,25X.

Solución	Concentración <i>stock</i>		Volumen <i>stock</i>	Concentración en FSS
	$\text{g L}^{-1}$	$\text{mol L}^{-1}$	mL	$\text{mmol L}^{-1}$
KCl	37,3	0,5	15,1	15,1
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	68	0,5	3,7	3,7
$\text{NaHCO}_3$	84	1	6,8	13,6
$\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$	30,5	0,15	0,5	0,15
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	48	0,5	0,06	0,06

Las fases de digestión gástrica e intestinal fueron llevadas a cabo tal como se detalló en la Sección 4.3.6.2, con leves modificaciones. El volumen final de la muestra sometida a digestión gástrica fue 6 mL y el correspondiente a la muestra sometida a digestión intestinal fue 12 mL.

Las muestras correspondientes a la digestión intestinal simulada se obtuvieron por triplicado y fueron analizadas inmediatamente o almacenadas a -20°C hasta el momento de ser examinadas.

La misma cantidad de agua desionizada en reemplazo de la muestra fue adicionada y sometida al mismo proceso gastrointestinal *in vitro* con el objetivo de obtener controles correspondientes a las soluciones FSS y FIS. Además, el mismo procedimiento fue realizado para el pan control.

### 5.3.5.3. Liberación de AE

Luego del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*, la liberación de los AEs fue evaluada según la metodología descrita previamente en la literatura (413). Se consideró que el AE liberado a partir de los panes TOM-1 y ORE-1 fue el AE determinado en el sobrenadante (fase micelar) proveniente del proceso de digestión intestinal *in vitro*, luego de centrifugar el digesto a 10.000 g durante 30 min y a 25°C, con el objetivo de eliminar material sólido insoluble. En el presente capítulo de tesis, la concentración de AE correspondiente a la fracción micelar se consideró como una medida de la liberación de AE en el tracto intestinal. Bajo estas condiciones, esta concentración podría estar disponible para su absorción intestinal.

Para ello, un volumen de 0,3 mL de digesto total o sobrenadante fue adicionado a 3 mL de acetato de etilo y la mezcla se agitó mecánicamente (vórtex) durante 1 min. Con el objetivo de lograr la estabilización, cada tubo conteniendo la mezcla permaneció en reposo durante 5 min. La fase superior de acetato de etilo fue analizada utilizando un espectrofotómetro UV-vis Jenway 7305 (Reino Unido) evaluando la ABS a 274 nm para la determinación de TOM y a 276 nm para la determinación de ORE (170,339,340). La concentración de AE fue calculada a partir de curvas de calibrado de TOM y ORE en acetato de etilo, detalladas en la Sección 3.3.5.3. Todas las determinaciones se llevaron a cabo a 25°C y se realizaron por triplicado.

### 5.3.5.4. Actividad antioxidante

#### 5.3.5.4.1. Capacidad de captación de radical ABTS<sup>+</sup>

La capacidad de captación de radical ABTS<sup>+</sup> (C<sub>ABTS<sup>+</sup></sub>, %) de los panes TOM-1 y ORE-1 después de la digestión intestinal *in vitro* (fase micelar) fue determinada por espectroscopía, de acuerdo con Cian y col. (2014) (171), siguiendo algunas modificaciones. En primer lugar, la solución de radical ABTS<sup>+</sup> fue preparada haciendo reaccionar 10 mL de reactivo ABTS (A1888, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 2 mM con 0,04 mL de persulfato de potasio 70 mM y mantenida por 16 h a 25°C y en oscuridad. Posteriormente y previo a realizar el ensayo, la solución de radical ABTS<sup>+</sup> fue diluida con PBS 0,01 M (pH 7,4) de forma de obtener un valor de ABS de 0,80 ± 0,03 a 734 nm. Luego, un volumen de 0,1 mL de muestra (diluida 1/5 con agua desionizada) fue adicionado a 1,9 mL de solución de radical ABTS<sup>+</sup> y la mezcla fue incubada en oscuridad a 25°C durante 6 min. Luego de transcurrido el tiempo correspondiente, la ABS fue

determinada a 734 nm utilizando un espectrofotómetro UV-vis Jenway 7305 (Reino Unido). Por otro lado, el mismo volumen de PBS en reemplazo de la muestra fue adicionado para la preparación del blanco. Todas las determinaciones se llevaron a cabo a 25°C y se realizaron por triplicado. El pan control y el control de la solución FIS, provenientes del proceso de digestión intestinal *in vitro*, fueron evaluados mediante la misma metodología.

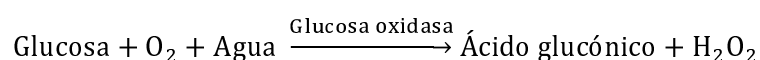
El porcentaje de captación de radical ABTS<sup>+</sup> (C<sub>ABTS+</sub>, %) fue calculado tal como se detalló en la Sección 3.3.6.1.

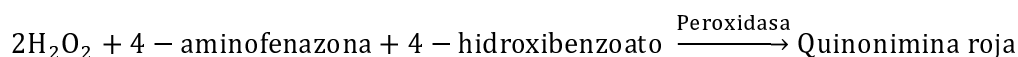
#### 5.3.5.4.2. Poder reductor

El poder reductor (PR, mg de equivalentes de ácido ascórbico (EAA) mL<sup>-1</sup> digesto) de los panes TOM-1 y ORE-1 después de la digestión intestinal *in vitro* (fase micelar) fue determinada por espectroscopía, de acuerdo con [Cian y col. \(2015\) \(172\)](#), siguiendo algunas modificaciones. Un volumen de 0,2 mL de muestra fue adicionado a 0,5 mL de *buffer* fosfato 0,2 M (pH 6,6) y 0,5 mL de solución de ferricianuro de potasio 1% m/v. La mezcla fue incubada a 50°C durante 20 min y, posteriormente, 0,5 mL de una solución de ácido tricloroacético al 10% m/v fue adicionada. Luego, se centrifugó a 8.000 g durante 5 min a 25°C y 1,0 mL de sobrenadante fue mezclado con 0,2 mL de cloruro férrico 0,1% m/v y 1 mL de agua desionizada. La mezcla se mantuvo en oscuridad a 50°C durante 10 min y, una vez transcurrido el tiempo correspondiente, la ABS fue determinada a 700 nm utilizando un espectrofotómetro UV-vis Jenway 7305 (Reino Unido). Por otro lado, el mismo volumen de agua desionizada en reemplazo de la muestra fue adicionado para la preparación del control negativo y el mismo volumen de agua desionizada en reemplazo de la muestra y en reemplazo del cloruro férrico fue adicionado para la preparación del blanco. Las determinaciones fueron llevadas a cabo a 25°C y realizadas por triplicado. Los resultados fueron expresados como mg de equivalentes de ácido ascórbico (EAA) mL<sup>-1</sup> digesto, utilizando una curva de calibrado de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) como reactivo *standard* en un rango de concentración de 0,01 a 0,10 g L<sup>-1</sup>. El pan control y el control de la solución FIS, provenientes del proceso de digestión intestinal *in vitro*, fueron evaluados mediante la misma metodología.

#### 5.3.5.5. Liberación de glucosa

La liberación de glucosa en los digestos provenientes de los panes TOM-1 y ORE-1 después de los procesos de digestión oral e intestinal *in vitro* fue determinada utilizando un kit comercial (Glicemia enzimática AA, Wiener Lab, Argentina), siguiendo las instrucciones del fabricante ([414](#)). El ensayo se basó en las siguientes reacciones:





La glucosa oxidasa actúa directamente sobre el sustrato (glucosa), originando ácido glucónico y peróxido de hidrogeno. Posteriormente, el peróxido de hidrogeno libera una molécula de oxígeno por acción de la peroxidasa, que reacciona con un aceptor de oxígeno dando lugar a un cromógeno (quinonimina roja). De este modo, el cromógeno se cuantifica fotométricamente, siendo su ABS proporcional a la concentración de glucosa presente.

En primer lugar, se adicionó un volumen de 20  $\mu\text{L}$  a 2 mL de reactivo de trabajo compuesto por una solución de glucosa oxidasa microbiana ( $10 \text{ kU L}^{-1}$ ), peroxidasa de rábano ( $1 \text{ kU L}^{-1}$ ), 4-aminofenazona 0,5 mM, *buffer* fosfato 100 mM a pH 7,0 y 4-hidroxibenzoato 12 mM. Las muestras se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 10 min. Luego de transcurrido el tiempo correspondiente, la ABS fue determinada a 505 nm utilizando un espectrofotómetro UV-vis Jenway 7305 (Reino Unido). Con el objetivo de obtener un valor *standard*, 20  $\mu\text{L}$  de una solución de glucosa  $100 \text{ g L}^{-1}$  fue adicionada a 2 mL de reactivo de trabajo y la mezcla fue sometida al mismo procedimiento. Además, el mismo volumen de agua desionizada en reemplazo de la muestra fue adicionado para la obtención del blanco. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. El pan control y el control de las soluciones FSS y FIS (provenientes del proceso de digestión *in vitro*) fueron evaluados mediante la misma metodología.

La concentración de glucosa ( $C_{\text{glucosa}}$ ,  $\text{g L}^{-1}$ ) fue calculada como sigue:

$$C_{\text{glucosa}} = \text{ABS}_{\text{muestra}} \times \frac{1 (\text{g L}^{-1})}{\text{ABS}_{\text{standard}}} \quad (\text{Ecuación 37}),$$

donde  $\text{ABS}_{\text{muestra}}$  y  $\text{ABS}_{\text{standard}}$  corresponden a la ABS a 505 nm de la muestra y del *standard*, respectivamente.

### 5.3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de todas las determinaciones se realizó por medio de análisis de variancia (ANOVA), utilizando el *software* R con interfaz RStudio versión 1.4.1717. Las diferencias significativas entre medias fueron determinadas utilizando test LSD con 95% de confianza ( $p < 0,05$ ). Para determinar los parámetros derivados del ajuste de modelos matemáticos se utilizó el *software* Origin versión 8.0724.

## 5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.4.1. Análisis termogravimétrico de polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub>

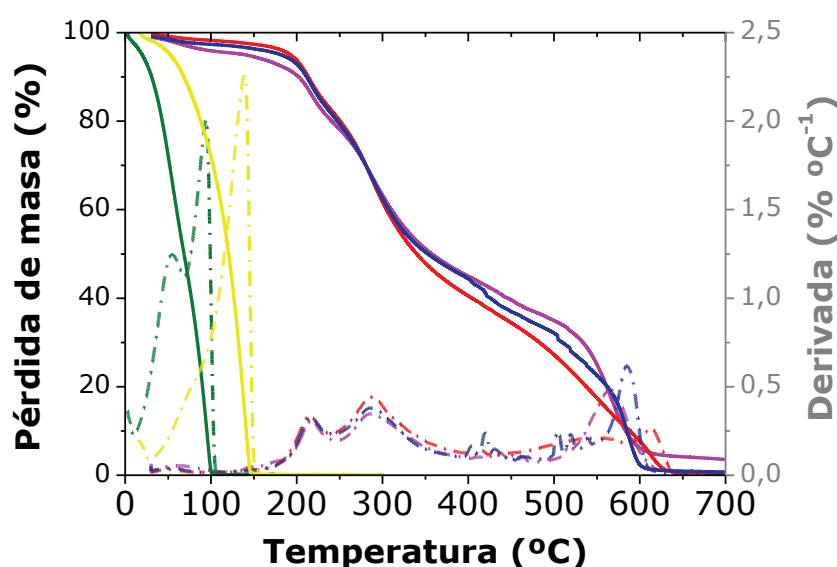
La estabilidad térmica de los CBs es una de las propiedades más importantes cuando son empleados para obtener alimentos funcionales horneados debido a las altas temperaturas a las que son sometidos en las diferentes etapas de elaboración. A su vez, si se propone la encapsulación de CBs en partículas biopoliméricas como estrategia para mejorar su estabilidad térmica, la capacidad de protección de dichas partículas debe ser convenientemente evaluada. El TGA es una técnica de gran utilidad para determinar la pérdida de peso de una muestra como una función de la temperatura y, de este modo, analizar su estabilidad térmica (142,415).

En la Fig. 26 se presentan las curvas de TGA y de DTG correspondientes a los polvos EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub>, al polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> y a los controles de AEs puros (TOM y ORE). En particular, la curva de DTG (correspondiente a la primera derivada de la curva TGA) permite visualizar la velocidad de variación de la masa durante el calentamiento.

A partir de las curvas de TGA de TOM y ORE puros, se pudo observar que estos AEs exhibieron una reducción rápida y marcada del porcentaje de masa inmediatamente después del aumento de la temperatura, asociada a la volatilización y descomposición térmica de sus componentes. En el caso de TOM puro, se produjo la pérdida de casi la totalidad de masa antes de los 100°C, sugiriendo que este AE en forma libre sería altamente volátil y susceptible a la degradación térmica. Además, la curva de DTG correspondiente a TOM puro presentó dos picos, uno a 54,80°C y el otro a 94,32°C (Fig. 26). En otro estudio, Fonseca y col. (2020) (416) obtuvieron una curva de TGA para TOM libre y observaron que la pérdida de masa comenzó a los 62,1°C y ocurrió en un solo paso. Además, los autores informaron que el pico de la curva de DTG correspondiente al único paso de descomposición térmica de TOM se encontró a 92,1°C. Por otro lado, ORE puro evidenció en la curva de TGA la pérdida de casi la totalidad de masa antes de los 150°C, lo que indicaría que este AE en forma libre es altamente volátil y termosensible, aunque en menor grado que TOM puro. Adicionalmente, se pudo observar que la curva de DTG de ORE puro exhibió un único pico a 139,36°C. Este resultado fue consistente con Fraj y col. (2019) (92), quienes obtuvieron una curva de TGA de ORE puro en la cual la pérdida de masa ocurre rápidamente en un único paso. Sin embargo, los autores indicaron que la disminución del porcentaje de masa comenzó a partir de los 140°C y se extendió hasta los 250°C.

Por otro lado, la curva de DTG del polvo EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> presentó tres picos principales, los cuales se encontraron a 215,34, 287,42 y 613,52°C (Fig. 26). Debido a que la curva de DTG del polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> exhibió picos similares (a 216,90, 285,85 y 565,69°C), fue posible deducir que dichos picos corresponderían a la descomposición térmica de los biopolímeros presentes en el polvo, es decir, a EWPn y PAM. Cabe mencionar que no se identificó en las curvas de TGA del polvo EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> una disminución del porcentaje de masa correspondiente a la degradación térmica

de TOM (antes de los 100°C), sugiriendo que el coacervado complejo protegería de manera efectiva al AE frente a elevadas temperaturas. Por su parte, el polvo EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> exhibió el mismo comportamiento que el polvo EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub>, con tres picos principales en la curva de DTG a 216,34, 285,47 y 584,84°C (Fig. 26). Nuevamente, los picos fueron similares a los de la curva de DTG del polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> y no se apreció el pico correspondiente a la degradación térmica de ORE (cerca a 140°C). Estos resultados sugieren que el coacervado complejo ejercería una acción protectora sobre el AE frente a elevadas temperaturas. Además, la curva de DTG del polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> presentó un cuarto pico a 61,40°C, el cual podría atribuirse a la evaporación de agua. Este pico también se observó en las curvas de DTG de los polvos EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> y EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> a 47,99 y 52,93°C, respectivamente.



**Figura 26.** Curvas de TGA (línea continua) y DTG (línea de puntos) de polvos EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> (■), EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> (■), polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> (■), TOM (■) y ORE (■) puros.

En un estudio reciente, [Zhang y Wang \(2024\) \(417\)](#) obtuvieron una curva de TGA para EWP en la que la pérdida de masa ocurrió en tres pasos. En primer lugar, se observó una considerable reducción del porcentaje de masa antes de los 85°C, que fue asociada a la deshidratación de las proteínas. Luego, ocurrió una marcada pérdida de masa entre los 85 y 321°C, sugiriendo la inicial descomposición y eliminación de grupos hidroxilo de las macromoléculas orgánicas, además de la ruptura de puentes de hidrógeno. Por último, los autores reportaron que el último paso de pérdida de masa (entre 321 y 600°C) sería resultado de la descomposición y carbonización de las proteínas. Respecto al TGA de PAM, [Wani y Uppaluri \(2023\) \(418\)](#) observaron que la descomposición térmica en la curva de TGA estuvo representada por tres regiones



principales. En primer lugar, se evidenció una disminución del porcentaje de masa entre los 25 y 140°C, la que correspondería a la evaporación de agua. Posteriormente, una mayor reducción del porcentaje de masa fue reportada entre los 190 y 290°C, sugiriendo que el PS sufriría un proceso de pirólisis en este paso. De este modo, las cadenas de ácido galacturónico comenzarían a descomponerse debido a la alta temperatura generando diversos productos volátiles y residuos sólidos carbonizados. En el último paso, entre 290 y 700°C, se pudo observar una disminución del porcentaje de masa, la cual fue asociada a la volatilización de otros compuestos (descomposición térmica de residuos carbonizados) y eliminación de moléculas de agua. En otro estudio, [Kozioł y col. \(2022\) \(408\)](#) reportaron un comportamiento similar al perfil de TGA correspondiente a una pectina comercial. En este caso, la curva de DTG presentó cuatro picos principales, tal como se observó para el polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> analizado en el presente trabajo. Los autores indicaron que el primer pico (a 60,0°C) correspondería a la pérdida de moléculas de agua y otros compuestos volátiles, mientras que los picos restantes (a 200,0, 229,0 y 882,7°C) estarían asociados al proceso de pirólisis (descarboxilación primaria y secundaria). Cabe destacar que la pectina comercial y el polvo control EWPn-PAM<sub>liof</sub> no solo exhibieron la misma cantidad de pasos de descomposición térmica, sino que los picos presentados en sus curvas de DTG evidenciaron valores de temperatura similares.

Diferentes estudios han demostrado mediante TGA la capacidad de coacervados complejos para incrementar la estabilidad térmica de AEs. En un trabajo, [Chaib y col. \(2021\) \(419\)](#) evaluaron la estabilidad térmica de TOM libre y encapsulado en un coacervado complejo de gelatina y goma arábiga. Los autores obtuvieron un perfil de TGA para TOM libre con dos pasos de pérdida de masa, el cual comenzó a los 110°C y se extendió hasta los 275°C. Además, los biopolímeros analizados individualmente también presentaron dos pasos de pérdida de masa. Se pudo observar una pequeña disminución del porcentaje de masa antes de los 200°C, la cual fue atribuida a la evaporación del agua absorbida tanto en la proteína como en el PS, y una reducción rápida y marcada del porcentaje de masa por encima de los 300°C. Cuando se evaluó la estabilidad térmica de TOM encapsulado en el coacervado, la curva de TGA presentó tres pasos de pérdida de masa. El primero de ellos evidenció una pequeña pérdida de masa antes de los 110°C, la cual correspondería a la evaporación del agua absorbida en la superficie del coacervado. Luego, una importante disminución del porcentaje de masa, observada entre los 110 y 240°C, fue atribuida a la volatilización de TOM encapsulado. El último paso de pérdida de masa ocurrió entre los 270 y 370°C, siendo este asociado al deterioro de la gelatina y la goma arábiga. Además, [Karagozlu y col. \(2021\) \(144\)](#) desarrollaron coacervados complejos de gelatina y goma arábiga con el objetivo de encapsular AE extraído a partir de la especie *Origanum onites*. Al obtener las curvas de TGA del AE libre, los autores indicaron una pérdida de masa en un único paso que comenzó a los 75,38°C y se extendió hasta los 148,22°C, sugiriendo la descomposición completa de los compuestos volátiles. Contrariamente, la curva de TGA del AE encapsulado presentó dos pasos de pérdida de masa. En primer lugar, se observó una disminución del porcentaje de masa antes de los 120°C, la cual fue atribuida a la evaporación de agua y AE sin encapsular. Seguidamente, ocurrió una rápida y marcada pérdida de masa entre 157,50 y 207,30°C, sugiriendo la

descomposición térmica de los biopolímeros y de la fracción de AE encapsulado. Por su parte, [Tavares y Zapata Noreña \(2020\) \(295\)](#) encapsularon AE de jengibre en coacervados complejos de aislado de proteína de suero y goma arábiga. A partir de las curvas de TGA y DTG obtenidas, los autores informaron que el proceso de descomposición del AE encapsulado ocurrió en tres pasos. La primera pérdida de masa (entre 40 y 105°C) fue asociada a la descomposición térmica del AE sin encapsular y a la evaporación de agua absorbida, mientras que la segunda y tercera disminución del porcentaje de masa (las cuales ocurrieron entre 105 y 400°C y entre 500 y 700°C, respectivamente) fueron atribuidas a la descomposición y despolimerización de las proteínas, el PS y la fracción de AE encapsulado. Contrariamente, el AE puro evidenció una rápida y pronunciada reducción del porcentaje de masa en un único paso, desde los 100°C hasta los 200°C. Este resultado indicaría la volatilización y descomposición térmica de los compuestos presentes en el AE sin encapsular frente a elevadas temperaturas.

#### **5.4.2. Caracterización de panes que incorporan EWPn–AE–PAM<sub>ltof</sub>**

##### **5.4.2.1. Humedad y actividad acuosa**

Tanto la calidad como la vida útil de los productos panificados están fuertemente influenciadas por su contenido y distribución del agua. La capacidad de la masa para absorber agua y la interacción de las moléculas de agua con otros ingredientes de la formulación puede afectar directamente la textura, el volumen, el color y otras propiedades del pan [\(420\)](#). Los parámetros utilizados para brindar información sobre la cantidad, distribución y disponibilidad de agua en un alimento son el contenido de humedad y la  $a_w$ . La  $a_w$  es una medida de la disponibilidad de agua libre en el alimento que es responsable de las reacciones químicas y biológicas que se llevan a cabo, y se calcula como la relación entre la presión de vapor del agua en el alimento y la presión de vapor del agua pura. Este parámetro representa un importante índice para determinar la estabilidad microbiológica de dicho alimento. De este modo, elevados valores de  $a_w$  favorecen el crecimiento de casi todos los microorganismos contaminantes de pan, ya que esta condición proporciona una fase acuosa esencial para su actividad metabólica [\(36,421,422\)](#).

Aunque la corteza y la miga provienen de la misma masa, las características fisicoquímicas y sensoriales difieren debido al contenido de humedad y la  $a_w$  en cada una de estas secciones del pan [\(389\)](#). Además, el agregado de ingredientes funcionales en la formulación puede alterar dichos valores en menor o mayor medida, modificando las propiedades del producto y la aceptabilidad de los consumidores. Al respecto, cuando el contenido de humedad es bajo se promueve la reacción de Maillard y, en consecuencia, la corteza del pan presenta un color oscuro. Por otro lado, cuando la cantidad de agua es insuficiente, el gluten no se hidrata completamente y, en consecuencia, se pierde la elasticidad de la masa. En contraste, un exceso de agua en la masa le otorga elevada viscosidad, disminuyendo la resistencia a la extensión y aumentando la adherencia [\(397\)](#).

El efecto de la incorporación de los polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> a la formulación de pan de molde sobre el contenido y distribución de agua se analizó mediante la determinación de la humedad y la  $a_w$  de los panes. En la [Tabla 15](#) se muestra el contenido de humedad (%) de los panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 y del pan control. Como se puede observar, no hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores de humedad de cada uno de los panes desarrollados (TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1) respecto al valor del pan control, indicando que el agregado de polvo EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> o EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> no afectaría la capacidad de la masa de retener moléculas de agua. El pan control presentó un valor de humedad de  $32,9 \pm 0,9\%$ , mientras que los panes con polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> evidenciaron valores entre  $31,3 \pm 1,6\%$  (TOM-1) y  $34,3 \pm 0,9\%$  (ORE-0,5). Por otro lado, no hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los valores de humedad de los panes TOM-0,5 y TOM-1, ni entre los valores de los panes ORE-0,5 y ORE-1 ([Tabla 15](#)). Esto sugiere que, en el rango de concentración evaluado, la humedad de los panes no dependería de la cantidad de polvo incorporado en la formulación. Sin embargo, el pan ORE-0,5 presentó un porcentaje de humedad significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el pan TOM-0,5 y, por su parte, el pan ORE-1 evidenció un valor de humedad significativamente más elevado ( $p < 0,05$ ) que el pan TOM-1 ([Tabla 15](#)). Según estos resultados, el polvo EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> le otorgaría a la masa una mayor capacidad para absorber moléculas de agua que el polvo EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub>.

En un estudio, [Sivam y col. \(2011\) \(423\)](#) incorporaron diferentes pectinas y extractos fenólicos a panes con el objetivo de evaluar el efecto del agregado de estos ingredientes sobre el contenido de humedad del pan. Los autores reportaron que los panes que incorporaron pectina, extracto fenólico o ambos (panes funcionales) presentaron un contenido de humedad similar pero levemente mayor respecto al pan control. Los panes funcionales presentaron porcentajes de humedad entre 38,0 y 40,0%, mientras que el pan control evidenció un valor de 31,0%. A partir de estos resultados, los autores sugirieron que una apreciable cantidad de agua se uniría a las pectinas y a los compuestos fenólicos de los extractos, aumentando el contenido de humedad en el pan. Este fenómeno podría deberse a interacciones químicas entre las moléculas de agua y los grupos amino, carbonilo e hidroxilo del PS y de los compuestos fenólicos. Por otro lado, las variaciones en la cantidad de agua unida o absorbida que se reportaron entre panes funcionales podrían deberse a diferencias en el grado de metoxilación de las pectinas y/o en la estructura química de los diversos compuestos fenólicos empleados en el estudio. Finalmente, cabe mencionar que el resultado obtenido para el pan control fue consistente con el valor de humedad correspondiente al pan control del presente trabajo.

**Tabla 15.** Contenido de humedad (%) y valor de  $a_w$  (corteza y miga) de panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 y pan control. Resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ).

Pan	Humedad (%)	$a_w$ (corteza)	$a_w$ (miga)
<b>Control</b>	$32,9 \pm 0,9^{a,b,c}$	$0,899 \pm 0,008^b$	$0,962 \pm 0,001^b$
<b>TOM-0,5</b>	$32,3 \pm 0,8^{b,c}$	$0,896 \pm 0,003^b$	$0,962 \pm 0,001^b$
<b>TOM-1</b>	$31,3 \pm 1,6^c$	$0,913 \pm 0,004^a$	$0,962 \pm 0,002^b$
<b>ORE-0,5</b>	$34,3 \pm 0,9^a$	$0,919 \pm 0,001^a$	$0,962 \pm 0,001^b$
<b>ORE-1</b>	$33,7 \pm 0,6^{a,b}$	$0,920 \pm 0,001^a$	$0,967 \pm 0,002^a$

Por otro lado, en la [Tabla 15](#) se presentan los valores de  $a_w$  de la corteza y de la miga de los panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 y del pan control. Como se puede observar, los valores de  $a_w$  de la corteza de los panes desarrollados (TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1) aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) respecto al pan control, con excepción del pan TOM-0,5, el cual no evidenció diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre su valor de  $a_w$  de la corteza y el valor del pan control. Los panes desarrollados exhibieron  $a_w$  de la corteza entre  $0,896 \pm 0,003$  (TOM-0,5) y  $0,920 \pm 0,001$  (ORE-1), mientras que el pan control presentó un valor de  $0,899 \pm 0,008$ . Además, la  $a_w$  de la corteza de TOM-1 resultó significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que la de TOM-0,5, sugiriendo que este parámetro dependería de la cantidad de polvo EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> incorporado en la formulación en el rango de concentración evaluado. Contrariamente, los valores de  $a_w$  de la corteza de ORE-0,5 y ORE-1 no presentaron diferencia significativa ( $p < 0,05$ ), lo que indicaría que la cantidad de polvo EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> no ejercería efectos sobre la disponibilidad de agua libre en la corteza en el rango de concentración evaluado ([Tabla 15](#)). Cabe mencionar que la corteza del pan TOM-0,5 evidenció un valor de  $a_w$  significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que la corteza del pan ORE-0,5, mientras que la corteza de los panes TOM-1 y ORE-1 no presentaron diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) respecto a dicho parámetro ([Tabla 15](#)). Estos resultados sugieren que la  $a_w$  de la corteza de los panes desarrollados dependería del polvo EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> incorporado a la menor concentración evaluada. En este caso, el polvo EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> permitiría una mayor disponibilidad de agua libre en la corteza que el polvo EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub>.

Finalmente, los valores de  $a_w$  de la miga de los panes desarrollados (TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1) no presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al pan control, con excepción del pan ORE-1, el cual evidenció un valor de  $a_w$  de la miga significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el valor del pan control ([Tabla 15](#)). Los panes desarrollados exhibieron valores de  $a_w$  de la miga entre  $0,962 \pm 0,002$  (TOM-1) y  $0,967 \pm 0,002$  (ORE-1), mientras que la  $a_w$  de la miga del pan control resultó  $0,962 \pm 0,001$ .

Además, no hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre la  $a_w$  de la miga de TOM-0,5 y TOM-1, indicando que la disponibilidad de agua libre en la miga no dependería de la cantidad de polvo EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> incorporado en el rango de concentración evaluado. Sin embargo, la miga del pan ORE-1 presentó un valor de  $a_w$  significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que la miga del pan ORE-0,5, es decir, el polvo EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> tendría diferente efecto sobre la disponibilidad de agua libre en la miga según la cantidad incorporada en la formulación del pan (Tabla 15). Por último, no hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre la  $a_w$  de la miga del pan TOM-0,5 y del pan ORE-0,5, mientras que la miga del pan ORE-1 presentó un valor de  $a_w$  significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) respecto a la miga del pan TOM-1 (Tabla 15). Según los resultados expuestos, la disponibilidad de agua libre en la miga dependería del polvo EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> incorporado a la formulación a nivel de la mayor concentración evaluada. En un estudio, Scappaticci y col. (2024) (424) obtuvieron panes funcionales con el agregado de pectina, orujo o ambos ingredientes y determinaron la  $a_w$  de la miga. Los autores indicaron que los valores de  $a_w$  de los panes funcionales, que se encontraron entre 0,916 y 0,929, resultaron similares al valor del pan control (0,937). Sin embargo, la miga del pan formulado con el agregado de pectina presentó un valor de  $a_w$  significativamente menor ( $p < 0,001$ ) frente al resto de los panes.

#### 5.4.2.2. Perfil de textura y color

La incorporación de ingredientes funcionales a la formulación de pan de molde puede modificar la textura de dicho alimento. A su vez, la textura involucra diversos parámetros que, particularmente en productos panificados, determinan la calidad y resultan críticos para la aceptabilidad de los consumidores. Por este motivo, el efecto de la incorporación de polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> en la formulación sobre diferentes atributos de textura del pan se evaluó mediante un TPA.

En la Fig. 27A se presenta la dureza (N) de los panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 y del pan control. Como se puede observar, los panes desarrollados TOM-0,5 y TOM-1 no evidenciaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el valor de dureza ( $1,8 \pm 0,4$  N y  $1,9 \pm 0,7$  N, respectivamente) respecto al valor del pan control ( $1,9 \pm 0,3$  N). Contrariamente, la incorporación del polvo EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) la dureza de los panes ORE-0,5 y ORE-1 ( $6,0 \pm 0,8$  N y  $6,6 \pm 0,8$  N, respectivamente) en comparación con la dureza exhibida por el pan control. Además, no hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los valores de dureza de los panes TOM-0,5 y TOM-1 y entre los valores de los panes ORE-0,5 y ORE-1 (Fig. 27A). Este resultado sugiere que la dureza de los panes desarrollados no dependería de la cantidad de polvo incorporado a la formulación en el rango de concentración evaluado. Cabe mencionar que, a nivel de la misma concentración de polvo EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub>, los panes conteniendo EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> presentaron valores de dureza significativamente más altos que los panes conteniendo EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> (Fig. 27A).

Por otro lado, en la Fig. 27B se presenta la masticabilidad (mJ) de los panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 y del pan control. Del mismo modo que en el análisis anterior, los panes desarrollados TOM-0,5 y TOM-1 no evidenciaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el valor de masticabilidad ( $0,7 \pm 0,2$  mJ y  $0,7 \pm 0,3$  mJ, respectivamente) respecto al valor del pan control ( $0,6 \pm 0,1$  mJ), mientras que la incorporación de polvo EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) la masticabilidad de los panes ORE-0,5 y ORE-1 ( $2,5 \pm 0,8$  mJ y  $2,5 \pm 0,3$  mJ, respectivamente) en comparación con la masticabilidad correspondiente al pan control. Tal como ocurrió para el atributo de dureza, no hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores de masticabilidad de los panes TOM-0,5 y TOM-1 y entre los valores de los panes ORE-0,5 y ORE-1, lo que sugiere que la masticabilidad de los panes desarrollados no dependería de la cantidad de polvo incorporado a la formulación en el rango de concentración evaluado (Fig. 27B). Además, al comparar los panes con una misma concentración de polvo EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> se pudo observar que los panes que incorporaron el polvo EWPn-ORE-PAM<sub>liof</sub> presentaron valores significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) de masticabilidad que aquellos que incorporaron el polvo EWPn-TOM-PAM<sub>liof</sub> (Fig. 27B).

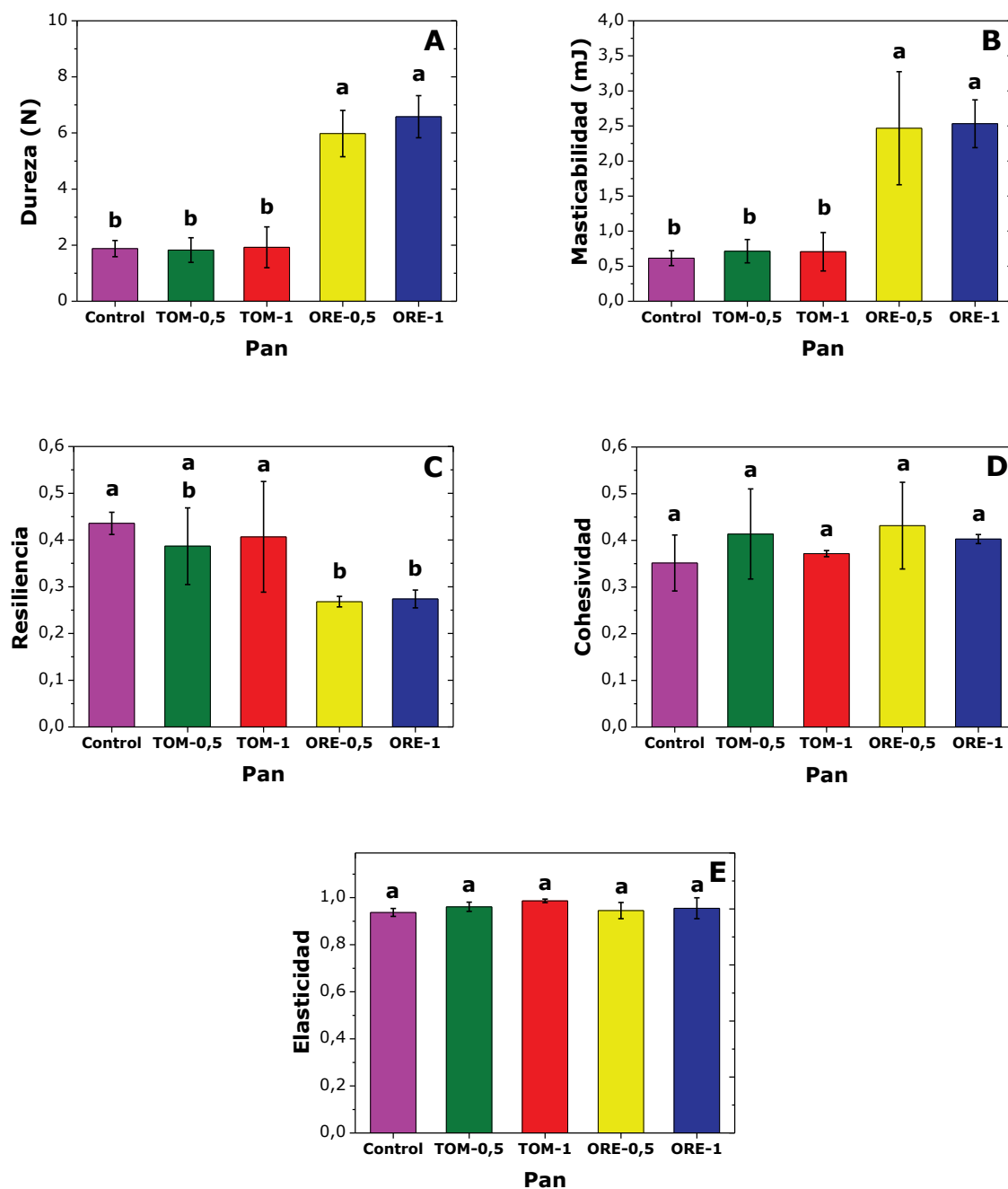
La Fig. 27C muestra la resiliencia de los panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 y del pan control. Como se puede observar, los valores de resiliencia de los panes TOM-0,5 y TOM-1 ( $0,39 \pm 0,08$  y  $0,41 \pm 0,12$ , respectivamente) no presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al pan control ( $0,44 \pm 0,02$ ). Sin embargo, los panes ORE-0,5 y ORE-1 evidenciaron valores de resiliencia significativamente menores ( $p < 0,05$ ) en comparación con el pan control. El pan ORE-0,5 exhibió un valor de resiliencia de  $0,27 \pm 0,01$ , mientras que el valor del pan ORE-1 resultó  $0,27 \pm 0,02$ . Del mismo modo que para los atributos dureza y masticabilidad, no se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores de resiliencia de los panes TOM-0,5 y TOM-1 y entre los valores de los panes ORE-0,5 y ORE-1, lo que sugiere que este parámetro no dependería de la cantidad de polvo incorporado a la formulación en el rango de concentración evaluado (Fig. 27C). Al comparar los panes con una misma concentración de polvo EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> se observaron dos comportamientos diferentes. En primer lugar, no hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los valores de resiliencia de los panes TOM-0,5 y ORE-0,5. Sin embargo, el valor de resiliencia del pan TOM-1 resultó significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el valor del pan ORE-1 (Fig. 27C).

Además, en la Fig. 27D se presenta la cohesividad de los panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 y del pan control. En este caso, ninguno de los panes desarrollados (TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1) evidenció diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) frente al pan control, respecto a los valores de cohesividad. El pan control exhibió un valor de cohesividad de  $0,35 \pm 0,06$ , mientras que los panes desarrollados presentaron valores entre  $0,37 \pm 0,01$  (TOM-1) y  $0,43 \pm 0,09$  (ORE-0,5).

Finalmente, la Fig. 27E muestra la elasticidad de los panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 y del pan control. Tal como ocurrió en el análisis de cohesividad, ninguno de los panes desarrollados

(TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1) evidenció diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) frente al pan control, respecto a los valores de elasticidad. El valor del pan control resultó  $0,94 \pm 0,02$ , mientras que los panes desarrollados presentaron valores entre  $0,93 \pm 0,03$  (ORE-0,5) y  $0,99 \pm 0,01$  (TOM-1).

En un estudio, [Boubaker y col. \(2016\) \(402\)](#) utilizaron polvo de alcachofa (rico en ácidos fenólicos, flavonoides, cinarina, inulina, compuestos amargos, minerales y vitaminas, entre otros) para sustituir la harina de trigo en la formulación de panes y evaluaron la textura de la miga a través de un TPA. Los autores informaron que la dureza de la miga del pan control resultó 1,41 N y, luego, fue aumentando conforme incrementó la cantidad de harina reemplazada hasta alcanzar un valor de 2,30 N. Respecto a la masticabilidad, la miga del pan control presentó un valor de 1,01 mJ y, nuevamente, los valores aumentaron con el incremento de la cantidad de harina reemplazada, obteniendo un valor máximo de 1,66 mJ. Finalmente, no hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores de resiliencia del pan control y de los panes con polvo de alcachofa, los cuales se encontraron entre 0,29 y 0,30. Cabe mencionar que estos resultados fueron consistentes con los valores de dureza, masticabilidad y resiliencia obtenidos en el presente trabajo, principalmente aquellos que correspondieron al pan control.



**Figura 27.** Dureza (N) (A), masticabilidad (mJ) (B), resiliencia (C), cohesividad (D) y elasticidad (E) de panes TOM-0,5 (■), TOM-1 (■), ORE-0,5 (■) y ORE-1 (■) y pan control (■). Cada barra representa el promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

La incorporación de ingredientes funcionales a la formulación de pan de molde también puede modificar la apariencia visual de dicho alimento. En productos panificados, el color proporciona información respecto a la calidad y frescura, por lo que una variación del color puede afectar directamente la percepción y aceptabilidad de los consumidores (400,425). Por este motivo, el efecto de la incorporación



de polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> en la formulación de panes sobre diferentes parámetros de color se evaluó a través del sistema CIELab.

En la [Tabla 16](#) se presentan los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y  $\Delta E^*$  de la corteza y de la miga de los panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 y del pan control. En general, los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  de la corteza de los panes desarrollados (TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1) resultaron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) en comparación con los valores del pan control. Sin embargo, no hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el parámetro  $b^*$  de la corteza de los panes TOM-0,5 y TOM-1 frente al valor del pan control ([Tabla 16](#)). Cabe mencionar que la corteza de los panes desarrollados TOM-0,5 y TOM-1 resultaron marcadamente más oscuras que el pan control, mientras que los panes ORE-0,5 y ORE-1 presentaron una corteza considerablemente más clara respecto al pan control.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el parámetro  $L^*$  de la miga de los panes desarrollados (TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1) respecto al valor del pan control ([Tabla 16](#)). Esto sugiere que la luminosidad de la miga no resultaría afectada luego de la incorporación de polvo EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> en la formulación, a nivel de las concentraciones evaluadas. En relación con el parámetro  $a^*$  de la miga, no hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los panes TOM-0,5 y TOM-1 y el pan control. Contrariamente, los valores  $a^*$  de la miga de los panes ORE-0,5 y ORE-1 resultaron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) que el pan control ([Tabla 16](#)). Por otra parte, los valores  $b^*$  de la miga de los panes desarrollados resultaron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) que el valor del pan control, con excepción del pan TOM-0,5. En este caso, no hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre el parámetro  $b^*$  de la miga del pan TOM-0,5 y el correspondiente a la miga del pan control ([Tabla 16](#)).

Finalmente, el valor de  $\Delta E^*$  determinado entre cada uno de los panes desarrollados y el pan control proporciona información respecto a la relevancia de una potencial variación de color luego de la incorporación de polvo EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> en la formulación. El parámetro  $\Delta E^*$  suele clasificarse como diferencia pequeña (valores entre 0 y 1,5), diferencia perceptible (valores entre 1,5 y 3,0) y diferencia muy perceptible (valores mayores a 3,0) ([426](#)). Como puede observarse en la [Tabla 16](#), todos los panes desarrollados (TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1) presentaron diferencias de color perceptibles y muy perceptibles, tanto para valores de  $\Delta E^*$  de la corteza como de la miga. Por otro lado, no hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los valores de  $\Delta E^*$  de la corteza de los panes TOM-0,5 y TOM-1 ( $1,8 \pm 0,4$  y  $2,8 \pm 1,0$ , respectivamente), sugiriendo que la cantidad de polvo agregado en la formulación del pan no afectaría la magnitud del cambio de color en el rango de concentración evaluado. Contrariamente, el  $\Delta E^*$  de la corteza del pan ORE-0,5 fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que la correspondiente a la corteza del pan ORE-1, cuyos valores resultaron  $6,7 \pm 0,7$  y  $8,9 \pm 1,1$ , respectivamente ([Tabla 16](#)). En relación con la  $\Delta E^*$  de la miga de los panes desarrollados, no hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores de TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1. En este caso, el valor de la  $\Delta E^*$  se encontró entre  $1,2 \pm 0,1$  (TOM-1) y  $2,1 \pm 0,9$  (ORE-1).

Tal como se mencionó previamente, [Sivam y col. \(2011\) \(423\)](#) incorporaron diferentes pectinas y extractos fenólicos a panes con el objetivo de evaluar el efecto del agregado de estos ingredientes sobre ciertas características organolépticas. Respecto a la apariencia visual, se observaron importantes diferencias de color, representadas por los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , entre la miga del pan control y la miga de los panes funcionales. La incorporación de pectinas evidenció valores de  $\Delta E^*$  entre 6,1 y 15,1, mientras que tras el agregado de extractos fenólicos se obtuvieron valores entre 11,0 y 50,0. Dichos extractos fenólicos consistieron en polvos marrones, amarillentos y violetas, motivo por el cual los autores atribuyeron los valores considerablemente elevados de  $\Delta E^*$  a la presencia de estos polvos en la formulación del pan. Adicionalmente, [Scappaticci y col. \(2024\) \(424\)](#) determinaron los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  de la miga de panes que incorporaron pectina, orujo o ambos ingredientes a la formulación y los compararon con los parámetros de un pan control. Según los valores obtenidos, el pan con pectina presentó mayor luminosidad que el pan control, mientras que los panes con orujo resultaron notablemente más oscuros. En relación al  $\Delta E^*$ , los autores reportaron que el pan con pectina exhibió una variación de color apenas distinguible frente al pan control, ya que el valor de  $\Delta E^*$  resultó 2. Por otro lado, los panes con orujo y con ambos ingredientes evidenciaron un color completamente diferente al del pan control, para los cuales el valor de  $\Delta E^*$  resultó 24 y 16, respectivamente.

**Tabla 16.** Parámetros de color de panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 y pan control. Resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos de un mismo parámetro ( $p < 0,05$ ).  $L^*$ : luminosidad,  $a^*$ : eje rojo-verde,  $b^*$ : eje amarillo-azul,  $\Delta E^*$ : diferencia total de color, C: corteza, M: miga.

Pan	$L^*$		$a^*$		$b^*$		$\Delta E^*$	
	C	M	C	M	C	M	C	M
<b>Control</b>	55,4 $\pm$ 1,8 <sup>c</sup>	64,3 $\pm$ 2,7 <sup>a,b</sup>	15,8 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	1,0 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	32,8 $\pm$ 1,6 <sup>c</sup>	15,7 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>	-	-
<b>TOM-0,5</b>	53,9 $\pm$ 0,8 <sup>d</sup>	64,3 $\pm$ 2,8 <sup>a,b</sup>	16,5 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,1 $\pm$ 0,4 <sup>a,b</sup>	33,3 $\pm$ 0,6 <sup>b,c</sup>	16,1 $\pm$ 1,1 <sup>b,c</sup>	1,8 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	1,6 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
<b>TOM-1</b>	53,3 $\pm$ 1,5 <sup>d</sup>	64,6 $\pm$ 1,3 <sup>a,b</sup>	16,5 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	1,2 $\pm$ 0,2 <sup>a,b</sup>	32,9 $\pm$ 1,9 <sup>c</sup>	16,6 $\pm$ 0,8 <sup>a,b</sup>	2,8 $\pm$ 1,0 <sup>c</sup>	1,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
<b>ORE-0,5</b>	61,6 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>	63,3 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>	14,1 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>	1,4 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	34,7 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	16,9 $\pm$ 1,1 <sup>a,b</sup>	6,7 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	1,7 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
<b>ORE-1</b>	63,7 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	65,7 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	13,1 $\pm$ 0,8 <sup>d</sup>	1,4 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	34,2 $\pm$ 0,8 <sup>ab</sup>	17,1 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	8,9 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	2,1 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>

#### 5.4.2.3. Análisis sensorial

Como se mencionó anteriormente, la incorporación de ingredientes funcionales a la formulación de pan de molde puede alterar las características organolépticas de dicho alimento, tales como la textura y el

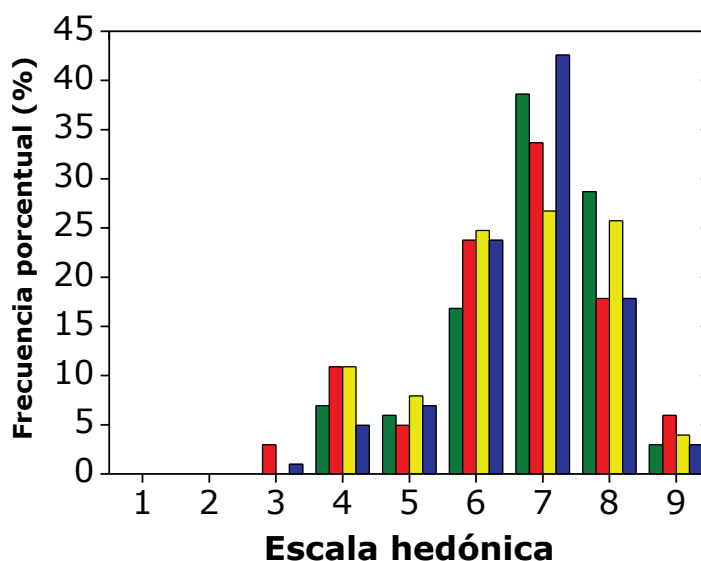
color. En particular, cuando el ingrediente presenta una marcada naturaleza aromática, la calidad del pan y la aceptabilidad de los consumidores puede estar condicionada fundamentalmente por modificaciones en el aroma del producto, que se complementan con los potenciales cambios en la textura y color abordados con anterioridad. Por este motivo, se evaluó el efecto de la incorporación de polvos EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub> en pan de molde sobre la aceptabilidad general de los consumidores.

Los puntajes del análisis sensorial para los panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 provenientes de la prueba hedónica horizontal de 9 puntos se muestran en la [Tabla 17](#). Como se puede observar, los panes desarrollados presentaron puntajes entre  $6,51 \pm 1,45$  (TOM-1) y  $6,85 \pm 1,19$  (TOM-0,5), y no hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre ellos. Debido a que, generalmente, el umbral de aceptabilidad se establece en 5 o 6 puntos, fue posible concluir que todos los panes desarrollados fueron considerados aceptables por los consumidores ([427,428](#)).

Además, en la [Fig. 28](#) se presenta la frecuencia porcentual (%) correspondiente a cada puntaje de la escala hedónica (1 a 9) de panes los panes desarrollados TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1. A partir de dicha figura, se pudo apreciar que la mayor frecuencia porcentual se obtuvo para el puntaje 7 en todos los casos. Los valores exhibidos por TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1 (para puntaje 7) resultaron 38,6, 33,7, 26,7 y 42,6%, respectivamente. Cabe destacar que todos los panes desarrollados evidenciaron frecuencia porcentual considerablemente elevada a puntaje 8, la cual se encontró entre 17,8 (TOM-1 y ORE-1) y 28,7% (TOM-0,5) ([Fig. 28](#)).

**Tabla 17.** Puntuación obtenida para los panes TOM-0,5, TOM-1, ORE-0,5 y ORE-1. Resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Pan	Aceptabilidad general
<b>TOM-0,5</b>	$6,85 \pm 1,19^a$
<b>TOM-1</b>	$6,51 \pm 1,45^a$
<b>ORE-0,5</b>	$6,60 \pm 1,35^a$
<b>ORE-1</b>	$6,67 \pm 1,15^a$



**Figura 28.** Frecuencia porcentual (%) de panes TOM-0,5 (■), TOM-1 (■), ORE-0,5 (■) y ORE-1 (■) correspondiente a cada puntaje de la escala hedónica.

#### 5.4.3. Digestión gastrointestinal *in vitro* de panes que incorporan EWPn-AE-PAM<sub>liof</sub>

##### 5.4.3.1. Liberación de AE

La [Tabla 18](#) muestra los valores de concentración de AE ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) presente en la fase micelar proveniente del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* de los panes TOM-1 y ORE-1. Como se mencionó en la [Sección 4.3.6.5](#), cabe remarcar que la concentración de AE correspondiente a la fase micelar se consideró como una medida de la cantidad de AE liberado en el TGI y disponible para su absorción intestinal.

Se puede observar que la fase micelar del digesto proveniente del pan TOM-1 presentó una concentración de TOM de  $57,1 \pm 6,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que en la fase micelar del digesto proveniente del pan ORE-1 la concentración de ORE no pudo ser detectada ([Tabla 18](#)). Se estimó que la cantidad de AE en la muestra inicial de pan sometida a la digestión gastrointestinal *in vitro* (0,5 g) fue aproximadamente 2 mg. En este caso, la retención de TOM en el digesto intestinal respecto a la cantidad inicial resultaría cercana a 30% (cálculos no mostrados) y correspondería a la fracción de TOM solubilizada en fase micelar, es decir, en condiciones fisiológicas óptimas para ser absorbida en el intestino ([340](#)). Según los resultados obtenidos para el pan ORE-1, no se detectó una fracción de ORE en la fase micelar tras la digestión gastrointestinal *in vitro*, sugiriendo que este AE permanecería retenido en la matriz digerida del pan y no estaría disponible para su absorción intestinal.

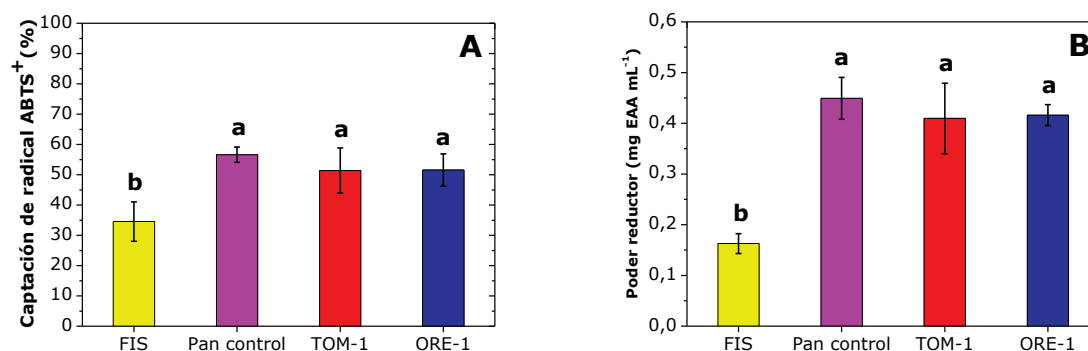
**Tabla 18.** Valores de concentración de AE ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) presente en la fase micelar proveniente del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* de los panes TOM-1 y ORE-1. Resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar.

Pan	Concentración de AE ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
<b>TOM-1</b>	$57,1 \pm 6,6$
<b>ORE-1</b>	$0,0 \pm 0,0$

#### 5.4.3.2. Actividad antioxidante

La Fig. 29 muestra la capacidad de captación de radical ABTS<sup>+</sup> ( $C_{\text{ABTS}^+}$ ) expresada en % (Fig. 29A) y el poder reductor (PR) expresado en mg EAA  $\text{mL}^{-1}$  de digesto (Fig. 29B), para el control de la solución FIS, el pan control y los panes desarrollados TOM-1 y ORE-1 luego de ser sometidos al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. Como se puede observar, no hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la  $C_{\text{ABTS}^+}$  que exhibieron los digestos provenientes del pan control y los panes desarrollados. El pan control presentó un valor de  $56,6 \pm 2,5\%$ , mientras que los panes TOM-1 y ORE-1 alcanzaron valores de  $51,4 \pm 7,5$  y  $51,6 \pm 5,3\%$ , respectivamente. En todos los casos, los panes exhibieron una  $C_{\text{ABTS}^+}$  significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el control de la solución FIS ( $34,6 \pm 6,5\%$ ).

Cuando el pan control y los panes desarrollados fueron evaluados según el PR, se observó nuevamente la ausencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los digestos provenientes del pan control y los panes desarrollados (Fig. 29B). En este caso, el pan control evidenció un valor de PR de  $0,45 \pm 0,04$  mg EAA  $\text{mL}^{-1}$ , mientras que los panes TOM-1 y ORE-1 presentaron valores de  $0,41 \pm 0,07$  y  $0,42 \pm 0,02$  mg EAA  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. Además, el pan control y los panes desarrollados exhibieron un PR significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el control de la solución FIS  $0,16 \pm 0,02$  mg EAA  $\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 29.** Capacidad de captación de radical ABTS<sup>+</sup> (%) (A) y poder reductor (mg de equivalentes de ácido ascórbico (EAA) mL<sup>-1</sup> de digesto) (B) del control de la solución FIS (■), pan control (■), pan TOM-1 (■) y pan ORE-1 (■) después de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Cada barra representa el promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Como ha sido discutido previamente, a pesar de la incorporación de AEs en las formulaciones de los panes TOM-1 y ORE-1, no se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la capacidad antioxidante de los digestos (evaluada mediante  $C_{ABTS^+}$  y PR) en comparación con el pan control. Este comportamiento podría deberse, en parte, a la limitada liberación de los AEs incorporados en la matriz alimentaria durante la digestión gastrointestinal *in vitro*. Tal como señalan Wang y col. (2023) (429), los compuestos fenólicos de los AEs pueden formar complejos estables con el almidón durante el procesamiento térmico, reduciendo su disponibilidad e interfiriendo así con su bioaccesibilidad y capacidad antioxidante.

En este contexto, aunque el pan TOM-1 evidenció una concentración detectable de TOM en la fase micelar (como se discutió previamente), esta cantidad no resultaría suficiente para generar un incremento significativo en la actividad antioxidante respecto del digesto proveniente del pan control, el cual naturalmente contiene compuestos antioxidantes entre los ingredientes de su formulación (*e.g.*, ácidos fenólicos, lignanos, antocianinas, etc.) (405). En el caso de ORE-1, la ausencia de ORE en la fase micelar sugiere una complejación más fuerte o una mayor retención, lo que explicaría la falta de efecto antioxidante por parte del digesto proveniente del pan ORE-1.

#### 5.4.3.3. Liberación de glucosa

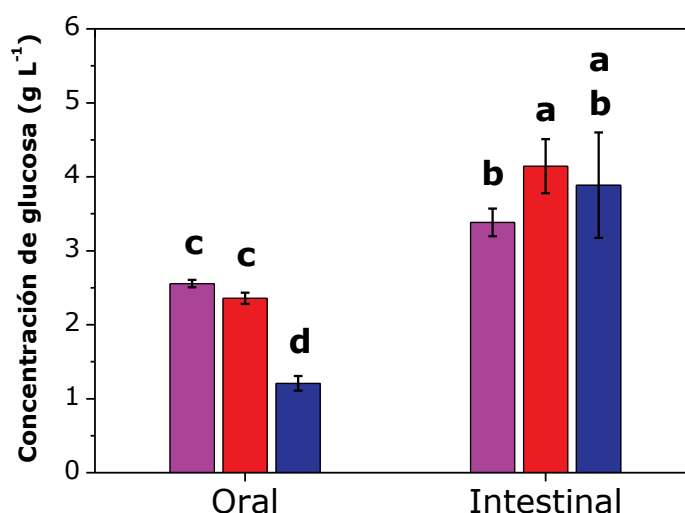
La Fig. 30 muestra la concentración de glucosa ( $C_{glucosa}$ ), expresada en g L<sup>-1</sup>, en los digestos del pan control y de los panes desarrollados TOM-1 y ORE-1 después de los procesos de digestión oral e intestinal *in vitro*. Como se puede observar, la liberación de glucosa en presencia del pan TOM-1 no evidenció diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) respecto al pan control en la fase oral de la digestión *in vitro*. Sin embargo, cuando el pan ORE-1 fue evaluado se observó una significativa disminución ( $p < 0,05$ ) de la glucosa liberada frente al pan control en la fase oral (Fig. 30). En los digestos derivados del proceso de digestión oral, el pan

control presentó un valor de  $C_{\text{glucosa}}$  de  $2,56 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ , mientras que los panes TOM-1 y ORE-1 exhibieron valores de  $2,36 \pm 0,08$  y  $1,21 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente.

Por otro lado, no hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los valores de  $C_{\text{glucosa}}$  de los panes TOM-1 y ORE-1 evaluados en la fase intestinal *in vitro*, siendo el valor de TOM-1 incluso significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en comparación con el valor del pan control (Fig. 30). En este caso, el pan control presentó una  $C_{\text{glucosa}}$  de  $3,38 \pm 0,19 \text{ g L}^{-1}$ , mientras que los panes TOM-1 y ORE-1 exhibieron valores de  $4,14 \pm 0,37$  y  $3,89 \pm 0,71 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente.

Como podría esperarse, la liberación de glucosa en la fase intestinal *in vitro* fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que la liberación de glucosa en la fase oral, en todos los casos (Fig. 30).

Los controles de las soluciones FSS y FIS no presentaron  $C_{\text{glucosa}}$  detectable (datos no mostrados).



**Figura 30.** Concentración de glucosa ( $C_{\text{glucosa}}$ ,  $\text{g L}^{-1}$ ) en los digestos del pan control (■), pan TOM-1 (■) y pan ORE-1 (■) después de la digestión oral e intestinal *in vitro*. Cada barra representa el promedio  $\pm$  desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Los resultados obtenidos en relación con la liberación de glucosa evidencian diferencias significativas entre las formulaciones evaluadas en las dos fases del proceso digestivo *in vitro* analizadas. En la fase oral, el pan ORE-1 mostró una liberación de glucosa significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en comparación con el pan control, sugiriendo una posible interferencia temprana en la actividad amilolítica. Esta reducción podría estar asociada a la interacción directa entre los compuestos fenólicos presentes en ORE y las enzimas digestivas, especialmente la  $\alpha$ -amilasa salival, cuya actividad puede verse inhibida por algunos tipos de compuestos fenólicos, como ha sido reportado en la literatura (222,430,431). No obstante,

en la fase intestinal esta diferencia no se sostuvo, es decir, tanto TOM-1 como ORE-1 mostraron valores de liberación de glucosa similares entre sí, e incluso superiores al pan control, siendo TOM-1 significativamente mayor ( $p < 0,05$ ). Esta inversión del efecto puede explicarse por una liberación diferida de azúcares a partir de regiones más internas de la matriz alimentaria, posiblemente debido a la gelatinización del almidón durante la digestión intestinal y a la complejación entre los compuestos fenólicos derivados de los AEs y el almidón, tal como plantean Wang y col. (2023) (429).

## 5.5. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 3

Este capítulo se centró en el desarrollo de panes que incorporaron AEs encapsulados, evaluando su estabilidad tecnológica, digestibilidad y potencial bioactividad tras la digestión gastrointestinal *in vitro*. A través de la incorporación de polvos EWPn-AE-PAM<sub>Iiof</sub> en matrices panificadas, se estudió la viabilidad de este tipo de formulaciones como vehículos alimentarios para compuestos con potencial efecto antidiabético. A continuación, se presentan las principales conclusiones obtenidas en relación con los objetivos específicos planteados:

**Evaluación fisicoquímica y sensorial de panes desarrollados:** Los panes formulados con el agregado de polvos EWPn-TOM-PAM<sub>Iiof</sub> y EWPn-ORE-PAM<sub>Iiof</sub> mostraron valores de humedad y actividad acuosa similares al pan control, indicando que la inclusión de los polvos no alteró significativamente la estructura general de la matriz. Asimismo, los análisis de color y textura revelaron diferencias perceptibles en función del tipo y concentración del AE encapsulado. Desde el punto de vista sensorial, las formulaciones desarrolladas presentaron buena aceptabilidad por parte de los consumidores, lo que sugiere que la encapsulación logró atenuar el impacto organoléptico de los AEs sin comprometer la calidad del pan blanco de molde.

**Digestibilidad gastrointestinal *in vitro* de los panes desarrollados:** Los resultados del modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* demostraron diferencias marcadas en la liberación de AEs entre las formulaciones. El pan TOM-1 presentó una liberación significativa del AE en la fase micelar ( $57,1 \pm 6,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), lo que representa aproximadamente un 30% de retención con respecto al contenido inicial, indicando una moderada disponibilidad para su absorción intestinal. Por el contrario, en el caso del pan ORE-1, no se detectó AE en la fase micelar tras la digestión, lo que sugiere una limitada biodisponibilidad intestinal de ORE en esta matriz específica.

**Efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la actividad biológica:** Respecto a la actividad antioxidante, no se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los panes desarrollados y el pan control luego de la digestión *in vitro* en términos de capacidad de captación de radicales ABTS<sup>+</sup> y de poder reductor. En cuanto a la liberación de glucosa, se observaron dos comportamientos según la fase analizada. En la fase oral, el pan ORE-1 redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) la concentración de glucosa liberada



respecto al control (1,21 vs. 2,56 g L<sup>-1</sup>), mientras que el pan TOM-1 no mostró diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) frente al pan control. Sin embargo, en la fase intestinal ambos panes desarrollados provocaron una mayor liberación de glucosa que el control, siendo la concentración de glucosa en el digesto intestinal del pan TOM-1 incluso significativamente más elevada ( $p < 0,05$ ).

Con base en los resultados obtenidos, puede concluirse que la incorporación de AEs encapsulados en matrices panificadas representa una estrategia viable para el desarrollo de alimentos funcionales con potencial efecto antidiabético. La incorporación de los sistemas EWPn-AE-PAM<sub>Iiof</sub> permitió obtener panes con propiedades tecnológicas adecuadas y buena aceptabilidad sensorial, sin comprometer la integridad de la matriz ni generar rechazo en los consumidores atribuible a los AEs. A nivel funcional, los sistemas presentaron un comportamiento diferenciado según el tipo de AE encapsulado. Mientras que el pan formulado con EWPn-TOM-PAM<sub>Iiof</sub> evidenció una liberación significativa del compuesto bioactivo en fase micelar, el pan con EWPn-ORE-PAM<sub>Iiof</sub> mostró una bioaccesibilidad más limitada. Pese a esto, ambos sistemas conservaron parcialmente su actividad antioxidante tras el proceso digestivo *in vitro*, y el pan ORE-1 presentó una disminución inicial en la liberación de glucosa durante la fase oral. Estos hallazgos ponen en evidencia la importancia del tipo de AE encapsulado, así como de su interacción con la matriz alimentaria, en la modulación de la liberación en el intestino y la actividad biológica de los compuestos vehiculizados. Finalmente, los resultados respaldan el uso de tecnologías de encapsulación como herramientas promisorias para el diseño de alimentos funcionales orientados al abordaje de enfermedades metabólicas como la DM2.

## **6. CONCLUSIONES**

La presente tesis abordó de manera integral el desarrollo de sistemas nanoestructurados a base de EWP y PAM para la encapsulación de AEs con potencial actividad antidiabética, y su posterior aplicación en una matriz alimentaria modelo: el pan de molde blanco. A partir de un enfoque secuencial y multidisciplinario, se logró cumplir con los siete objetivos específicos propuestos, generando conocimientos valiosos sobre la interacción entre técnicas de nanoencapsulación, matrices alimentarias y la funcionalidad bioactiva de compuestos derivados de plantas aromáticas y especias culinarias.

En primer lugar, se logró desarrollar y caracterizar nanocomplejos estables de EWP y AEs, evidenciando propiedades fisicoquímicas adecuadas (tamaño nanométrico, potencial  $\zeta$  negativo y alta eficiencia de encapsulación). Estos sistemas demostraron una actividad biológica significativa *in vitro*, especialmente frente a enzimas clave asociadas a la fisiopatología de la DM2, como  $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -glucosidasa, lipasa pancreática y LOX.

Posteriormente, la inclusión de un recubrimiento de PAM permitió obtener coacervados proteína-PS con propiedades coloidales estables y comportamiento funcional destacado. Estos sistemas no solo protegieron a los CBs frente a condiciones gastrointestinales *in vitro*, sino que también ejercieron un efecto positivo sobre la modulación de la expresión génica de los transportadores de glucosa SGLT1 y GLUT2 en células Caco-2, indicando un potencial mecanismo molecular relacionado con el efecto antidiabético.

Finalmente, se incorporaron polvos de coacervados liofilizados en una matriz panificada. Los panes obtenidos mantuvieron propiedades fisicoquímicas y sensoriales comparables al pan control, mostrando buena aceptación por parte de los consumidores. A nivel funcional, se evidenció una liberación diferencial de los AEs según el tipo encapsulado, así como una conservación parcial de la actividad antioxidante tras la digestión *in vitro*. Además, el pan formulado con ORE mostró una reducción significativa de la liberación de glucosa en la fase oral, lo que representa un hallazgo relevante desde el punto de vista del control glucémico postprandial.

De manera global, los resultados de esta tesis confirman que la encapsulación de CBs derivados de plantas aromáticas y especias culinarias mediante sistemas proteína-PS constituye una estrategia eficaz para preservar y dirigir su actividad funcional. Asimismo, se valida el uso de matrices panificadas como vehículos alimentarios adecuados, capaces de vehiculizar compuestos con potencial beneficio en la prevención o control de enfermedades metabólicas como la DM2. Este trabajo de tesis sienta las bases para futuras investigaciones orientadas a optimizar la formulación, estudiar la biodisponibilidad en modelos *in vivo* y evaluar el impacto clínico de alimentos potencialmente funcionales diseñados desde una perspectiva nutracéutica avanzada.

A partir de los hallazgos obtenidos, se abren diversas líneas de investigación orientadas a profundizar y ampliar el conocimiento generado. En primer lugar, sería pertinente avanzar hacia estudios *in vivo* que permitan validar la biodisponibilidad y efectividad fisiológica de los sistemas desarrollados en modelos animales, especialmente en relación con la modulación glucémica postprandial y la expresión génica

intestinal. Asimismo, la exploración de métodos de secado más económicos y variantes en las condiciones de formulación podría optimizar aún más la protección y liberación dirigida de los CBs. También resultaría valioso estudiar la incorporación de estos sistemas en otras matrices alimentarias, así como su comportamiento en condiciones reales de procesamiento y almacenamiento industrial. Finalmente, este enfoque podría integrarse a estrategias de salud pública en el diseño de alimentos funcionales accesibles para poblaciones en riesgo metabólico, contribuyendo así a la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles desde un enfoque multidisciplinario que articule nutrición, ciencia de los alimentos y tecnología nutracéutica.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

1. Bungau SG, Vesa CM, Bustea C, Purza AL, Tit DM, Brisc MC, y col. Antioxidant and hypoglycemic potential of essential oils in diabetes mellitus and its complications. *Int J Mol Sci.* 2023;24(22):16501.
2. Papoutsis K, Zhang J, Bowyer MC, Brunton N, Gibney ER, Lyng J. Fruit, vegetables, and mushrooms for the preparation of extracts with  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition properties: A review. *Food Chem.* 2021;338:128119.
3. Yaribeygi H, Sathyapalan T, Atkin SL, Sahebkar A. Molecular mechanisms linking oxidative stress and diabetes mellitus. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:1-13.
4. Galicia Garcia U, Benito Vicente A, Jebari S, Larrea Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, y col. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):6275.
5. Zhang P, Li T, Wu X, Nice EC, Huang C, Zhang Y. Oxidative stress and diabetes: antioxidative strategies. *Front Med.* 2020;14(5):583-600.
6. Rachdaoui N. Insulin: The friend and the foe in the development of type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5):1770.
7. Sampath Kumar A, Maiya AG, Shastry BA, Vaishali K, Ravishankar N, Hazari A, y col. Exercise and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Ann Phys Rehabil Med.* 2019;62(2):98-103.
8. Kulkarni A, Thool AR, Daigavane S. Understanding the clinical relationship between diabetic retinopathy, nephropathy, and neuropathy: A comprehensive review. *Cureus.* 2024;16(3):56674.
9. Bhatt HB, Smith RJ. Fatty liver disease in diabetes mellitus. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2015;4(2):101-8.
10. Hassan A, Sharma Kandel R, Mishra R, Gautam J, Alaref A, Jahan N. Diabetes mellitus and Parkinson's disease: Shared pathophysiological links and possible therapeutic implications. *Cureus.* 2020;12(8):9853.
11. Rojas M, Chávez Castillo M, Bautista J, Ortega Á, Nava M, Salazar J, y col. Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus: Pathophysiologic and pharmacotherapeutics links. *World J Diabetes.* 2021;12(6):745-66.
12. Réus GZ, dos Santos MAB, Strassi AP, Abelaira HM, Ceretta LB, Quevedo J. Pathophysiological mechanisms involved in the relationship between diabetes and major depressive disorder. *Life Sci.* 2017;183:78-82.
13. Artasensi A, Pedretti A, Vistoli G, Fumagalli L. Type 2 diabetes mellitus: A review of multi-target drugs. *Molecules.* 2020;25(8):1987.
14. Chaudhury A, Duvoor C, Reddy Dendi VS, Kraleti S, Chada A, Ravilla R, y col. Clinical review of antidiabetic drugs: Implications for type 2 diabetes mellitus management. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8(6):1-12.
15. Chávez Delgado EL, Jacobo Velázquez DA. Essential oils: Recent advances on their dual role as food preservatives and nutraceuticals against the metabolic syndrome. *Foods.* 2023;12(5):1-27.
16. Zhang Q, Zhou Y, Yue W, Qin W, Dong H, Vasanthan T. Nanostructures of protein-polysaccharide complexes or conjugates for encapsulation of bioactive compounds. *Trends Food Sci Technol.* 2021;109:169-96.
17. Soumya NPP, Mini S, Sivan SK, Mondal S. Bioactive compounds in functional food and their role as therapeutics. *Bioact Compd Health Dis.* 2021;4(3):24-39.
18. Gonçalves A, Estevinho BN, Rocha F. Methodologies for simulation of gastrointestinal digestion of different controlled delivery systems and further uptake of encapsulated bioactive compounds. *Trends Food Sci Technol.* 2021;114:510-20.
19. Dixit V, Joseph Kamal SW, Bajrang Chole P, Dayal D, Chaubey KK, Pal AK, y col. Functional foods: Exploring the health benefits of bioactive compounds from plant and animal sources. *J Food Qual.* 2023;2023:5546753.

20. Katouzian I, Jafari SM. Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. *Trends Food Sci Technol*. 2016;53:34-48.
21. Visentini FF, Perez AA, Santiago LG. Self-assembled nanoparticles from heat treated ovalbumin as nanocarriers for polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocoll*. 2019;93:242-52.
22. Rodríguez J, Martín MJ, Ruiz MA, Clares B. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. *Food Research International*. 2016;83:41-59.
23. Prisacaru AE. Effect of antioxidants on polyunsaturated fatty acids - Review. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 2016;15(2):121-9.
24. Bhandari D, Rafiq S, Gat Y, Gat P, Waghmare R, Kumar V. A review on bioactive peptides: Physiological functions, bioavailability and safety. *Int J Pept Res Ther*. 2020;26(1):139-50.
25. Kumar A, Nirmal P, Kumar M, Jose A, Tomer V, Oz E, y col. Major phytochemicals: Recent advances in health benefits and extraction method. *Molecules*. 2023;28(2):887.
26. Zhang Y, Cai P, Cheng G, Zhang Y. A brief review of phenolic compounds identified from plants: Their extraction, analysis, and biological activity. *Nat Prod Commun*. 2022;17(1):1-14.
27. Liu W, Wang J, McClements DJ, Zou L. Encapsulation of  $\beta$ -carotene-loaded oil droplets in caseinate/algininate microparticles: Enhancement of carotenoid stability and bioaccessibility. *J Funct Foods*. 2018;40:527-35.
28. Garavand F, Jalai-Jivan M, Assadpour E, Jafari SM. Encapsulation of phenolic compounds within nano/microemulsion systems: A review. *Food Chem*. 2021;364:130376.
29. Jugreet BS, Suroowan S, Rengasamy RRR, Mahomoodally MF. Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. *Trends Food Sci Technol*. 2020;101:89-105.
30. Castro Rosas J, Ferreira Grosso CR, Gómez Aldapa CA, Rangel Vargas E, Rodríguez Marín ML, Guzmán Ortiz FA, y col. Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food - A review. *Food Research International*. 2017;1-13.
31. Joye IJ, McClements DJ. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2014;19(5):417-27.
32. Yadav TP, Yadav RM, Singh DP. Mechanical milling: A top down approach for the synthesis of nanomaterials and nanocomposites. *J Nanosci Nanotechnol*. 2012;2(3):22-48.
33. Joye IJ, McClements DJ. Production of nanoparticles by anti-solvent precipitation for use in food systems. *Trends Food Sci Technol*. 2013;34(2):109-23.
34. Timilsena YP, Akanbi TO, Khalid N, Adhikari B, Barrow CJ. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *Int J Biol Macromol*. 2019;121:1276-86.
35. Plati F, Paraskevopoulou A. Micro- and nano-encapsulation as tools for essential oils advantages' Exploitation in food applications: the case of oregano essential oil. *Food Bioproc Tech*. 2022;15(5):949-77.
36. Darniadi S, Ho P, Murray BS. Comparison of blueberry powder produced via foam-mat freeze-drying versus spray-drying: evaluation of foam and powder properties. *J Sci Food Agric*. 2018;98(5):2002-10.
37. Rezvankhah A, Emam-Djomeh Z, Askari G. Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review. *Dry Technol*. 2019;38:235-58.
38. Jamroz M, Kudłacik Kramarczyk S, Drabczyk A, Krzan M. Advanced drug carriers: A review of selected protein, polysaccharide, and lipid drug delivery platforms. *Int J Mol Sci*. 2024;25(2):786.
39. Shin GH, Kim JT, Park HJ. Recent developments in nanoformulations of lipophilic functional foods. *Trends Food Sci Technol*. 2015;46(1):144-57.
40. Ezhilarasi PN, Karthik P, Chhanwal N, Anandharamakrishnan C. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: A review. *Food Bioprocess Technol*. 2013;6:628-47.

41. Cheng H, Chen W, Jiang J, Khan MA, Wusigale, Liang L. A comprehensive review of protein-based carriers with simple structures for the co-encapsulation of bioactive agents. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2023;22(3):2017-42.
42. Dumitriu OB, Dima S. Biopolymer-based techniques for encapsulation of phytochemicals bioactive in food and drug. *Materiale Plastice.* 2016;53(1):126-9.
43. Matalanis A, Jones OG, McClements DJ. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocoll.* 2011;25(8):1865-80.
44. Devi N, Sarmah M, Khatun B, Maji TK. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide-protein complex coacervates. *Adv Colloid Interface Sci.* 2017;239:136-45.
45. Bellmann S, Carlander D, Fasano A, Momcilovic D, Scimeca JA, Waldman WJ, y col. Mammalian gastrointestinal tract parameters modulating the integrity, surface properties, and absorption of food-relevant nanomaterials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2015;7(5):609-22.
46. Dima C, Assadpour E, Dima S, Jafari SM. Bioavailability of nutraceuticals: Role of the food matrix, processing conditions, the gastrointestinal tract, and nanodelivery systems. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2020;19(3):954-94.
47. Zheng Y, Luo S, Xu M, He Q, Xie J, Wu J, y col. Transepithelial transport of nanoparticles in oral drug delivery: From the perspective of surface and holistic property modulation. *Acta Pharm Sin B.* 2024;14(9):3876-900.
48. McClements DJ, Li F, Xiao H. The nutraceutical bioavailability classification scheme: classifying nutraceuticals according to factors limiting their oral bioavailability. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2015;6:299-327.
49. Felisbino K, Granzotti JG, Bello-Santos L, Guiloski IC. Nutrigenomics in regulating the expression of genes related to type 2 diabetes mellitus. *Front Physiol.* 2021;12:699220.
50. Kouznetsova VL, Hauptschein M, Tsigelny IF. Glucose and lipid transporters roles in type 2 diabetes. *Integr Obes Diabetes.* 2017;3(5):1-6.
51. Sivadas S, Castelino RL, Ajila V, Jain Y. Nutrigenomics and diabetes mellitus. *Rom J Diabetes Nutr Metab Dis.* 2024;31(2):214-20.
52. Müller M, Kersten S. Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat Rev Genet.* 2003;4:315-22.
53. Lam HN, Lin SP, Nguyen DHN, Chen CM, Su CT, Fang TC, y col. Integrative roles of functional foods, microbiotics, nutrigenetics, and nutrigenomics in managing type 2 diabetes and obesity. *Nutrients.* 2025;17(4):608.
54. Stanojevic LP, Marjanovic-Balaban ZR, Kalaba VD, Stanojevic JS, Cvetkovic DJ. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of chamomile flowers essential oil (*Matricaria chamomilla* L.). *J Essential Oil Bearing Plants.* 2016;19(8):2017-28.
55. Mergulhão NLON, Bulhões LCG, Silva VC, Duarte IFB, Basilio-Júnior ID, Freitas JD, y col. Insights from *Syzygium aromaticum* essential oil: Encapsulation, characterization, and antioxidant activity. *Pharmaceuticals.* 2024;17(5):599.
56. Bhavaniramy S, Vishnupriya S, Al-Aboody MS, Vijayakumar R, Baskaran D. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology.* 2019;2:49-55.
57. Gandhi SG, Mahajan V, Bedi YS. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. *Planta.* 2015;241(2):303-17.
58. Falleh H, Ben Jemaa M, Saada M, Ksouri R. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. *Food Chem.* 2020;330:127268.
59. Zinno P, Guantario B, Lombardi G, Ranaldi G, Finamore A, Allegra S, y col. Chemical composition and biological activities of essential oils from *Origanum vulgare* genotypes belonging to the carvacrol and thymol chemotypes. *Plants.* 2023;12:1-24.



60. Aazza S, Lyoussi B, Megías C, Cortés Giraldo I, Vioque J, Cristina Figueiredo A, y col. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of moroccan commercial essential oils. *Nat Prod Commun.* 2014;9(4):587-94.
61. Meenu M, Padhan B, Patel M, Patel R, Xu B. Antibacterial activity of essential oils from different parts of plants against *Salmonella* and *Listeria* spp. *Food Chem.* 2023;404:134723.
62. Perricone M, Arace E, Corbo MR, Sinigaglia M, Bevilacqua A. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Front Microbiol.* 2015;6(76):1-7.
63. Sharopov F, Braun MS, Gulmurodov I, Khalifaev D, Isupov S, Wink M. Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils of selected aromatic plants from Tajikistan. *Foods.* 2015;4(4):645-53.
64. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils – Present status and future perspectives. *Medicines.* 2017;4(58):1-21.
65. Debonne E, Van Bockstaele F, Samapundo S, Eeckhout M, Devlieghere F. The use of essential oils as natural antifungal preservatives in bread products. *Journal of Essential Oil Research.* 2018;30(5):309-18.
66. Bagheri L, Khodaei N, Salmieri S, Karboune S, Lacroix M. Correlation between chemical composition and antimicrobial properties of essential oils against most common food pathogens and spoilers: *In-vitro* efficacy and predictive modelling. *Microb Pathog.* 2020;147:104212.
67. De Clerck C, Maso SD, Parisi O, Dresen F, Zhiri A, Haissam Jijakli M. Screening of antifungal and antibacterial activity of 90 commercial essential oils against 10 pathogens of agronomical importance. *Foods.* 2020;9(10):1418.
68. Hou T, Sana SS, Li H, Xing Y, Nanda A, Netala VR, y col. Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. *Food Biosci.* 2022;47:101716.
69. Pérez Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigueral S. Biological and non-biological antioxidant activity of some essential oils. *J Agric Food Chem.* 2016;64(23):4716-24.
70. Kasrati A, Alaoui Jamali C, Bekkouché K, Wohlmuth H, Leach D, Abbad A. Comparative evaluation of antioxidant and insecticidal properties of essential oils from five Moroccan aromatic herbs. *J Food Sci Technol.* 2015;52(4):2312-9.
71. Oboh G, Olasehinde TA, Ademosun AO. Inhibition of enzymes linked to type-2 diabetes and hypertension by essential oils from peels of orange and lemon. *Int J Food Prop.* 2017;20(1):S586-94.
72. Radünz M, Mota Camargo T, dos Santos Hackbart HC, Inchauspe Correa Alves P, Radünz AL, Avila Gandra E, y col. Chemical composition and *in vitro* antioxidant and antihyperglycemic activities of clove, thyme, oregano, and sweet orange essential oils. *LWT.* 2021;138:110632.
73. Belhadj S, Hentati O, Hammami M, Ben Hadj A, Boudawara T, Dammak M, y col. Metabolic impairments and tissue disorders in alloxan-induced diabetic rats are alleviated by *Salvia officinalis* L. essential oil. *Biomed Pharmacother.* 2018;108:985-95.
74. Zhao Q, Zhu L, Wang S, Gao Y, Jin F. Molecular mechanism of the anti-inflammatory effects of plant essential oils: A systematic review. *J Ethnopharmacol.* 2023;301:115829.
75. Amorim JL, Simas DLR, Pinheiro MMG, Moreno DSA, Alviano CS, Da Silva AJR, y col. Anti-inflammatory properties and chemical characterization of the essential oils of four *Citrus* species. *PLoS One.* 2016;11(4):1-18.
76. Benomari FZ, Sarazin M, Chaib D, Pichette A, Boumghar H, Boumghar Y, y col. Chemical variability and chemotype concept of essential oils from algerian wild plants. *Molecules.* 2023;28(11):4439.
77. Moghaddam M, Miran SNK, Pirbalouti AG, Mehdizadeh L, Ghaderi Y. Variation in essential oil composition and antioxidant activity of cumin (*Cuminum cyminum* L.) fruits during stages of maturity. *Ind Crops Prod.* 2015;70:163-9.

78. Varghese SA, Siengchin S, Parameswaranpillai J. Essential oils as antimicrobial agents in biopolymer-based food packaging - A comprehensive review. *Food Biosci.* 2020;38:100785.
79. Shiferaw Y, Kassahun A, Tedla A, Feleke G, Abebe AA. Investigation of essential oil composition variation with age of *Eucalyptus globulus* growing in Ethiopia. *Nat Prod Chem Res.* 2019;7(2):360.
80. Laftouhi A, Slimani M, Elrherabi A, Bouhrim M, Mahraz MA, Idrissi AM, y col. Effect of temperature and water stress on the antioxidant and antidiabetic activities of *Thymus vulgaris* essential oil. *Tropical Journal of Natural Product Research.* 2024;8(1):5785-93.
81. Mechergui K, Jaouadi W, Coelho JP, Khouja ML. Effect of harvest year on production, chemical composition and antioxidant activities of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* subsp *glandulosum* (Desf.) Ietswaart) growing in North Africa. *Ind Crops Prod.* 2016;90:32-7.
82. Ni ZJ, Wang X, Shen Y, Thakur K, Han J, Zhang JG, y col. Recent updates on the chemistry, bioactivities, mode of action, and industrial applications of plant essential oils. *Trends Food Sci Technol.* 2021;110:78-89.
83. Sarmoum R, Haid S, Biche M, Djazouli Z, Zebib B, Merah O. Effect of salinity and water stress on the essential oil components of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agronomy.* 2019;9(5):214.
84. Kholiya S, Punetha A, Cha uhan A, KT V, Kumar D, Upadhyay RK, y col. Essential oil yield and composition of *Ocimum basilicum* L. at different phenological stages, plant density and post-harvest drying methods. *S Afr J Bot.* 2022;151:919-25.
85. Majid I, Khan S, Aladel A, Dar AH, Adnan M, Khan MI, y col. Recent insights into green extraction techniques as efficient methods for the extraction of bioactive components and essential oils from foods. *CYTA J Food.* 2023;21(1):101-14.
86. Kiralan M, Özkan G, Bayrak A, Ramadan MF. Physicochemical properties and stability of black cummin (*Nigella sativa*) seed oil as affected by different extraction methods. *Ind Crops Prod.* 2014;57:52-8.
87. Tavakolpour Y, Moosavi-Nasab M, Niakousari M, Haghighi-Manesh S, Hashemi SMB, Mousavi Khaneghah A. Comparison of four extraction methods for essential oil from *Thymus daenensis* Subsp. *Lancifolius* and chemical analysis of extracted essential oil. *J Food Process Preserv.* 2017;41(4):13046.
88. Al-Rubaye AF, Hameed IH, Kadhim MJ. A review: uses of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique for analysis of bioactive natural compounds of some plants. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research.* 2017;9(1):81-5.
89. Amorati R, Foti MC, Valgimigli L. Antioxidant activity of essential oils. *J Agric Food Chem.* 2013;61(46):10835-47.
90. Siahbalaie R, Kavoosi G. Chemical composition and evaluation of anti diabetic activity of oil extracts from *Oliveria decumbens*, *Thymus kotschyanus*, *Trachyspermum ammi* and *Zataria multiflora*. *Journal of Food Measurement and Characterization.* 2021;15(1):276-87.
91. Wirtu YD. A review of environmental and health effects of synthetic cosmetics. *Front Environ Sci.* 2024;12:1402893.
92. Fraj A, Jaâfar F, Marti M, Coderch L, Ladhari N. A comparative study of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil-based polycaprolactone nanocapsules/ microspheres: Preparation, physicochemical characterization, and storage stability. *Ind Crops Prod.* 2019;140:111669.
93. Christaki S, Moschakis T, Kyriakoudi A, Biliaderis CG, Mourtzinis I. Recent advances in plant essential oils and extracts: Delivery systems and potential uses as preservatives and antioxidants in cheese. *Trends Food Sci Technol.* 2021;116:264-78.
94. Reis DR, Ambrosi A, Luccio M Di. Encapsulated essential oils: A perspective in food preservation. *Future Foods.* 2022;5:100126.

95. Ghaderi Ghahfarokhi M, Barzegar M, Sahari MA, Ahmadi Gavlighi H, Gardini F. Chitosan-cinnamon essential oil nano-formulation: Application as a novel additive for controlled release and shelf life extension of beef patties. *Int J Biol Macromol*. 2017;102:19-28.
96. Prakash B, Kujur A, Yadav A, Kumar A, Singh PP, Dubey NK. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food Control*. 2018;89:1-11.
97. Cui H, Li W, Li C, Vittayapadung S, Lin L. Liposome containing cinnamon oil with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Biofouling*. 2016;32(1):215-25.
98. Sampaio CI, Bourbon AI, Gonçalves C, Pastrana LM, Dias AM, Cerqueira MA. Low energy nanoemulsions as carriers of thyme and lemon balm essential oils. *LWT*. 2022;154:112748.
99. Agnish S, Sharma AD, Kaur I. Nanoemulsions (O/W) containing *Cymbopogon pendulus* essential oil: development, characterization, stability study, and evaluation of *in vitro* anti-bacterial, anti-inflammatory, anti-diabetic activities. *Bionanoscience*. 2022;12(2):540-54.
100. Nasser M, Golmohammadzadeh S, Arouiee H, Jaafari MR, Neamati H. Antifungal activity of *Zataria multiflora* essential oil-loaded solid lipid nanoparticles *in-vitro* condition. *Iran J Basic Med Sci*. 2016;19(11):1231-7.
101. Mohammadi A, Hashemi M, Hosseini SM. Chitosan nanoparticles loaded with *Cinnamomum zeylanicum* essential oil enhance the shelf life of cucumber during cold storage. *Postharvest Biol Technol*. 2015;110:203-13.
102. Benavides S, Cortés P, Parada J, Franco W. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chem*. 2016;204:77-83.
103. Silva LS, Mar JM, Azevedo SG, Rabelo MS, Bezerra JA, Campelo PH, y col. Encapsulation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* essential oils in gelatin nanoparticles: A possible sustainable control tool of *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. *J Sci Food Agric*. 2019;99(2):685-95.
104. Hauzoukim SS, Mohanty B. Functionality of protein-based edible coating - Review. *J Entomol Zool Stud*. 2020;8(4):1432-40.
105. Mihalca V, Kerezsi AD, Weber A, Gruber-traub C, Schmucker J, Vodnar DC, y col. Protein-based films and coatings for food industry applications. *Polymers (Basel)*. 2021;13(5):769.
106. Bilenler T, Gokbulut I, Sislioglu K, Karabulut I. Antioxidant and antimicrobial properties of thyme essential oil encapsulated in zein particles. *Flavour Fragr J*. 2015;30(5):392-8.
107. Liang D, Feng B, Li N, Su L, Wang Z, Kong F, y col. Preparation, characterization, and biological activity of *Cinnamomum cassia* essential oil nano-emulsion. *Ultrason Sonochem*. 2022;86:106009.
108. Luo X, Sedman J, Ismail AA. Microencapsulation of oregano (*Origanum vulgare* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.) essential oils in  $\beta$ -lactoglobulin. *SDRP Journal of Food Science & Technology*. 2019;4(9):970-85.
109. Maryam K, Shakeri S, Kiani K. Preparation and *in vitro* investigation of antigastric cancer activities of carvacrol-loaded human serum albumin nanoparticles. *IET Nanobiotechnol*. 2015;9(5):294-9.
110. Sekar G, Sugumar S, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Multiple spectroscopic studies of the structural conformational changes of human serum albumin - Essential oil based nanoemulsions conjugates. *J Lumin*. 2015;161:187-97.
111. Roufegarinejad L, Jahanban-Esfahlan A, Sajed-Amin S, Panahi-Azar V, Tabibiazar M. Molecular interactions of thymol with bovine serum albumin: Spectroscopic and molecular docking studies. *J Mol Recognit*. 2018;31(7):2704.
112. Huang F, Pan F, Wang L, Xiao Z, He J, Yan M, y col. The interaction between citronellol and bovine serum albumin: Spectroscopic, computational and thermal imaging studies. *J Mol Struct*. 2022;1251:131986.
113. Croguennec T, Renault A, Beauvils S, Dubois JJ, Pezennec S. Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. *J Colloid Interface Sci*. 2007;315:627-36.

114. Giosafatto CVL, Rigby NM, Wellner N, Ridout M, Husband F, Mackie AR. Microbial transglutaminase-mediated modification of ovalbumin. *Food Hydrocoll.* 2012;26(1):261-7.
115. Matsudomi N, Takahashi H, Miyata T. Some structural properties of ovalbumin heated at 80°C in the dry state. *Food Research International.* 2001;34:229-35.
116. Jones OG, Decker EA, McClements DJ. Formation of biopolymer particles by thermal treatment of  $\beta$ -lactoglobulin-pectin complexes. *Food Hydrocoll.* 2009;23(5):1312-21.
117. Weijers M, Barneveld PA, Cohen Stuart MA, Visschers RW. Heat-induced denaturation and aggregation of ovalbumin at neutral pH described by irreversible first-order kinetics. *Protein Science.* 2003;12(12):2693-703.
118. Nyemb K, Guérin-Dubiard C, Dupont D, Jardin J, Rutherford SM, Nau F. The extent of ovalbumin *in vitro* digestion and the nature of generated peptides are modulated by the morphology of protein aggregates. *Food Chem.* 2014;157:429-38.
119. Sponton OE, Perez AA, Carrara CR, Santiago LG. Impact of environment conditions on physicochemical characteristics of ovalbumin heat-induced nanoparticles and on their ability to bind PUFAs. *Food Hydrocoll.* 2015;48:165-73.
120. Sponton OE, Perez AA, Carrara CR, Santiago LG. Linoleic acid binding properties of ovalbumin nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015;128:219-26.
121. Abeyrathne EDNS, Lee HY, Ahn DU. Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents - A review. *Poult Sci.* 2013;92(12):3292-9.
122. Dong X, Zhang YQ. An insight on egg white: From most common functional food to biomaterial application. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2021;109(7):1045-58.
123. Arzeni C, Pérez OE, LeBlanc JG, Pilosof AMR. Egg albumin-folic acid nanocomplexes: Performance as a functional ingredient and biological activity. *J Funct Foods.* 2015;18:379-86.
124. Sponton OE, Perez AA, Ramel J V., Santiago LG. Protein nanovehicles produced from egg white. Part 1: Effect of pH and heat treatment time on particle size and binding capacity. *Food Hydrocoll.* 2017;73:67-73.
125. Chang C, Meikle TG, Su Y, Wang X, Dekiwadia C, Drummond CJ, y col. Encapsulation in egg white protein nanoparticles protects anti-oxidant activity of curcumin. *Food Chem.* 2019;280:65-72.
126. Kavas G, Kavas N. Use of egg white protein powder based films fortified with sage and lemon balm essential oils in the storage of lor cheese. *Mljekarstvo.* 2016;66(2):99-111.
127. Kavas N, Kavas G. Physical-chemical and antimicrobial properties of egg white protein powder films incorporated with orange essential oil on kashar cheese. *Food Science and Technology.* 2016;36(4):672-8.
128. Kavas N, Kavas G. Use of egg white protein powder based films fortified with basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oils in the storage of çökelek cheese. *J Sci Res Rep.* 2017;15(5):1-10.
129. Kavas N, Kavas G. Use of turmeric (*Curcuma longa* L.) essential oil added to an egg white protein powder-based film in the storage of çökelek cheese. *Journal of Food Chemistry and Nanotechnology.* 2017;3(3):105-10.
130. Rao SQ, Gao XR, Liu H, Wang ZR, Yang ZQ. Contribution of phosphorylation modification to stability and antibacterial activity of egg white protein nanogels loaded with cinnamon bark essential oil. *Gels.* 2025;11(1):12.
131. Hall JB, Dobrovolskaia MA, Patri AK, McNeil SE. Characterization of nanoparticles for therapeutics. *Nanomedicine.* 2007;2(6):789-803.
132. Ma Y, Zhao Y, Jiang Y, Chi Y. Effect of dry heating on the aggregation behaviour and aggregate morphologies of ovalbumin. *Food Chem.* 2019;285:296-304.
133. Figueiredo M, Sárkány Z, Rocha F, Martins PM. Challenges and advances in the encapsulation of bioactive ingredients using whey proteins. *Foods.* 2025;14(4):691.

134. McClements DJ. Designing biopolymer microgels to encapsulate, protect and deliver bioactive components: Physicochemical aspects. *Adv Colloid Interface Sci.* 2017;240:31-59.
135. Jones OG, McClements DJ. Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein-polysaccharide complexes. *Adv Colloid Interface Sci.* 2011;167(1-2):49-62.
136. McClements DJ. Theoretical prediction of emulsion color. *Adv Colloid Interface Sci.* 2002;97:63-89.
137. Kotha RR, Tareq FS, Yildiz E, Luthria DL. Oxidative stress and antioxidants - A critical review on *in vitro* antioxidant assays. *Antioxidants.* 2022;11(12):2388.
138. Haida Z, Hakiman M. A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food Sci Nutr.* 2019;7(5):1555-63.
139. Rohn S, Rawel HM, Kroll J. Antioxidant activity of protein-bound quercetin. *J Agric Food Chem.* 2004;52(15):4725-9.
140. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *Int J Mol Sci.* 2021;22:3380.
141. Benkhaira N, Koraichi SI, Fikri-Benbrahim K. *In vitro* methods to study antioxidant and some biological activities of essential oils: A review. *Biointerface Res Appl Chem.* 2022;12(3):3332-47.
142. Gonçalves da Rosa C, Zapelini de Melo AP, Sganzerla WG, Machado MH, Nunes MR, Vinicius de Oliveira Brisola Maciel M, y col. Application *in situ* of zein nanocapsules loaded with *Origanum vulgare* Linneus and *Thymus vulgaris* as a preservative in bread. *Food Hydrocoll.* 2020;99:105339.
143. Das S, Gazdag Z, Szenté L, Meggyes M, Horváth G, Lemli B, y col. Antioxidant and antimicrobial properties of randomly methylated  $\beta$  cyclodextrin – captured essential oils. *Food Chem.* 2019;278:305-13.
144. Karagozlu M, Ocak B, Özdestan-Ocak Ö. Effect of tannic acid concentration on the physicochemical, thermal, and antioxidant properties of gelatin/gum arabic-walled microcapsules containing *Origanum onites* L. essential oil. *Food Bioproc Tech.* 2021;14(7):1231-43.
145. Kokina M, Salevic A, Kaluševic A, Levic S, Pantic M, Dejan Pljevljakušić, y col. Characterization, antioxidant and antibacterial activity of essential oils and their encapsulation into biodegradable material followed by freeze drying. *Food Technol Biotechnol.* 2019;57(2):282-9.
146. Beigmohammadi N, Peighambaroust SH, Mohammad Amini A, Alirezalu K. Enhancing encapsulation efficiency of chavir essential oil via enzymatic hydrolysis and ultrasonication of whey protein concentrate-maltodextrin. *Foods.* 2024;13(9):1407.
147. Xiao F, Xu T, Lu B, Liu R. Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Front.* 2020;1(1):60-9.
148. Damasceno ETS, Almeida RR, de Carvalho SYB, Vieira SS, Mano V, Guimarães LG de L. Nano-encapsulation of *Lippia organoides* Kunth. essential oil by chitosan-caffeic acid nanogel. *Quim Nova.* 2020;43(1):16-23.
149. Nwachukwu ID, Sarteshnizi RA, Udenigwe CC, Aluko RE. A concise review of current *in vitro* chemical and cell-based antioxidant assay methods. *Molecules.* 2021;26(16):4865.
150. Himed L, Merniz S, Monteagudo Olivan R, Barkat M, Coronas J. Antioxidant activity of the essential oil of *Citrus limon* before and after its encapsulation in amorphous SiO<sub>2</sub>. *Sci Afr.* 2019;6:181.
151. Sousa Borges R, Keita H, Sánchez Ortiz BL, dos Santos Sampaio TI, Ferreira IM, Silva Lima E, y col. Anti-inflammatory activity of nanoemulsions of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.: *In vitro* and in zebrafish studies. *Inflammopharmacology.* 2018;26(4):1057-80.
152. Obeidnejad E, Kavooosi G, Saharkhiz MJ, Niakousari M. Functional properties and anti-hyperglycaemia capacity of Satureja essential oil: stabilisation of essential oil in gelatin and physico-chemical properties characterisation. *Int J Food Sci Technol.* 2024;59(4):2570-80.

153. Mostafa DM, Kassem AA, Asfour MH, Al Okbi SY, Mohamed DA, Hamed TES. Transdermal cumin essential oil nanoemulsions with potent antioxidant and hepatoprotective activities: *In-vitro* and *in-vivo* evaluation. *J Mol Liq*. 2015;212:6-15.
154. Rusu AG, Niță LE, Roșca I, Croitoriu A, Ghilan A, Mititelu-Tarțau L, y col. Alginate-based hydrogels enriched with lavender essential oil: Evaluation of physicochemical properties, antimicrobial activity, and *in vivo* biocompatibility. *Pharmaceutics*. 2023;15(11):2608.
155. Vhora N, Naskar U, Hiray A, Kate AS, Jain A. Recent advances in *in-vitro* assays for type 2 diabetes mellitus: An overview. *Review of Diabetic Studies*. 2020;16(1):13-23.
156. Sellami M, Louati H, Kamoun J, Kchaou A, Damak M, Gargouri Y. Inhibition of pancreatic lipase and amylase by extracts of different spices and plants. *Int J Food Sci Nutr*. 2016;68(3):313-20.
157. Zhu R, Liu H, Liu C, Wang L, Ma R, Chen B, y col. Cinnamaldehyde in diabetes: A review of pharmacology, pharmacokinetics and safety. *Pharmacol Res*. 2017;122:78-89.
158. Mohammed KAA, Ahmed HMS, Sharaf HA, El-Nekeety AA, Abdel-Aziem SH, Mehaya FM, y col. Encapsulation of cinnamon oil in whey protein counteracts the disturbances in biochemical parameters, gene expression, and histological picture of the liver and pancreas of diabetic rats. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2020;27(3):2829-43.
159. Heydari Majd M, Rezaeinia H, Shadan MR, Ghorani B, Tucker N. Enrichment of zein nanofibre assemblies for therapeutic delivery of Barije (*Ferula gummosa* Boiss) essential oil. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2019;54:101290.
160. Siahbalaie R, Kavooosi G, Shakeri R. *In vitro* antioxidant and antidiabetic activity of essential oils encapsulated in gelatin-pectin particles against sugar, lipid and protein oxidation and amylase and glucosidase activity. *Food Sci Nutr*. 2020;8:6457-66.
161. Huang X, Li Y, Sabier M, Si J, Wang P, Shen Y, y col. Guidelines for the *in vitro* determination of anti-inflammatory activity. *eFood*. 2024;5(3):1-14.
162. Risaliti L, Kehagia A, Daoultzi E, Lazari D, Bergonzi MC, Vergkizi-Nikolakaki S, y col. Liposomes loaded with *Salvia triloba* and *Rosmarinus officinalis* essential oils: *In vitro* assessment of antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2019;51:493-8.
163. Bezerra Rodrigues L, Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins A, Ribeiro-Filho J, Alves Santana Cesário FR, Ferreira e Castro F, Rodrigues de Albuquerque T, y col. Anti-inflammatory activity of the essential oil obtained from *Ocimum basilicum* complexed with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) in mice. *Food Chem Toxicol*. 2017;109:836-46.
164. Bag A, Chattopadhyay RR. Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. *PLoS One*. 2015;1-17.
165. Hanafi RS, Sobeh M, Ashour ML, El-Readi MZ, Desoukey SY, Niess R, y col. Chemical composition and biological activity of essential oils of cumin and coriander fruits from Egypt. *Nat Prod J*. 2014;4(1):63-9.
166. Sponton OE, Perez AA, Stechina MF, Santiago LG. Production of protein nanovehicles by heat treatment of industrial egg white in a batch reactor. *J Food Eng*. 2020;268(109740):109740.
167. Croguennec T, Nau F, Pezennec S, Brule G. Simple rapid procedure for preparation of large quantities of ovalbumin. *J Agric Food Chem*. 2000;48:4883-9.
168. Deseta ML, Sponton OE, Finos MB, Cuffia F, Torres Nicolini A, Álvarez VA, y col. Development of antifungal films from nanocomplexes based on egg white protein nanogels and phenolic compounds. *Food Biop-hys*. 2023;18:273-88.
169. Sponton OE, Perez AA, Santiago LG. Protein-polysaccharide associative phase separation applied to obtain a linoleic acid dried ingredient. *Food Hydrocoll*. 2017;71:158-67.

170. Deseta ML, Sponton OE, Erben M, Osella CA, Frisón LN, Fenoglio C, y col. Nanocomplexes based on egg white protein nanoparticles and bioactive compounds as antifungal edible coatings to extend bread shelf life. *Food Res Int.* 2021;148:110597.
171. Cian RE, Caballero MS, Sabbag N, González RJ, Drago SR. Bio-accessibility of bioactive compounds (ACE inhibitors and antioxidants) from extruded maize products added with a red seaweed *Porphyra columbina*. *LWT.* 2014;55(1):51-8.
172. Cian RE, Vioque J, Drago SR. Structure-mechanism relationship of antioxidant and ACE I inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate fractionated by pH. *Food Res Int.* 2015;69:216-23.
173. Cian RE, Garzón AG, Ancona DB, Guerrero LC, Drago SR. Chelating properties of peptides from red seaweed *Pyropia columbina* and its effect on iron bio-accessibility. *Plant Foods Hum Nutr.* 2016;71(1):96-101.
174. Costamagna MS, Zampini IC, Alberto MR, Cuello S, Torres S, Pérez J, y col. Polyphenols rich fraction from *Geoffroea decorticans* fruits flour affects key enzymes involved in metabolic syndrome, oxidative stress and inflammatory process. *Food Chem.* 2016;190:392-402.
175. Torres Carro R, Isla MI, Thomas Valdes S, Jiménez Aspee F, Schmeda Hirschmann G, Alberto MR. Inhibition of pro-inflammatory enzymes by medicinal plants from the Argentinean highlands (Puna). *J Ethnopharmacol.* 2017;205:57-68.
176. Bi X, Lim J, Henry CJ. Spices in the management of diabetes mellitus. *Food Chem.* 2017;217:281-93.
177. Aljabeili HS, Barakat H, Abdel-Rahman HA. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*). *Food Nutr Sci.* 2018;09(05):433-46.
178. Moosavy MH, Hassanzadeh P, Mohammadzadeh E, Mahmoudi R, Khatibi SA, Mardani K. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of lemon (*Citrus limon*) peel *in vitro* and in a food model. *J Food Qual Hazards Control.* 2017;4:42-8.
179. dos Santos Paglione I, Galindo MV, de Medeiros JAS, Yamashita F, Alvim ID, Ferreira Grosso CR, y col. Comparative study of the properties of soy protein concentrate films containing free and encapsulated oregano essential oil. *Food Packag Shelf Life.* 2019;22:100419.
180. Vallverdú Queralt A, Regueiro J, Martínez Huélamo M, Rinaldi Alvarenga JF, Leal LN, Lamuela Raventos RM. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chem.* 2014;154:299-307.
181. Demir Y, Durmaz L, Taslimi P, Gulçin İ. Antidiabetic properties of dietary phenolic compounds: Inhibition effects on  $\alpha$ -amylase, aldose reductase, and  $\alpha$ -glycosidase. *Biotechnol Appl Biochem.* 2019;66(5):781-6.
182. Younis N, Abu-Mallouh S, Almasri I, Issa A, Bustanji Y. Pancreatic lipase inhibition by edible plants used in three middle east countries: A mini-review. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2021;14(2):179-88.
183. Adeniyi SA, Olatunji GA, Oguntoye OS. Total phenolic contents and anti-lipooxygenase activity of the methanolic extracts from *Durio zibethinus* Murr. *Journal of Scientific Research.* 2022;14(2):617-23.
184. Prakash B, Singh P, Kedia A, Dubey NK. Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and *in vivo* efficacy in food system. *Food Res Int.* 2012;49:201-8.
185. Teixeira B, Marques A, Ramos C, Serrano C, Matos O, Neng NR, y col. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *J Sci Food Agric.* 2013;93(11):2707-14.
186. Kamaliroosta L, Gharachorloo M, Kamaliroosta Z, Alimohammad Zadeh KH. Extraction of cinnamon essential oil and identification of its chemical compounds. *Journal of Medicinal Plants Research.* 2012;6(4):609-14.

187. Valizadeh S, Katiraei F, Mahmoudi R, Fakheri T, Mardani Karim. Biological properties of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil: Phytochemical component, antioxidant and antimicrobial activities. *International Journal of Food Nutrition and Safety*. 2015;6(3):174-84.
188. Bizzo HR, Brilhante NS, Nolvachai Y, Marriott PJ. Use and abuse of retention indices in gas chromatography. *J Chromatogr A*. 2023;1708:464376.
189. Hu J, Zhang Y, Xiao Z, Wang X. Preparation and properties of cinnamon-thyme-ginger composite essential oil nanocapsules. *Ind Crops Prod*. 2018;122:85-92.
190. Sihoglu Tepe A, Ozaslan M. Anti-Alzheimer, anti-diabetic, skin-whitening, and antioxidant activities of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum*. *Ind Crops Prod*. 2020;145:112069.
191. Usai F, Di Sotto A. *Trans*-cinnamaldehyde as a novel candidate to overcome bacterial resistance: An overview of *in vitro* studies. *Antibiotics*. 2023;12(2):254.
192. Doyle AA, Stephens JC. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*. 2019;139:104405.
193. Shreaz S, Wani WA, Behbehani JM, Raja V, Irshad M, Karched M, y col. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*. 2016;112:116-31.
194. Subash Babu P, Alshatwi AA, Ignacimuthu S. Beneficial antioxidative and antiperoxidative effect of cinnamaldehyde protect streptozotocin-induced pancreatic  $\beta$ -cells damage in wistar rats. *Biomol Ther (Seoul)*. 2014;22(1):47-54.
195. Karimirad R, Behnamian M, Dezhsetan S. Application of chitosan nanoparticles containing *Cuminum cyminum* oil as a delivery system for shelf life extension of *Agaricus bisporus*. *LWT*. 2019;106:218-28.
196. Taghizadeh SF, Rezaee R, Mehmandoust M, Madarshahi FS, Tsatsakis A, Karimi G. Coronatine elicitation alters chemical composition and biological properties of cumin seed essential oil. *Microb Pathog*. 2019;130:253-8.
197. Ghasemi G, Fattahi M, Alirezalu A, Ghosta Y. Antioxidant and antifungal activities of a new chemovar of cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Food Sci Biotechnol*. 2019;28:669-77.
198. Shareef HK, Muhammed HJ, Hussein HM, Hameed IH. Antibacterial effect of ginger (*Zingiber officinale*) Roscoe and bioactive chemical analysis using gas chromatography mass spectrum. *Oriental Journal of Chemistry*. 2016;32(2):817-37.
199. Baginska S, Golonko A, Swislocka R, Lewandowski W. Monoterpenes as medicinal agents: Exploring the pharmaceutical potential of *p*-cymene, *p*-cymenene, and  $\gamma$ -terpinene. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 2023;80(6):879-92.
200. Zochedh A, Priya M, Shunmuganarayanan A, Thandavarayan K, Sultan AB. Investigation on structural, spectroscopic, DFT, biological activity and molecular docking simulation of essential oil *Gamma*-terpinene. *J Mol Struct*. 2022;1268:133651.
201. El Aboubi M, Hdech D Ben, Bikri S, Benayad A, El Magri A, Aboussaleh Y, y col. Chemical composition of essential oils of *Citrus limon* peel from three Moroccan regions and their antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic and dermatoprotective properties. *Journal of HerbMed Pharmacology*. 2023;12(1):118-27.
202. Ben Hsouna A, Ben Halima N, Smaoui S, Hamdi N. *Citrus lemon* essential oil: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Lipids Health Dis*. 2017;16:1-11.
203. Vieira AJ, Beserra FP, Souza MC, Totti BM, Rozza AL. Limonene: aroma of innovation in health and disease. *Chem Biol Interact*. 2018;1-33.
204. Anandakumar P, Kamaraj S, Vanitha MK. D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects. *J Food Biochem*. 2020;45(1):13566.
205. Shah BB, Mehta AA. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of d-limonene. *Asian J Pharm Pharmacol*. 2018;4(6):883-7.



206. Shakeel S, Tabassum N. Effect of some naturally occurring monoterpenes viz d-limonene, *p*-cymene and terpinolene on the glycemic and hepatic function in a rat model of type 2 diabetes mellitus. *Pharmacognosy Res.* 2022;14(4):446-53.
207. El Omari N, Mrabti HN, Benali T, Ullah R, Alotaibi A, Abdullah ADI, y col. Expediting multiple biological properties of limonene and  $\alpha$ -pinene: Main bioactive compounds of *Pistacia lentiscus* L., essential oils. *Frontiers in Bioscience - Landmark.* 2023;28(9):229.
208. Cutillas AB, Carrasco A, Martínez Gutierrez R, Tomas V, Tudela J. Thyme essential oils from Spain: Aromatic profile ascertained by GC–MS, and their antioxidant, anti-lipoxygenase and antimicrobial activities. *J Food Drug Anal.* 2018;26(2):529-44.
209. Rathod NB, Kulawik P, Ozogul F, Regenstein JM, Ozogul Y. Biological activity of plant-based carvacrol and thymol and their impact on human health and food quality. *Trends Food Sci Technol.* 2021;116:733-48.
210. Kowalczyk A, Przychodna M, Sopata S, Bodalska A, Fecka I. Thymol and thyme essential oil - New insights into selected therapeutic applications. *Molecules.* 2020;25:2-17.
211. Yildiz S, Turan S, Kiralan M, Ramadan MF. Antioxidant properties of thymol, carvacrol, and thymoquinone and its efficiencies on the stabilization of refined and stripped corn oils. *Journal of Food Measurement and Characterization.* 2021;15(1):621-32.
212. Rúa J, del Valle P, de Arriaga D, Fernández Álvarez L, García Armesto MR. Combination of carvacrol and thymol: Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and antioxidant activity. *Foodborne Pathog Dis.* 2019;16(9):622-9.
213. Ranjbaran A, Kavooosi G, Mojallal-Tabatabaei Z, Ardestani SK. The antioxidant activity of *Trachyspermum ammi* essential oil and thymol in murine macrophages. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2019;20:101220.
214. Saravanan S, Pari L. Role of thymol on hyperglycemia and hyperlipidemia in high fat diet-induced type 2 diabetic C57BL/6J mice. *Eur J Pharmacol.* 2015;761:279-87.
215. Marsik P, Kokoska L, Landa P, Nepovim A, Soudek P, Vanek T. *In vitro* inhibitory effects of thymol and quinones of *Nigella sativa* seeds on cyclooxygenase-1- and -2-catalyzed prostaglandin E2 biosyntheses. *Planta Med.* 2005;71(8):739-42.
216. Mahboubi M, Kazempour N. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *Trachyspermum copticum* essential oil. *Iran J Microbiol.* 2011;3(4):194-200.
217. Bhatt S, Tewari G, Pande C, Punetha D, Prakash O. Antioxidative potential and compositional variation among *Origanum vulgare* L. collected from different districts of Kumaun Himalayas, Uttarakhand. *Journal of Essential Oil Research.* 2020;32(2):121-31.
218. Sharifi Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martorell M, Setzer WN, Contreras M del M, y col. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research.* 2018;32(9):1675-87.
219. Gavaric N, Mozina SS, Kladar N, Bozin B. Chemical profile, antioxidant and antibacterial activity of thyme and oregano essential oils, thymol and carvacrol and their possible synergism. *Journal of Essential Oil Bearing Plants.* 2015;18(4):1013-21.
220. Bayramoglu G, Senturk H, Bayramoglu A, Uyanoglu M, Colak S, Ozmen A, y col. Carvacrol partially reverses symptoms of diabetes in STZ-induced diabetic rats. *Cytotechnology.* 2014;66(2):251-7.
221. Li Y, Mai Y, Qiu X, Chen X, Li C, Yuan W, y col. Effect of long-term treatment of carvacrol on glucose metabolism in Streptozotocin-induced diabetic mice. *BMC Complement Med Ther.* 2020;20(142):1-8.
222. Govindaraju S, Arulselvi PI. Characterization of *Coleus aromaticus* essential oil and its major constituent carvacrol for *in vitro* antidiabetic and antiproliferative activities. *J Herbs Spices Med Plants.* 2018;24(1):37-51.
223. Taibi M, Elbouzidi A, Haddou M, Baraich A, Ou-Yahia D, Bellaouchi R, y col. Evaluation of the interaction between carvacrol and thymol, major compounds of *Ptychotis verticillata* essential oil: Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities against breast cancer lines. *Life.* 2024;14(8):1037.

224. Karimirad R, Behnamian M, Dezhsetan S. Development and characterization of nano biopolymer containing cumin oil as a new approach to enhance antioxidant properties of button mushroom. *Int J Biol Macromol*. 2018;113:662-8.
225. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*. 2016;235:337-51.
226. Wang W, Nema S, Teagarden D. Protein aggregation - Pathways and influencing factors. *Int J Pharm*. 2010;390(2):89-99.
227. Pan K, Chen H, Davidson PM, Zhong Q. Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: Physical and antilisterial properties. *J Agric Food Chem*. 2014;62:1649-57.
228. Wang Y, Zhang L, Wang P, Xu X, Zhou G. pH-shifting encapsulation of curcumin in egg white protein isolate for improved dispersity, antioxidant capacity and thermal stability. *Food Res Int*. 2020;137:109366.
229. Perez AA, Andermatten RB, Rubiolo AC, Santiago LG.  $\beta$ -Lactoglobulin heat-induced aggregates as carriers of polyunsaturated fatty acids. *Food Chem*. 2014;158:66-72.
230. Albani JR. Fluorophores: descriptions and properties. En: *Structure and dynamics of macromolecules: absorption and fluorescence studies*. 1.a ed. Paris: Elsevier; 2004. p. 99-140.
231. Sponton OE, Perez AA, Carrara CR, Santiago LG. Complexes between ovalbumin nanoparticles and linoleic acid: Stoichiometric, kinetic and thermodynamic aspects. *Food Chem*. 2016;211:819-26.
232. Visentini FF, Sponton OE, Perez AA, Santiago LG. Formation and colloidal stability of ovalbumin-retinol nanocomplexes. *Food Hydrocoll*. 2017;67:130-8.
233. Hermanto RF, Khasanah LU, Kawiji, Atmaka W, Manuhara GJ, Utami R. Physical characteristics of cinnamon oil microcapsule. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*. 2016;107(1):1-9.
234. Hu Q, Li X, Chen F, Wan R, Yu CW, Li J, y col. Microencapsulation of an essential oil (cinnamon oil) by spray drying: Effects of wall materials and storage conditions on microcapsule properties. *J Food Process Preserv*. 2020;44(11):1-15.
235. Yang K, Liu A, Hu A, Li J, Zen Z, Liu Y, y col. Preparation and characterization of cinnamon essential oil nanocapsules and comparison of volatile components and antibacterial ability of cinnamon essential oil before and after encapsulation. *Food Control*. 2021;123:107783.
236. Hemmatkhah F, Zeynali F, Almasi H. Encapsulated cumin seed essential oil-loaded active papers: Characterization and evaluation of the effect on quality attributes of beef hamburger. *Food Bioproc Tech*. 2020;13(3):533-47.
237. Cortés Camargo S, Acuña Avila PE, Rodríguez Huezo ME, Román Guerrero A, Varela Guerrero V, Pérez Alonso C. Effect of chia mucilage addition on oxidation and release kinetics of lemon essential oil microencapsulated using mesquite gum-chia mucilage mixtures. *Food Res Int*. 2019;116:1010-9.
238. Galindo Pérez MJ, Quintanar Guerrero D, Cornejo Villegas M de los Á, Zambrano Zaragoza M de la L. Optimization of the emulsification-diffusion method using ultrasound to prepare nanocapsules of different food-core oils. *LWT*. 2018;87:333-41.
239. Hasani S, Ojagh SM, Ghorbani M. Nanoencapsulation of lemon essential oil in Chitosan-Hicap system. Part 1: Study on its physical and structural characteristics. *Int J Biol Macromol*. 2018;115:143-51.
240. Jiang T, Wang C, Liu W, Li Y, Luan Y, Liu P. Optimization and characterization of lemon essential oil entrapped from chitosan/cellulose nanocrystals microcapsules. *J Appl Polym Sci*. 2021;138:51265.
241. Liu X, Xue F, Adhikari B. Encapsulation of essential oils using hemp protein isolate-gum Arabic complex coacervates and evaluation of the capsules. *Sustainable Food Technology*. 2023;1(3):426-36.
242. Marques GR, Fernandes RV de B, Lago AMT, Borges SV, Bertolucci SKV, Lima A de JB, y col. Spray-dried thyme essential oil microparticles using different polymeric matrices. *Drying Technology*. 2021;39(12):1883-94.

243. Dias Gonçalves N, de Lima Pena F, Sartoratto A, Derlamelina C, Teixeira Duarte MC, Costa Antunes AE, y col. Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. *Food Res Int*. 2017;96:154-60.
244. Hernández Nava R, López Malo A, Palou E, Ramírez Corona N, Jiménez Munguía MT. Encapsulation of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) by complex coacervation between gelatin and chia mucilage and its properties after spray drying. *Food Hydrocoll*. 2020;109:106077.
245. Fernandes RVB, Botrel DA, Monteiro PS, Borges S V., Souza AU, Mendes LES. Microencapsulated oregano essential oil in grated Parmesan cheese conservation. *Int Food Res J*. 2018;25(2):661-9.
246. do Nascimento LD, Barbosa de Moraes AA, da Costa KS, Galúcio JMP, Taube PS, Leal Costa CM, y col. Bioactive natural compounds and antioxidant activity of essential oils from spice plants: New findings and potential applications. *Biomolecules*. 2020;10:988.
247. Sarikurkcü C, Zengin G, Oskay M, Uysal S, Ceylan R, Aktumsek A. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Ind Crops Prod*. 2015;70:178-84.
248. Ballester Costa C, Sendra E, Fernández López J, Pérez Álvarez JA, Viuda Martos M. Assessment of antioxidant and antibacterial properties on meat homogenates of essential oils obtained from four *Thymus* species achieved from organic growth. *Foods*. 2017;6(8):59.
249. Liu Q, Han R, Yu D, Wang Z, Zhuansun X, Li Y. Characterization of thyme essential oil composite film based on soy protein isolate and its application in the preservation of cherry tomatoes. *LWT*. 2024;191:115686.
250. González Reza RM, Hernández Sánchez H, Quintanar Guerrero D, Alamilla Beltrán L, Cruz Narváez Y, Zambrano Zaragoza ML. Synthesis, controlled release, and stability on storage of chitosan-thyme essential oil nanocapsules for food applications. *Gels*. 2021;7(4):212.
251. Bhatia S, Al-Harrasi A, Shah YA, Altoubi HWK, Kotta S, Sharma P, y col. Fabrication, characterization, and antioxidant potential of sodium alginate/acacia gum hydrogel-based films loaded with cinnamon essential oil. *Gels*. 2023;9(4):337.
252. Xue F, Gu Y, Wang Y, Li C, Adhikari B. Encapsulation of essential oil in emulsion based edible films prepared by soy protein isolate-gum acacia conjugates. *Food Hydrocoll*. 2019;96:178-89.
253. Viacava GE, Perez Cenci M, Ansorena MR. Effect of chitosan edible coatings incorporated with free or microencapsulated thyme essential oil on quality characteristics of fresh-cut carrot slices. *Food Bioproc Tech*. 2022;15(4):768-84.
254. Lemos MF, Lemos MF, Pacheco HP, Guimarães AC, Fronza M, Endringer DC, y col. Seasonal variation affects the composition and antibacterial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris*. *Ind Crops Prod*. 2016;95:543-8.
255. Rodríguez García I, Silva Espinoza BA, Ortega Ramírez LA, Leyva JM, Siddiqui MW, Cruz Valenzuela MR, y col. Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016;56(10):1717-27.
256. Sampaio Paulo AF, Balan GC, Ströher GR, Yamashita F, Bittencourt PRS, Sakanaka LS, y col. Influence of free and microencapsulated oregano oil on starch and poly (butylene co-terephthalate adipate) active film properties. *Polymer Bulletin*. 2021;79(7):4859-77.
257. Jayari A, Donsi F, Ferrari G, Maaroufi A. Nanoencapsulation of thyme essential oils: Formulation, characterization, storage stability and biological activity. *Foods*. 2022;11(13):1858.
258. Wu K, Zhang T, Chai X, Duan X, He D, Yu H, y col. Encapsulation efficiency and functional stability of cinnamon essential oil in modified  $\beta$ -cyclodextrins: *In vitro* and *in silico* evidence. *Foods*. 2023;12(1):45.
259. Tongnuanchan P, Benjakul S, Prodpran T. Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chem*. 2012;134(3):1571-9.

260. Fang L, Wang X, Guo L, Liu Q. Antioxidant, anti-microbial properties and chemical composition of cumin essential oils extracted by three methods. *Open Chem.* 2018;16:291-7.
261. Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2008;48(5):430-41.
262. Liu S, Zhao C, Cao Y, Li Y, Zhang Z, Nie D, y col. Comparison of chemical compositions and antioxidant activity of essential oils from litsea cubeba, cinnamon, anise, and eucalyptus. *Molecules.* 2023;28(13):5051.
263. Kulawik P, Jamróz E, Kruk T, Szymkowiak A, Tkaczewska J, Krzyściak P, y col. Active edible multi-layer chitosan/furcellaran micro/nanoemulsions with plant essential oils and antimicrobial peptides: Biological properties and consumer acceptance. *Food Control.* 2023;150:109767.
264. Bettaieb Rebey I, Jabri Karoui I, Hamrouni Sellami I, Bourgou S, Limam F, Marzouk B. Effect of drought on the biochemical composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *Ind Crops Prod.* 2012;36(1):238-45.
265. Tahir HU, Sarfraz RA, Ashraf A, Adil S. Chemical composition and antidiabetic activity of essential oils obtained from two spices (*Syzygium aromaticum* and *Cuminum cyminum*). *Int J Food Prop.* 2016;19(10):2156-64.
266. Nawaz A, Ali T, Naeem M, Hussain F, Li Z, Nasir A. Biochemical, structural characterization and *in-vitro* evaluation of antioxidant, antibacterial, cytotoxic, and antidiabetic activities of nanosuspensions of *Cinnamomum zeylanicum* bark extract. *Front Chem.* 2023;11:1194389.
267. Habtemariam S. Antidiabetic potential of monoterpenes: A case of small molecules punching above their weight. *Int J Mol Sci.* 2018;19(1):4.
268. Salazar MO, Osella MI, Arcusin DEJ, Lescano LE, Furlan RLE. New  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from a chemically engineered essential oil of *Origanum vulgare* L. *Ind Crops Prod.* 2020;156:112855.
269. Ouknin M, Alahyane H, Ait Aabd N, Elgadi S, Lghazi Y, Majidi L. Comparative analysis of five Moroccan thyme species: Insights into chemical composition, antioxidant potential, anti-enzymatic properties, and insecticidal effects. *Plants.* 2025;14(1):116.
270. Ghalib R, Mehrotra N. *In vitro*  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of nanoencapsulated *Cuminum cyminum* L. (Angiosperms: Apiaceae) and its interaction with acarbose. *Annals of Phytomedicine: An International Journal.* 2022;11(1):465-71.
271. Kaskoos RA. GC/MS profile and *in-vitro* antidiabetic activity of *Cinnamomum zeylanicum* Blume., bark and *Trachyspermum ammi* (L.) *Sprague*, seeds. *Journal of Essential Oil Bearing Plants.* 2019;22(2):535-44.
272. Kuttithodi AM, Narayanankutty A, Visakh NU, Job JT, Pathrose B, Olatunji OJ, y col. Chemical composition of the *Cinnamomum malabattrum* leaf essential oil and analysis of its antioxidant, enzyme inhibitory and antibacterial activities. *Antibiotics.* 2023;12(5):940.
273. Purbowatingrum, Ngadiwiyana, Fachriyah E, Ismiyanto, Ariestiani B, Khikmah. Antidiabetic activity from cinnamaldehyde encapsulated by nanochitosan. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng.* 2018;349(1):12048.
274. Wanniarachchi B, Satharani HMWK, Jayawardena BM, Dewangani HGN. Synthesis and characterization of cinnamon loaded BSA microparticles with antidiabetic properties. *Biology, Medicine, & Natural Product Chemistry.* 2023;12(1):241-50.
275. Sayari A, Mahfoudhi A, Alghamdi OA, Hmida-Sayari A. Characterization of some plant extracts, piperine, and piperic acid and their anti-obesity and anti-acne effects through the *in vitro* inhibition of pancreatic and bacterial lipases. *Catalysts.* 2024;14(11):776.
276. Ali-Shtayeh MS, Jamous RM, Abu-Zaitoun SY, Akkawi RJ, Kalbouneh SR, Dudai N, y col. Secondary treated effluent irrigation did not impact chemical composition, and enzyme inhibition activities of essential oils from *Origanum syriacum* var. *syriacum*. *Ind Crops Prod.* 2018;111:775-86.

277. Abdul Razak KN, Husain S, Mohamad Zobir SZ, Abdul Nasir AA, Ismail NN, Mohamad S, y col. *In silico* and *in vitro* studies of selected *Citrus* plants on the inhibition of pancreatic lipase. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*. 2024;20:170-85.
278. Ortega Pérez LG, Piñón Simental JS, Magaña Rodríguez OR, López Mejía A, Ayala Ruiz LA, García Calderón AJ, y col. Evaluation of the toxicology, anti-lipase, and antioxidant effects of *Callistemon citrinus* in rats fed with a high fat-fructose diet. *Pharm Biol*. 2022;60(1):1384-93.
279. Wang Z, Zhao R, Gao H, Yang Y, Yang X, Gu H, y col. Solvent-free microwave extraction of essential oil and hydrosol from fresh leaves of *Cinnamomum burmannii* (Nees et T. Nees) Blume after screw extrusion treatment and evaluation of pancreatic lipase inhibitory activities *in vitro* compared to its main compo. *Ind Crops Prod*. 2023;202:116983.
280. Abeysekera WPKM, Arachchige SPG, Ratnasooriya WD. Bark extracts of Ceylon cinnamon possess antilipidemic activities and bind bile acids *in vitro*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2017;2017:7347219.
281. Jianu C, Rusu LC, Muntean I, Cocan I, Lukinich-Gruia AT, Goleț I, y col. *In vitro* and *in silico* evaluation of the antimicrobial and antioxidant potential of *Thymus pulegioides* essential oil. *Antioxidants*. 2022;11(12):2472.
282. Kamdem MS, Sameza ML, Dongmo PMJ, Boyom FF, Bakargna-Via I, Fokou JBH, y col. Antiradical, anti-inflammatory and antifungal activities of essential oils of two aromatic plants: *Apium graveolens* (Apiaceae) and *Thymus vulgaris* (Lamiaceae). *Journal of Life Sciences*. 2015;9:51-64.
283. Sidiropoulou E, Marugán-Hernández V, Skoufos I, Giannenas I, Bonos E, Aguiar-Martins K, y col. *In vitro* antioxidant, antimicrobial, anticoccidial, and anti-inflammatory study of essential oils of oregano, thyme, and sage from Epirus, Greece. *Life*. 2022;12(11):1783.
284. Wang J, Su B, Jiang H, Cui N, Yu Z, Yang Y, y col. Traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Cinnamomum* (Lauraceae): A review. *Fitoterapia*. 2020;146:104675.
285. Hamdan D, Ashour ML, Mulyaningsih S, El-shazly A, Wink M. Chemical composition of the essential oils of variegated pink-fleshed lemon (*Citrus x limon* L. *Burm. f.*) and their anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2013;68:275-84.
286. Dongmo PMJ, Tchoumboungang F, Boyom FF, Sonwa ET, Zollo PHA, Menut C. Antiradical, antioxidant activities and anti-inflammatory potential of the essential oils of the varieties of *Citrus limon* and *Citrus aurantifolia* growing in Cameroon. *Journal of Asian Scientific Research*. 2013;3(10):1046-57.
287. Weiss J, Salminen H, Moll P, Schmitt C. Use of molecular interactions and mesoscopic scale transitions to modulate protein-polysaccharide structures. *Adv Colloid Interface Sci*. 2019;271:101987.
288. Zhang Z, Wang B, Chen J, Adhikari B. Modification of plant and algal proteins through the Maillard reaction and complex coacervation: Mechanisms, characteristics, and applications in encapsulating oxygen-sensitive oils. *Sustainable Food Technology*. 2024;2(3):567-93.
289. Gawkowska D, Cybulska J, Zdunek A. Structure-related gelling of pectins and linking with other natural compounds: A review. *Polymers (Basel)*. 2018;10(7):762.
290. Riyamol N, Gada Chengaiyan J, Rana SS, Ahmad F, Haque S, Capanoglu E. Recent advances in the extraction of pectin from various sources and industrial applications. *ACS Omega*. 2023;8(49):46309-24.
291. Chan SY, Choo WS, Young DJ, Loh XJ. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydr Polym*. 2017;161:118-39.
292. Napiórkowska A, Kurek M. Coacervation as a novel method of microencapsulation of essential oils - A review. *Molecules*. 2022;27(16):5142.
293. Manaf MA, Subuki I, Jai J, Raslan R, Mustapa AN. Encapsulation of volatile citronella essential oil by coacervation: Efficiency and release study. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*. 2018;358(1):12072.

294. Muhoza B, Xia S, Zhang X. Gelatin and high methyl pectin coacervates crosslinked with tannic acid: The characterization, rheological properties, and application for peppermint oil microencapsulation. *Food Hydrocoll.* 2019;97:105174.
295. Tavares L, Zapata Noreña CP. Encapsulation of ginger essential oil using complex coacervation method: Coacervate formation, rheological property, and physicochemical characterization. *Food Bioproc Tech.* 2020;13(8):1405-20.
296. Qiu L, Zhang M, Adhikari B, Chang L. Microencapsulation of rose essential oil in mung bean protein isolate-apricot peel pectin complex coacervates and characterization of microcapsules. *Food Hydrocoll.* 2022;124:107366.
297. Borgonovi SM, Iametti S, Speranza AR, Di Nunzio M. Cell culture models for assessing the effects of bioactive compounds in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*): A systematic review. *Food Funct.* 2024;15(6):2799-813.
298. Patel MB, Mishra SH. Cell lines in diabetes research: A review. *Pharmacogn Rev.* 2008;2(4):188-205.
299. Nims RW, Price PJ. Best practices for detecting and mitigating the risk of cell culture contaminants. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2017;53(10):872-9.
300. Kapalczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, y col. 2D and 3D cell cultures - A comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science.* 2018;14(4):910-9.
301. Khalef L, Lydia R, Filicia K, Moussa B. Cell viability and cytotoxicity assays: Biochemical elements and cellular compartments. *Cell Biochem Funct.* 2024;42(3):4007.
302. Semaan DG, Igoli JO, Young L, Gray AI, Rowan EG, Marrero E. *In vitro* anti-diabetic effect of flavonoids and pheophytins from *Allophylus cominia* Sw. on the glucose uptake assays by HepG2, L6, 3T3-L1 and fat accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *J Ethnopharmacol.* 2018;216:8-17.
303. Li B, Terazono Y, Hirasaki N, Tatemichi Y, Kinoshita E, Obata A, y col. Inhibition of glucose transport by tomatoside A, a tomato seed steroidal saponin, through the suppression of GLUT2 expression in Caco-2 cells. *J Agric Food Chem.* 2018;66(6):1428-34.
304. Schreck K, Melzig MF. Traditionally used plants in the treatment of diabetes mellitus: Screening for uptake inhibition of glucose and fructose in the Caco2-cell model. *Front Pharmacol.* 2021;12:692566.
305. Liu Y, Pang D, Xing D, Wang W, Li Q, Liao S, y col. Cinnamon free phenolic extract regulates glucose absorption in intestinal cells by inhibiting glucose transporters. *Food Biosci.* 2023;52:102405.
306. Kadan S, Saad B, Sasson Y, Zaid H. *In vitro* evaluation of anti-diabetic activity and cytotoxicity of chemically analysed *Ocimum basilicum* extracts. *Food Chem.* 2016;196:1066-74.
307. Feriotto G, Tagliati F, Costa V, Monesi M, Tabolacci C, Beninati S, y col.  $\alpha$ -Pinene, a main component of *Pinus* essential oils, enhances the expression of insulin-sensitive glucose transporter type 4 in murine skeletal muscle cells. *Int J Mol Sci.* 2024;25(2):1252.
308. Sriramavaratharajan V, Chellappan DR, Karthi S, Ilamathi M, Murugan R. Multi target interactions of essential oil nanoemulsion of *Cinnamomum travancoricum* against diabetes mellitus via *in vitro*, *in vivo* and *in silico* approaches. *Process Biochemistry.* 2022;118:190-204.
309. Natoli M, Leoni BD, D'Agnano I, Zucco F, Felsani A. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicology in Vitro.* 2012;26(8):1243-6.
310. Kulkarni CP, Thevelein JM, Luyten W. Characterization of SGLT1-mediated glucose transport in Caco-2 cell monolayers, and absence of its regulation by sugar or epinephrine. *Eur J Pharmacol.* 2021;897:173925.
311. Honari N, Pouraboli I, Gharbi S. Antihyperglycemic property and insulin secreting activity of hydroalcoholic shoot extract of *Thymus caramanicus* Jalas: A wild predominant source of food additive in folk medicine. *J Funct Foods.* 2018;46:128-35.

312. Bohn T, Carriere F, Day L, Deglaire A, Egger L, Freitas D, y col. Correlation between *in vitro* and *in vivo* data on food digestion. What can we predict with static *in vitro* digestion models? *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;58(13):2239-61.
313. Dupont D, Alric M, Blanquet-Diot S, Bornhorst G, Cueva C, Deglaire A, y col. Can dynamic *in vitro* digestion systems mimic the physiological reality? *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018;59(10):1546-62.
314. Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, y col. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - An international consensus. *Food Funct*. 2014;5(6):1113-24.
315. Sensoy I. A review on the food digestion in the digestive tract and the used *in vitro* models. *Curr Res Food Sci*. 2021;4:308-19.
316. Li C, Yu W, Wu P, Chen XD. Current *in vitro* digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends Food Sci Technol*. 2020;96:114-26.
317. Zhou H, Tan Y, McClements DJ. Applications of the INFOGEST *in vitro* digestion model to foods: A review. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2023;14:135-56.
318. Martos G, Contreras P, Molina E, López Fandiño R. Egg white ovalbumin digestion mimicking physiological conditions. *J Agric Food Chem*. 2010;58(9):5640-8.
319. Liu YF, Oey I, Bremer P, Silcock P, Carne A. *In vitro* peptic digestion of ovomucin-depleted egg white affected by pH, temperature and pulsed electric fields. *Food Chem*. 2017;231:165-74.
320. Visentini FF, Perez AA, Baravalle ME, Renna MS, Ortega HH, Santiago LG. *In vitro* gastrointestinal digestion and cytotoxic effect of ovalbumin-conjugated linoleic acid nanocomplexes. *Food Res Int*. 2020;137:109381.
321. Timilsena YP, Adhikari R, Barrow CJ, Adhikari B. Digestion behaviour of chia seed oil encapsulated in chia seed protein-gum complex coacervates. *Food Hydrocoll*. 2017;66:71-81.
322. Wang B, Blanch E, Barrow CJ, Adhikari B. Preparation and study of digestion behavior of lactoferrin-sodium alginate complex coacervates. *J Funct Foods*. 2017;37:97-106.
323. Ketnawa S, Reginio FC, Thuengtung S, Ogawa Y. Changes in bioactive compounds and antioxidant activity of plant-based foods by gastrointestinal digestion: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2021;62(17):4684-705.
324. Castaldo L, Izzo L, De Pascale S, Narv A, Rodriguez Carrasco Y, Ritieni A. Chemical composition, *in vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of polyphenolic compounds from nutraceutical fennel waste extract. *Molecules*. 2021;26:1968.
325. Li J, Yang X, Li X, Zhang Z, Wei Z, Xing Z, y col. Okra polysaccharides/gelatin complex coacervate as pH-responsive and intestine-targeting delivery protects isoquercetin bioactivity. *Int J Biol Macromol*. 2020;159:487-96.
326. Vulić J, Šeregelj V, Kalušević A, Lević S, Nedović V, Šaponjac VT, y col. Bioavailability and bioactivity of encapsulated phenolics and carotenoids isolated from red pepper waste. *Molecules*. 2019;24(15):2837.
327. Ferreira Santos P, Ibarz R, Fernandes JM, Pinheiro AC, Botelho C, Rocha CMR, y col. Encapsulated pine bark polyphenolic extract during gastrointestinal digestion: Bioaccessibility, bioactivity and oxidative stress prevention. *Foods*. 2021;10(2):328.
328. de Alencar SM, de Oliveira Sartori AG, Dag D, Souza Batista P, Rosalen PL, Ikegaki M, y col. Dynamic gastrointestinal digestion/intestinal permeability of encapsulated and nonencapsulated Brazilian red propolis: Active compounds stability and bioactivity. *Food Chem*. 2023;411:135469.
329. Hosseini SF, Zandi M, Rezaei M, Farahmandghavi F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and *in vitro* release study. *Carbohydr Polym*. 2013;95:50-6.
330. Masuelli MA. Viscometric study of pectin. Effect of temperature on the hydrodynamic properties. *Int J Biol Macromol*. 2011;48(2):286-91.

331. Visentini FF, Sponton OE, Perez AA, Santiago LG. Biopolymer nanoparticles for vehiculization and photochemical stability preservation of retinol. *Food Hydrocoll.* 2017;70:363-70.
332. Ontawong A, Duangjai A, Srimaroeng C. Coffea arabica bean extract inhibits glucose transport and disaccharidase activity in Caco-2 cells. *Biomed Rep.* 2021;15(3):73.
333. Ni D, Ai Z, Munoz-Sandoval D, Suresh R, Ellis PR, Yuqiong C, y col. Inhibition of the facilitative sugar transporters (GLUTs) by tea extracts and catechins. *The FASEB Journal.* 2020;34(8):9995-10010.
334. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
335. Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Ballance S, y col. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc.* 2019;14(4):991-1014.
336. Zhang S, Vardhanabhuti B. Intragastric gelation of whey protein-pectin alters the digestibility of whey protein during *in vitro* pepsin digestion. *Food Funct.* 2014;5(1):102-10.
337. Sorasitthiyankarn FN, Muangnoi C, Rojsitthisak P, Rojsitthisak P. Chitosan oligosaccharide/alginate nanoparticles as an effective carrier for astaxanthin with improving stability, *in vitro* oral bioaccessibility, and bioavailability. *Food Hydrocoll.* 2022;124:107246.
338. Zhang Z, Zhang R, McClements DJ. Encapsulation of  $\beta$ -carotene in alginate-based hydrogel beads: Impact on physicochemical stability and bioaccessibility. *Food Hydrocoll.* 2016;61:1-10.
339. Ghaderi Ghahfarokhi M, Barzegar M, Sahari MA, Azizi MH. Enhancement of thermal stability and antioxidant activity of thyme essential oil by encapsulation in chitosan nanoparticles. *Journal of Agricultural Science and Technology.* 2016;18:1781-92.
340. Espinosa Sandoval L, Ochoa Martínez C, Ayala Aponte A, Pastrana L, Gonçalves C, Cerqueira MA. Polysaccharide-based multilayer nano-emulsions loaded with oregano oil: Production, characterization, and *in vitro* digestion assessment. *Nanomaterials.* 2021;11(4):878.
341. Donkor ON, Stojanovska L, Ginn P, Ashton J, Vasiljevic T. Germinated grains - Sources of bioactive compounds. *Food Chem.* 2012;135(3):950-9.
342. Cian RE, Nardo AE, Garzón AG, Añón MC, Drago SR. Identification and *in silico* study of a novel dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptide derived from green seaweed *Ulva* spp. hydrolysates. *LWT.* 2022;154:112738.
343. Tian L, Roos YH, Miao S. Phase behavior and complex coacervation of whey protein isolate-*Tremella fuciformis* polysaccharide solution. *Food Hydrocoll.* 2023;143:108871.
344. González Martínez DA, Carrillo Navas H, Barrera Díaz CE, Martínez Vargas SL, Alvarez Ramírez J, Pérez Alonso C. Characterization of a novel complex coacervate based on whey protein isolate-tamarind seed mucilage. *Food Hydrocoll.* 2017;72:115-26.
345. Souza CJF, Souza CSF, Heckert Bastos LP, Garcia Rojas EE. Interpolymer complexation of egg white proteins and carrageenan: Phase behavior, thermodynamics and rheological properties. *Int J Biol Macromol.* 2018;109:467-75.
346. Dong Z, Yu S, Zhai K, Bao N, Rashed MMA, Wu X. Fabrication and characterization of complex coacervation: The integration of sesame protein isolate-polysaccharides. *Foods.* 2023;12(19):3696.
347. de Kruif CG, Weinbreck F, de Vries R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2004;9(5):340-9.
348. Weinbreck F, Minor M, De Kruif CG. Microencapsulation of oils using whey protein/gum arabic coacervates. *J Microencapsul.* 2004;21(6):667-79.
349. Schmitt C, Turgeon SL. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Adv Colloid Interface Sci.* 2011;167:63-70.



350. Tamjidi F, Shahedi M, Varshosaz J, Nasirpour A. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2013;19:29-43.
351. de Oliveira JL, Campos EVR, Germano Costa T, Lima R, Della Vechia JF, Soares ST, y col. Association of zein nanoparticles with botanical compounds for effective pest control systems. *Pest Manag Sci*. 2019;75(7):1855-65.
352. Samak G, Gangwar R, Meena AS, Rao RG, Shukla PK, Manda B, y col. Calcium channels and oxidative stress mediate a synergistic disruption of tight junctions by ethanol and acetaldehyde in Caco-2 cell monolayers. *Sci Rep*. 2016;6:38899.
353. Sarkar A, Zhang S, Murray B, Russell JA, Boxal S. Modulating *in vitro* gastric digestion of emulsions using composite whey protein-cellulose nanocrystal interfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017;158:137-46.
354. Feng J, Xu H, Zhang L, Wang H, Liu S, Liu Y, y col. Development of nanocomplexes for curcumin vehiculization using ovalbumin and sodium alginate as building blocks: Improved stability, bioaccessibility, and antioxidant activity. *J Agric Food Chem*. 2019;67(1):379-90.
355. Nyemb K, Guérin Dubiard C, Pézennec S, Jardin J, Briard Bion V, Cauty C, y col. The structural properties of egg white gels impact the extent of *in vitro* protein digestion and the nature of peptides generated. *Food Hydrocoll*. 2016;54:315-27.
356. Xiang C, Gao J, Ye H, Ren G, Ma X, Xie H, y col. Development of ovalbumin-pectin nanocomplexes for vitamin D3 encapsulation: Enhanced storage stability and sustained release in simulated gastrointestinal digestion. *Food Hydrocoll*. 2020;106:105926.
357. Perez AA, Sponton OE, Andermatten RB, Rubiolo AC, Santiago LG. Biopolymer nanoparticles designed for polyunsaturated fatty acid vehiculization: Protein-polysaccharide ratio study. *Food Chem*. 2015;188:543-50.
358. Claude M, Lupi R, Picariello G, Drouet M, Larré C, Denery-Papini S, y col. Digestion differently affects the ability of native and thermally aggregated ovalbumin to trigger basophil activation. *Food Res Int*. 2019;118:108-14.
359. Roy S, Kumar V. A practical approach on SDS PAGE for separation of protein. *International Journal of Science and Research*. 2014;3(8):955-60.
360. Friedman M, Jürgens HS. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 2000;48(6):2101-10.
361. Gutiérrez Grijalva EP, Angulo Escalante MA, León Félix J, Heredia JB. Effect of *in vitro* digestion on the total antioxidant capacity and phenolic content of 3 species of oregano (*Hedeoma patens*, *Lippia graveolens*, *Lippia palmeri*). *J Food Sci*. 2017;82(12):2832-9.
362. Cheng CJ, Ferruzzi M, Jones OG. Fate of lutein-containing zein nanoparticles following simulated gastric and intestinal digestion. *Food Hydrocoll*. 2019;87:229-36.
363. Gaur S, Lopez EC, Ojha A, Andrade JE. Functionalization of lipid-based nutrient supplement with  $\beta$ -cyclodextrin inclusions of oregano essential oil. *J Food Sci*. 2018;83(6):1748-56.
364. Niaz T, Imran M, Mackie A. Improving carvacrol bioaccessibility using core-shell carrier-systems under simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem*. 2021;353:129505.
365. Kirkan B, Sarikurkcu C, Amarowicz R. Composition, and antioxidant and enzyme-inhibition activities, of essential oils from *Satureja thymbra* and *Thymbra spicata* var. *spicata*. *Flavour Fragr J*. 2019;34(6):436-42.
366. Aprotosoia AC, Miron A, Ciocârlan N, Brebu M, Roşu CM, Trifan A, y col. Essential oils of Moldavian *Thymus* species: Chemical composition, antioxidant, anti-Aspergillus and antigenotoxic activities. *Flavour Fragr J*. 2019;34(3):175-86.

367. Ydjedd S, Bouriche S, López-Nicolás R, Sánchez Moya T, Frontela Saseta C, Ros Berruezo G, y col. Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on encapsulated and nonencapsulated phenolic compounds of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp extracts and their antioxidant capacity. *J Agric Food Chem*. 2017;65(4):827-35.
368. Nimalaratne C, Bandara N, Wu J. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. *Food Chem*. 2015;188:467-72.
369. de Castro RJS, Sato HH. A response surface approach on optimization of hydrolysis parameters for the production of egg white protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2015;4(1):55-62.
370. Milea Ștefania A, Aprodu I, Vasile AM, Barbu V, Râpeanu G, Bahrim GE, y col. Widen the functionality of flavonoids from yellow onion skins through extraction and microencapsulation in whey proteins hydrolysates and different polymers. *J Food Eng*. 2019;251:29-35.
371. Zhang F, Khan MA, Cheng H, Liang L. Co-encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol and resveratrol within zein nanoparticles: Impact on antioxidant activity and stability. *J Food Eng*. 2019;247:9-18.
372. Chen C, Chi YJ, Zhao MY, Xu W. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. *Food Sci Biotechnol*. 2012;21(1):27-34.
373. Oboh G, Ademolun AO, Odubanjo O V., Akinbola IA. Antioxidative properties and inhibition of key enzymes relevant to type-2 diabetes and hypertension by essential oils from black pepper. *Adv Pharmacol Sci*. 2013;2013:926047.
374. Adefegha SA, Olasehinde TA, Oboh G. Essential oil composition, antioxidant, antidiabetic and antihypertensive properties of two *Fromomum* species. *J Oleo Sci*. 2017;66(1):51-63.
375. Haile T, Cardoso SM, de Oliveira Raphaelli C, Pereira OR, Pereira E dos S, Vizzotto M, y col. Chemical composition, antioxidant potential, and blood glucose lowering effect of aqueous extract and essential oil of *Thymus serrulatus* Hochst. ex *benth*. *Front Pharmacol*. 2021;12:621536.
376. Aazza S, El-Guendouz S, Miguel MG, Antunes MD, Faleiro ML, Correia AI, y col. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-hyperglycaemic activities of essential oils from *Thymbra capitata*, *Thymus albicans*, *Thymus caespitosus*, *Thymus carnosus*, *Thymus lotocephalus* and *Thymus mastichina* from Portugal. *Nat Prod Commun*. 2016;11(7):1029-38.
377. Gutiérrez Grijalva EP, Antunes Ricardo M, Acosta Estrada BA, Gutiérrez Uribe JA, Basilio Heredia J. Cellular antioxidant activity and *in vitro* inhibition of  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase and pancreatic lipase of oregano polyphenols under simulated gastrointestinal digestion. *Food Res Int*. 2019;116:676-86.
378. Yu Z, Yin Y, Zhao W, Liu J, Chen F. Anti-diabetic activity peptides from albumin against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase. *Food Chem*. 2012;135(3):2078-85.
379. Yu Z, Yin Y, Zhao W, Yu Y, Liu B, Liu J, y col. Novel peptides derived from egg white protein inhibiting  $\alpha$ -glucosidase. *Food Chem*. 2011;129(4):1376-82.
380. Gazme B, Udenigwe CC, Rezaei K. Anti-diabetic properties of hydrolysates from egg white proteins using immobilized enzymes followed by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Applied Food Biotechnology*. 2020;7(4):235-49.
381. Aleixandre A, Gil JV, Sineiro J, Rosell CM. Understanding phenolic acids inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase and influence of reaction conditions. *Food Chem*. 2022;372:131231.
382. Lim J, Ferruzzi MG, Hamaker BR. Structural requirements of flavonoids for the selective inhibition of  $\alpha$ -amylase versus  $\alpha$ -glucosidase. *Food Chem*. 2022;370:130981.
383. Farsi E, Shafaei A, Hor SY, Khadeer Ahamed MB, Yam MF, Attitalla IH, y col. Correlation between enzymes inhibitory effects and antioxidant activities of standardized fractions of methanolic extract obtained from *Ficus deltoidea* leaves. *Afr J Biotechnol*. 2011;10(67):15184-94.
384. Lin GM, Chen YH, Yen PL, Chang ST. Antihyperglycemic and antioxidant activities of twig extract from *Cinnamomum osmophloeum*. *J Tradit Complement Med*. 2016;6:281-8.

385. Domínguez Díaz L, Fernández Ruiz V, Cámara M. The frontier between nutrition and pharma: The international regulatory framework of functional foods, food supplements and nutraceuticals. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60(10):1738-46.
386. Granato D, Barba FJ, Bursać Kovačević D, Lorenzo JM, Cruz AG, Putnik P. Functional foods: Product development, technological trends, efficacy testing, and safety. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2020;11:93-118.
387. Martirosyan D, Lampert T, Ekblad M. Classification and regulation of functional food proposed by the Functional Food Center. *Functional Food Science*. 2022;2(2):25-46.
388. Otunola GA, Martirosyan D. Choosing suitable food vehicles for functional food products. *Functional Foods in Health and Disease*. 2021;11(2):44-55.
389. Mesta Corral M, Gómez García R, Balagurusamy N, Torres León C, Hernández Almanza AY. Technological and nutritional aspects of bread production: An overview of current status and future challenges. *Foods*. 2024;13(13):2062.
390. Tolve R, Bianchi F, Lomuscio E, Sportiello L, Simonato B. Current advantages in the application of microencapsulation in functional bread development. *Foods*. 2023;12(1):96.
391. Delshadi R, Bahrami A, Tafti AG, Barba FJ, Williams LL. Micro and nano-encapsulation of vegetable and essential oils to develop functional food products with improved nutritional profiles. *Trends Food Sci Technol*. 2020;104:72-83.
392. Ezhilarasi PN, Indrani D, Jena BS, Anandharamakrishnan C. Microencapsulation of Garcinia fruit extract by spray drying and its effect on bread quality. *J Sci Food Agric*. 2014;94(6):1116-23.
393. Pasrija D, Ezhilarasi PN, Indrani D, Anandharamakrishnan C. Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality. *LWT*. 2015;64(1):289-96.
394. Rasti B, Erfanian A, Selamat J. Novel nanoliposomal encapsulated *omega*-3 fatty acids and their applications in food. *Food Chem*. 2017;230:690-6.
395. Zain MZM, Shori AB, Baba AS. Potential functional food ingredients in bread and their health benefits. *Biointerface Res Appl Chem*. 2022;12(5):6533-42.
396. Ktenioudaki A, Alvarez Jubete L, Gallagher E. A review of the process-induced changes in the phytochemical content of cereal grains: The breadmaking process. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;55(5):611-9.
397. Mollakhalili-meybodi N, Sheidaei Z, Khorshidian N, Nematollahi A, Khanniri E. Sensory attributes of wheat bread: A review of influential factors. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2023;17(3):2172-81.
398. Cioban C, Alexa E, Sumalan R, Merce I. Impact of packaging on bread physical and chemical properties. *Bulletin UASVM Agriculture*. 2010;67(2):212-7.
399. Dewettinck K, Van Bockstaele F, Kühne B, Van de Walle D, Courtens TM, Gellynck X. Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. *J Cereal Sci*. 2008;48(2):243-57.
400. Guiné RPF. Textural properties of bakery products: A review of instrumental and sensory evaluation studies. *Applied Sciences*. 2022;12(17):8628.
401. Nishinari K, Fang Y. Perception and measurement of food texture: Solid foods. *J Texture Stud*. 2018;49(2):160-201.
402. Boubaker M, Damergi C, Ben Marzouk C, Blecker C, Bouzouita N. Effect of artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-product on the quality and total phenol content of bread. *Mediterranean Journal of Chemistry*. 2016;5(5):548-53.
403. Pathare PB, Opara UL, Al-Said FAJ. Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review. *Food Bioproc Tech*. 2013;6(1):36-60.

404. Ly BCK, Dyer EB, Feig JL, Chien AL, Del Bino S. Research techniques made simple: Cutaneous colorimetry: A reliable technique for objective skin color measurement. *Journal of Investigative Dermatology*. 2020;140(1):3-12.
405. Angelino D, Cossu M, Marti A, Zanoletti M, Chiavaroli L, Brighenti F, y col. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in bread: A review. *Food Funct*. 2017;8(7):2368-93.
406. Angioloni A, Collar C. Polyphenol composition and “*in vitro*” antiradical activity of single and multi-grain breads. *J Cereal Sci*. 2011;53(1):90-6.
407. Colantuono A, Ferracane R, Vitaglione P. Potential bioaccessibility and functionality of polyphenols and cynaropicrin from breads enriched with artichoke stem. *Food Chem*. 2018;245:838-44.
408. Kozioł A, Środa-Pomianek K, Górniak A, Wikiera A, Cyprych K, Malik M. Structural determination of pectins by spectroscopy methods. *Coatings*. 2022;12(4):546.
409. Sponton OE, Perez AA, Osella C, Cuffia F, Fenoglio C, Piagentini A, y col. Squalene encapsulation by emulsification and freeze-drying process: Effects on bread fortification. *J Food Sci*. 2023;88(6):2523-35.
410. Rodríguez Arzuaga M, Piagentini AM. New antioxidant treatment with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) infusion for fresh-cut apples: Modeling, optimization, and acceptability. *Food Science and Technology International*. 2017;24(3):223-31.
411. Yousif A, Nhepera D, Johnson S. Influence of sorghum flour addition on flat bread *in vitro* starch digestibility, antioxidant capacity and consumer acceptability. *Food Chem*. 2012;134(2):880-7.
412. Ares G, Alcaire F, Antúnez L, Vidal L, Giménez A, Castura JC. Identification of drivers of (dis)liking based on dynamic sensory profiles: Comparison of Temporal Dominance of Sensations and Temporal Check-all-that-apply. *Food Res Int*. 2017;92:79-87.
413. Jakobek L, Ištuk J, Barron AR, Matić P. Bioactive phenolic compounds from apples during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion: Kinetics of their release. *Applied Sciences*. 2023;13(14):8434.
414. Rodríguez MS, Montero M, Staffolo M Dello, Martino M, Bevilacqua A, Albertengo L. Chitosan influence on glucose and calcium availability from yogurt: *In vitro* comparative study with plants fibre. *Carbohydr Polym*. 2008;74(4):797-801.
415. Liu T, Liu L. Fabrication and characterization of chitosan nanoemulsions loading thymol or thyme essential oil for the preservation of refrigerated pork. *Int J Biol Macromol*. 2020;162:1509-15.
416. Fonseca LM, Radünz M, dos Santos Hackbart HC, da Silva FT, Camargo TM, Bruni GP, y col. Electrospun potato starch nanofibers for thyme essential oil encapsulation: antioxidant activity and thermal resistance. *J Sci Food Agric*. 2020;100:4263-71.
417. Zhang M, Wang X. Egg white protein-soybean protein isolate hierarchical network hydrogel for enhanced adsorption of methylene blue. *Water (Basel)*. 2024;16(23):3357.
418. Wani KM, Uppaluri RVS. Characterization of pectin extracted from pomelo peel using pulsed ultrasound assisted extraction and acidic hot water extraction process. *Applied Food Research*. 2023;3(2):100345.
419. Chaib S, Benali N, Arhab R, Sadraoui Ajmi I, Bendaoued H, Romdhane M. Preparation of *Thymus vulgaris* essential oil microcapsules by complex coacervation and direct emulsion: Synthesis, characterization and controlled release properties. *Arab J Sci Eng*. 2021;46(6):5429-46.
420. Mohammadi F, Shiri A, Tahmouzi S, Mollakhalili Meybodi N, Nematollahi A. Application of inulin in bread: A review of technological properties and factors affecting its stability. *Food Sci Nutr*. 2023;11(2):639-50.
421. Petruzzzi L, Corbo MR, Sinigaglia M, Bevilacqua A. Microbial spoilage of foods: Fundamentals. En: *The Microbiological Quality of Food*. Foggia: Elsevier Ltd.; 2017. p. 1-21.
422. Awulachew MT. Bread deterioration and a way to use healthful methods. *CYTA - Journal of Food*. 2024;22(1):2424848.

- 
423. Sivam AS, Sun-Waterhouse D, Waterhouse GIN, Quek S, Perera CO. Physicochemical properties of bread dough and finished bread with added pectin fiber and phenolic antioxidants. *J Food Sci.* 2011;76(3):97-107.
424. Scappaticci G, Mercanti N, Pieracci Y, Ferrari C, Mangia R, Marianelli A, y col. Bread improvement with nutraceutical ingredients obtained from food by-products: Effect on quality and technological aspects. *Foods.* 2024;13(6):825.
425. Olakanmi SJ, Jayas DS, Paliwal J. Applications of imaging systems for the assessment of quality characteristics of bread and other baked goods: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2023;22(3):1817-38.
426. Wirkijowska A, Zarzycki P, Sobota A, Nawrocka A, Blicharz-Kania A, Andrejko D. The possibility of using by-products from the flaxseed industry for functional bread production. *LWT.* 2020;118:108860.
427. Melilli MG, Stefano V Di, Sciacca F, Pagliaro A, Bognanni R, Scandurra S, y col. Improvement of fatty acid profile in durum wheat breads supplemented with *Portulaca oleracea* L. quality traits of purslane-fortified bread. *Foods.* 2020;9(6):764.
428. Sciacca F, Palumbo M, Pagliaro A, Di Stefano V, Scandurra S, Virzi N, y col. *Opuntia cladodes* as functional ingredient in durum wheat bread: Rheological, sensory, and chemical characterization. *CYTA - Journal of Food.* 2021;19(1):96-104.
429. Wang R, Li M, Brennan MA, Dhital S, Kulasiri D, Brennan CS, y col. Complexation of starch and phenolic compounds during food processing and impacts on the release of phenolic compounds. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2023;22(4):3185-211.
430. Caputo L, Amato G, De Martino L, De Feo V, Nazzaro F. Anti-cholinesterase and anti- $\alpha$ -amylase activities and neuroprotective effects of carvacrol and *p*-cymene and their effects on hydrogen peroxide induced stress in SH-SY5Y cells. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7):6073.
431. Amato G, Caputo L, Francolino R, Martino M, De Feo V, De Martino L. *Origanum heracleoticum* essential oils: Chemical composition, phytotoxic and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities. *Plants.* 2023;12(4):866.