

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Farmacia



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE UN AOVE RICO EN POLIFENOLES Y SU UTILIZACIÓN EN FORMULAS NUTRICOSMÉTICA

Autor: Camille Angélique PAYET

Villaviciosa de Odón, 14 de junio de 2025

RESUMEN	2
1. Introducción	3
1.1 Aceite de Oliva	3
1.2 Equilibrio redox	6
1.3 Beneficios para la salud de los polifenoles.....	8
2 Objetivos	9
2.1 Objetivos principales	9
3 Materiales y Métodos	10
3.1 Muestras de AOVE.....	10
3.2 Caracterización de estrés oxidativo	10
3.3 Determinación de capacidad antioxidante	11
3.4 Formulación	11
3.5 Ensayos	13
4 Resultados y Discusión	13
4.1 Caracterización del estrés oxidativo y Determinación de la capacidad antioxidante ..	13
4.2 Formulación	15
4.3 Ensayos	19
5 Conclusiones	23
6 Bibliografía	25
7 Anexos	31
7.1 Anexo 1. Resultado del ensayo de rotura de las encapsulaciones de Alginato Sódico..	31
7.2 Anexo 2. Cromatogramas de los ensayos de disolución del gel con las encapsulaciones de Alginato.....	32
7.3 Anexo 3: Resultados de los ensayos microbiológicos de las formulaciones nutricosmética	34

RESUMEN

El Aceite de Oliva Extra Virgen (AOVE), es un pilar fundamental en la dieta mediterránea. Los descubrimientos sobre su alto poder antioxidante le propulsan con productos clave en la salud de la población y resulta interesante su investigación como suplemento. Este Trabajo de Fin de Grado tiene como objetivo elaborar formulaciones nutricosméticas y evaluar la capacidad antioxidante de un AOVE rico en polifenoles.

Para ello se ha elaborado dos formulaciones, un gel con encapsulación de Alginato Sódico y unas gominolas. Ambas se componen del extracto de Hidroxitirosol (HT) y Oleuropeína (OLE). Se ha realizado ensayos de producción de estrés oxidativo y de determinación de la capacidad antioxidante. La metodología utilizada ha sido cultivo celular de células 3T3, en contacto con hidroperóxido de tert-butilo (t-BuOOH) y posterior cuantificación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) por fluorescencia con la sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA). Por otra parte, se ensayó la liberación de HT y OLE, la estabilidad microbiológica y las características organolépticas de ambas formulaciones.

Se concluye que la formulación con extracto polifenólico es posible tecnológicamente aunque suponga mejora en cuanto a elaboración. Asimismo, no se pudo caracterizar los efectos antioxidantes del HT y de la OLE y tampoco se pudo obtener ensayos de liberación. Finalmente, las dos formulaciones realizadas no se pueden considerar estables al nivel microbiológico.

Palabras clave: oxidative stress, antioxidants, AOVE, olea europea, polyphenols, hydroxytyrosol, oleuropein, nutricosmetics formulation.

1. Introducción

1.1 Aceite de Oliva

El aceite de Oliva (AO) es un pilar fundamental en la dieta mediterránea y con el avance y el descubrimiento de las ventajas de esa dieta, su consumo es cada vez mayor. El AO proviene de la extracción del fruto del árbol *Olea europaea L.*

El aceite de Oliva, es el único alimento que tiene una descripción y clasificación descrita, con protocolos de clasificación elaborados por la legislación europea (1). Gracias a esta legislación, se pueden destacar las definiciones siguientes:

- **Aceite de Oliva:** “aceite obtenido únicamente del fruto del olivo (*Olea europaea L.*), con exclusión de los aceites obtenidos por disolventes o procesos de re-esterificación” (2),
- **Aceite de Oliva Virgen (AOV):** “aceite obtenido del fruto del olivo por procedimientos mecánicos o físicos, en condiciones especiales que no produzcan la alteración del aceite y que no haya sufrido ningún tratamiento distinto al lavado, la decantación, el centrifugado y la filtración” (2),
- **Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE):** “aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresada en ácido oleico que no sea superior a 0,8 g por 100 g de aceite” (2).

1.1.1 Demografía

El aceite de Oliva proviene del extracto del olivo del árbol *Olea europaea L.* A día de hoy el olivo tiene una clasificación botánica muy elaborada.

Tabla 1. Clasificación botánica de *Olea europaea L.* elaboración basada en (3)

Filo	<i>Magnoliophytina</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Scrophulariales</i>
Familia	<i>Oleaceae</i>
Género	<i>Olea L.</i>
Especie	<i>Olea europaea L.</i>

Gracias a su nombre, se deduce su demografía; Europa. Cabe destacar que, en el pasado se podía encontrar en varias partes del mundo, como Asia, África e incluso Estados Unidos, pero en la actualidad su principal área de distribución es la cuenca mediterránea, lo que impulsa a los países como España, Italia y Grecia como productores mayoritarios (3,4).

1.1.2 Producción del Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE)

Para llegar al producto final, el AOVE, se parte de las aceitunas que luego sufren un par de transformaciones. Las etapas más importantes son la trituración de las aceitunas y la separación del aceite de la pulpa del fruto (5). Primero se recolectan las aceitunas, se limpian y se separan las posibles ramas y hojas que pueden estar presentes. En segundo, se trituran estas aceitunas con el hueso. A este derivado se le denomina alperujo. Este proceso debe de hacerse en frío para proteger las características organolépticas y nutricionales del aceite. Luego, se extrae el aceite, separando el aceite del alperujo. Este proceso se tiene que hacer en frío y sin productos químicos para preservar la denominación AOVE. Finalmente, se filtra para eliminar las últimas impurezas y se deja decantar. El almacenamiento es muy importante para preservar todos los beneficios del AOVE intactos, por ello es imprescindible guardarlo en envases de acero inoxidable, en oscuridad y con un control riguroso de las temperaturas y humedad (6).

1.1.3 Composición general

Respecto a la composición, se pueden destacar 2 tipos de compuestos, una parte mayoritaria que serían los triglicéridos, con el 98-99% del peso total del AOVE, y una minoritaria que son los compuestos volátiles, presente entre el 1-2% del peso total del AOVE (4). La parte mayoritaria, los triglicéridos, está compuesta con un elevado porcentaje de ácidos grasos, más precisamente ácidos grasos monoinsaturados (AGMI). Dentro de estos AGMI el mayoritario es el ácido oleico (C18:1), que puede variar entre el 70-85% de su composición, también con composición similares están el ácido linoleico y el palmitoleico. Por otra parte, están los ácidos grasos saturados (AGS), que suponen un 14% de la composición total. El ácido esteárico y palmítico representan los de mayor contenido (6). Respecto a la parte minoritaria, los compuestos más representativos son los compuestos fenólicos y el α -tocoferol, la vitamina E. Los polifenoles son componentes que determinan la calidad del AOVE, dado que definen las características organolépticas del aceite, como pueden ser el aroma y el sabor (6). Aunque se destacan varios tipos del aceite de oliva, la composición de esta suele ser parecida, pero es cierto que existen diferencias, debido mayoritariamente a su método de extracción (5). También se tiene en cuenta la zona de cultivo, el grado de madurez del fruto, los factores climáticos, la infestación por *Bactrocera oleae*, el método de recolección y las condiciones de almacenamiento antes del proceso de molturación (1). *Bactrocera oleae* es una mosca, muy prevalente en regiones de cultivo del olivo, cuya presencia afecta a la calidad de este. La contaminación del olivo por esta mosca, lleva a la destrucción de la pulpa del olivo debido a que las larvas de la mosca necesitan desarrollarse dentro del fruto (7). La presencia de este

insecto puede llegar a reducir la cantidad de aldehídos y aumentar la cantidad de alcoholes en el producto final, lo que modifica las características organolépticas del producto (1).

1.1.4 Polifenoles

Los polifenoles son un grupo muy extenso de moléculas, y atendiendo a su origen pueden ser naturales, sintéticos o semisintéticos. Son estructuras ampliamente distribuidas en especies de origen vegetal (5). Se ha documentado la presencia de compuestos fenólicos en el AOVE, identificando más de 30 compuestos diferentes. Entre ellos se encuentran los ácidos fenólicos, como el ácido hidroxibenzoico o el p-Cumérico, los flavonoides, los lignanos, los isochromanos, los secoiridoides y los alcoholes fenólicos (6). Las concentraciones de polifenoles totales en el AOVE suelen oscilar entre 50 y 1000 mg/kg (4). De todos ellos, el que se encuentran en más cantidad es el Hidroxitirosol (HT). El HT es un polifenol anfipático, con denominación química; 4-(2-hydroxyethyl)benzene-1,2-diol. Su origen proviene de la hidrólisis de la Oleuropeína (OLE). Durante la maduración y el almacenamiento del aceite, se produce la transformación de la OLE en HT, que consiste en 2 pasos, ver Figura 1. El primero es la transferencia del grupo glicosilo de la molécula OLE, para llegar a la molécula aglicona de OLE. La segunda etapa es la hidrolisis de esa molécula en HT y ácido elenólico (8). La concentración de HT es muy variable, puesto que depende de varios parámetros como la especie, el método de extracción, el método de almacenamiento y conservación. Por este motivo, sus datos se encuentran en rangos de concentración y no en parámetros fijos. En el AOVE se encuentra entre 3,5 y 7,7 mg/100g de HT, y 0,17 mg/100g para la OLE (9).

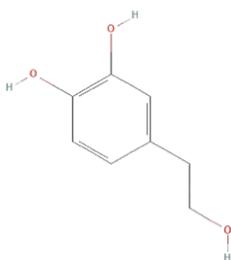


Ilustración 1. Estructura del Hidroxitirosol.

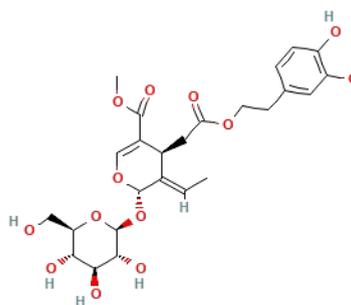


Ilustración 2. Estructura de la Oleuropeína

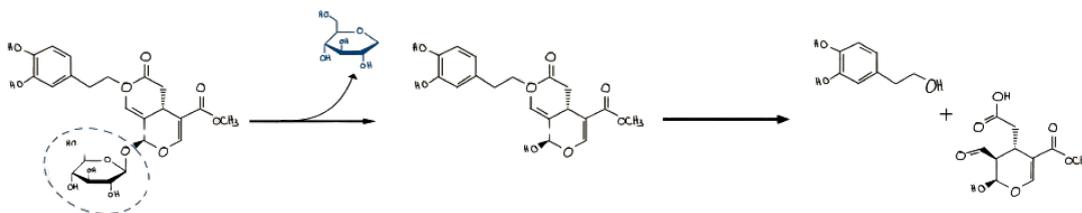


Figura 1. Reacción de Hidrolisis de la OLE. Elaboración propia, inspirada de (4)

1.1.5 Farmacocinética de HT

Como todas las moléculas que entran en el cuerpo humano, el HT sufre el proceso de metabolización, pasando por todas las etapas del proceso ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción). El HT se absorbe mayoritariamente en el intestino con una alta tasa metabólica intestinal y hepática. En cuanto a distribución, HT alcanza su concentración plasmática máxima en 7 minutos después de su administración oral, se distribuye con facilidad llegando a tejidos como musculo y cerebro. El metabolismo del HT es muy sencillo, se compone mayoritariamente de dos procesos; una oxidación y una metilación. Y por fin su excreción, la mayoritaria es por los riñones. Para la completa eliminación del HT el cuerpo humano tarda en más o menos 6 horas (8).

1.2 **Equilibrio redox**

El organismo humano se balancea entre reacciones de metabolismo y reacciones de anabolismo, creando una homeostasia que se intenta mantener a lo largo de la vida. Un proceso de metabolismo importante es el estado redox de las células. Este se basa en reacciones de oxidación y reducción, dando lugar a estados termodinámicos a veces inestables. Esta inestabilidad en los metabolismos, llega a generar especies nocivas para el organismo, las especies reactivas (10).

1.2.1 Las Especies Reactivas

Estas moléculas se denominan así porque son altamente reactivas al medio. Esto quiere decir que modifican el estado de oxidación y reducción de las estructuras con las que interaccionen, pudiendo generar cambios en ellas. Estas especies reactivas pueden ser de varios tipos: los radicales libres y las sustancias no radicales. Los radicales más estudiados son las Especies Reactivas del Oxígeno (ERO), debido a su alta tasa metabólica en el organismo (10). Sin embargo, también existen las Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN), que tienen un papel importante en el estado redox de las células. Los radicales libres son elementos químicos que tienen como característica principal electrones desapareados, caracterizando así una inestabilidad electroquímica que tienden a corregir con los elementos que se encuentran a su

alrededor (11). Así, diversos estudios señalan al peróxido de hidrogeno, el superóxido, el oxígeno singlete y el radical hidroxilo como las moléculas más reactivas presentes en el organismo (12). Las ERN, son sintetizadas a partir del óxido nítrico endógeno, de dos maneras diferentes; debido al metabolismo enzimático de la L-arginina, el oxígeno y el NADPH y por otra parte puede ser secretado por los fagocitos (12). Las ERN y ERO se generan por dos fuentes; las endógenas y las exógenas (13).

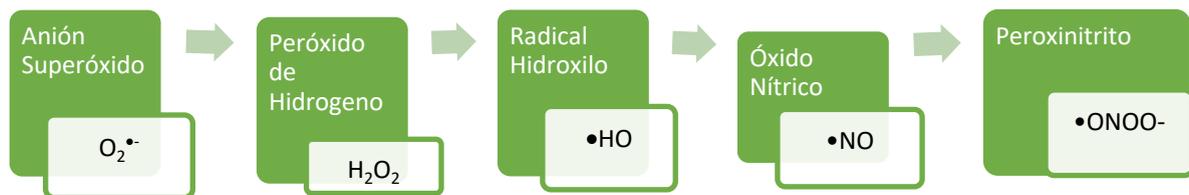


Ilustración 3. ERO y ERN mayoritarias, elaboración propia.

Para que se generen las ERO endógenos, tiene que sucederse varias etapas de manera secuencial. En primer lugar, se produce la fuga de electrones desde la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. Luego, los electrones se unen al oxígeno molecular para formar la primera especie reactiva, el anión superóxido. Posteriormente, la mayor parte del superóxido se dismuta en el peróxido de hidrogeno gracias a la enzima, superóxido dismutasa (SOD). Esta etapa define el estado de la célula en cuanto a señales de oxidación, ya que la tasa de producción del H_2O_2 establece el estado redox de la célula. En segundo lugar, el peróxido de hidrogeno es transformado por múltiples enzimas de manera a formar agua, con metales para formar los radicales hidroxilos. Finalmente, los radicales hidroxilos, oxidantes muy potentes, son las fuentes de varias vías de daño celular, como la oxidación lipídica y la formación de las ERN (13,14). Igualmente, existe un segundo mecanismo de formación de las ERO y ERN, el ciclo catalítico del citocromo mitocondrial. Aunque este conjunto de reacciones metabólicas sea menos frecuente, sigue siendo una ruta en la cual se produce las ROS y ERN. En gran parte se basa en la oxidación de compuestos orgánicos como los lípidos o los esteroides (15). Respecto a la generación de ROS exógenos estas provienen de factores exteriores, como pueden ser el aire, la contaminación, el alcohol y el tabaco e incluso algunos fármacos, por ejemplo; el tacrolimus o las ciclosporinas (13).

1.2.2 El Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se puede definir como un balance incorrecto entre las especies ERO y ERN y el organismo a favor de las especies oxidantes. En este sentido, cuando existe un alto contenido en partículas ERO/ERN y una ausencia de agentes protectores, se genera daño en el organismo. Ese daño puede ser a diferente nivel, de diferente grado, e implicando diferentes

estructuras, creando una amplia gama de posibles patologías. Las patologías desencadenadas pueden ser principalmente enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares y patologías inflamatorias (12). Estas patologías se producen debido a que las especies ERO y ERN, en altas concentraciones, son promotores de sustancias relacionadas con la inflamación. Así, este alto contenido en señales de inflamación puede llegar a dañar las macromoléculas como los lípidos o las proteínas, desencadenando daño celular por estrés oxidativo e incluso muerte celular (16).

1.2.3 Los antioxidantes

El término antioxidante hace alusión a cualquier compuesto que, al estar en una concentración inferior a la de un sustrato oxidable, tiene la capacidad de posponer o evitar la oxidación de dicho sustrato. Los antioxidantes tienen como función disminuir los parámetros de daño celular como el estrés oxidativo, las mutaciones de ADN o los procesos cancerígenos (12). Existen dos tipos de antioxidantes; los enzimáticos y los no enzimáticos y se presentan en los compartimentos acuosos y las membranas de las células. Los antioxidantes enzimáticos están presentes en el organismo de manera fisiológica y actúan desde el principio en la cadena de formación de las ERO y ERN para disminuir sus tasas de formación. De este modo, favorecen la homeostasis del estado redox de la célula. Por otro lado, se encuentran los antioxidantes no enzimáticos, que son aportados mayoritariamente por la dieta, siendo los antioxidantes no enzimáticos más conocidos la vitamina C o los carotenoides. Sin embargo, el descubrimiento de los beneficios de la dieta mediterránea ha puesto de manifiesto el poder antioxidante de los polifenoles (17).

1.3 Beneficios para la salud de los polifenoles

Los polifenoles son antioxidantes potentes y por ello tienen muchas ventajas por la salud. Estos actúan de varias maneras y eso permite su amplio espectro de actuación. Se destacan sus ventajas sobre diferentes enfermedades como: enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), enfermedades neurodegenerativas y el cáncer. Las enfermedades cardiovasculares son de alta prevalencia en nuestra sociedad y con el descubrimiento de los poderes de la dieta mediterránea se han valorizado mucho los beneficios de la ingesta de los polifenoles. Esto es debido a que los polifenoles actúan como agentes protectores en parámetros importantes en la salud cardiovascular. El mecanismo protector mayoritario de los polifenoles es su papel clave. Por otro lado, se ha demostrado la eficacia de emplear polifenoles en alternaciones metabólicas, como en la DM2. La DM2, provoca elevaciones de glucosa en sangre debido a un mal funcionamiento de las células secretoras de insulina beta pancreáticas y a una

resistencia celular a esta insulina. Como consecuencia, la hiperglucemia prolongada genera auto-oxidación de las células así como alta producción de ERO. En este sentido los antioxidantes actúan redirigiendo el equilibrio de oxidación/reducción (15,16). Por otro lado, los polifenoles pueden tener un papel beneficioso en los trastornos neurodegenerativos, que dependen de la edad, y a su vez del envejecimiento celular. En la mayoría de los casos, son trastornos que son dependientes de la inflamación. En este punto actúan los polifenoles, reduciendo la formación y el estado de inflamación de las células. Esto permite mejoras en el comportamiento cognitivo y en la coordinación motora de los pacientes con patologías como Alzheimer o la enfermedad de Huntington (16). Por último, es importante destacar el papel protector de los polifenoles en los procesos carcinogénicos. El cáncer y la inflamación son dos procesos que se encuentran muy ligados, ya que un exceso de factores inflamatorios puede favorecer la aparición de procesos cancerosos. Las ERO tienen un papel muy importante en la producción de factores y moléculas inflamatorias. A día de hoy no se conoce exactamente cómo actúan los polifenoles para disminuir esta producción de sustancias proinflamatorias descontrolada, pero es cierto que algunos autores relacionan su actividad disminuyendo el factor $TNF\alpha$ y la interleuquina $IL-1\beta$, moléculas relacionadas con la inflamación (13,18,19). En ese mismo sentido, es cierto que la dieta mediterránea aporta los beneficios relatados anteriormente, pero la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomienda que, para percibir una mejoría en los beneficios de los polifenoles, es recomendable adquirirlos a base de la inclusión de suplementos nutricionales (20). El impacto de suplementos por vía oral a base de los polifenoles, beneficia sobre todo al nivel cardiovascular (21). Asimismo, estudios recientes indican que estos polifenoles favorecen la fotoprotección de la piel (22). En este sentido, se genera la importancia de desarrollar formulaciones nutricosméticas para favorecer el consumo de polifenoles por una vía de administración sencilla (23).

Debido a las propiedades beneficiosas de estos polifenoles, este trabajo se enfoca en elaborar formulaciones nutricosméticas que permitan vehiculizar polifenoles presentes en el AOVE, así como evaluar la capacidad antioxidante de los mismos.

2 Objetivos

2.1 Objetivos principales

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado es elaborar formulaciones nutricosméticas de administración oral, así como evaluar la capacidad antioxidante de un extracto de AOVE que irá incluido dentro de las formulaciones. Para alcanzar este objetivo

principal se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Elaborar dos formulaciones nutricosméticas a partir de un extracto de AOVE: un gel que contenga perlas de alginato y unas gominolas.
- Realizar ensayos de estabilidad microbiológica.
- Evaluar la capacidad de disolución de las formulaciones.
- Evaluar la capacidad antioxidante de un extracto de AOVE.
- Alinear los resultados obtenidos en este trabajo con los objetivos de desarrollo sostenible 3, de salud y bienestar, 12, de producción y consumo responsable y 9, de industria, innovación e infraestructura.

3 Materiales y Métodos

3.1 Muestras de AOVE

Las muestras de AOVE proceden de un aceite que se comercializa en el mercado español con un contenido alto en polifenoles. La extracción del principio activo se hace por el método de extracción líquido-líquido según los métodos usados en bibliografía existente (24). Los disolventes usados son una disolución Metanol:Agua al 80:20 (v/v) y posteriormente se realizan lavados con hexano puro para retirar la fase orgánica. Este extracto de polifenoles contenidos en la mezcla de Metanol:Agua se somete a un proceso de evaporación rotativa por el rotavapor y posteriormente se liofiliza con el objetivo de obtener un polvo concentrado. Este polvo se disuelve en volumen suficiente de agua, resultando en un extracto de concentración 15mg/mL. La cuantificación del HT y de OLE se realiza por HPLC.

3.2 Caracterización de estrés oxidativo

3.2.1 Células 3T3 NH y Cultivo

Como parte del ensayo de caracterización de estrés oxidativo, se usó las células 3T3NH1. Estas células adherentes son derivadas de los fibroblastos de ratón suizo. Los fibroblastos son células que se encuentran en múltiples partes del organismo y son capaces de sintetizar muchas moléculas importantes tanto para la piel como para el sistema inmune. Para el cultivo de estas, se usa como medio DMEM enriquecido al 10% con suero bovino fetal (FBS), 1% de glutamina y 1% Penicilina/Estreptomina. El protocolo para su crecimiento, así como la realización de los pases celulares son similares a los descritos en estudios previos (25,26).

3.2.2 Generación de estrés oxidativo

Con el objetivo de generar estrés oxidativo a las células, se incorpora el hidropéroxido de tert-

butilo (t-BuOOH). El t-BuOOH, es un tóxico ambiental activo, que favorece la formación de las ERO. El t-BuOOH induce la formación de estrés oxidativo ya que implica la generación de ERO, y como consecuencia el daño de proteínas, ácidos nucleicos y membranas celulares. Además, también promueve la peroxidación de lipídica, la citotoxicidad y la apoptosis (27). Como se ha demostrado en trabajos previos (28,29), la concentración de t-BuOOH de 50 μ molar es efectiva para demostrar la producción de estrés oxidativo en células 3T3, por lo que se usó esta concentración en el ensayo.

3.2.3 Preparación de las alícuotas antioxidantes

El experimento antioxidante se llevó a cabo en condiciones estériles en una cabina de flujo laminar. El extracto polifenólico obtenido, con una concentración inicial de 15 mg/ml, se filtró a través de una jeringa estéril y se realizaron tres diluciones seriadas 1:2 (alta, media y baja) en PBS estéril. Posteriormente, estas diluciones se añadieron a los pocillos de una placa p96 previamente sembrada con 24 horas de anterioridad con células 3T3NH. Para desarrollar el ensayo se siguió el protocolo siguiente. A la placa p96 se le añade el extracto de diferentes concentraciones para dejarlas en cultivo durante 18 horas. Luego, con el objetivo de generar el estrés oxidativo se añade el t-BuOOH y se deja actuar durante 4 horas. Posteriormente se añade la sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) siguiendo protocolos previos. Finalmente, se fija las células con paraformaldehído 0,5%. Y se leen en el citómetro.

3.3 Determinación de capacidad antioxidante

3.3.1 Cuantificación por fluorescencia

En cuanto a la determinación de la capacidad antioxidante, las medidas se realizan por fluorescencia. Para medirla, se emplea la sonda DCFH-DA, útil para la cuantificación de las especies redox. El experimento funciona sobre el mecanismo siguiente: las especies redox presente en la célula oxidan al 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) a su forma fluorescente, la 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que es detectada por el citómetro (30). Para la cuantificación por citometría de flujo se suspenden las células en paraformaldehído 0,5% y evalúa su fluorescencia en el citómetro BD Accuri C6, y posteriormente los datos se analizan con el software FlowJo®.

3.4 Formulación

3.4.1 Encapsulación del HT en alginato sódico

Para realizar las encapsulaciones de HT en Alginato Sódico se necesita, una disolución de

Alginato Sódico, una disolución de Cloruro Cálcico y el extracto polifenólico. Siguiendo estudios previos (31), la elección de la concentración de las dos disoluciones depende del tamaño y forma de microesferas queridas. Se emplea una solución de Alginato Sódico al 2% (p/v) y una solución de Cloruro Cálcico 0,2M. Para la elaboración de esta formulación se usa: un agitador magnético, una placa calefactora, una báscula, una jeringa con aguja, tres vasos de precipitados de 100mL, un filtro de pliegues y un embudo. Se prepara las dos disoluciones, se aparta 25mL del Cloruro Cálcico, se mide 5 mL del Alginato Sódico y se añade el extracto polifenólico. Las microesferas se realizan por método de extrusión (31).

3.4.2 Gel con perlas de alginato

Esta formulación tiene como objetivo vehiculizar las encapsulaciones de alginato. Se toma como referencia el método descrito en publicaciones previas (32,33), empleando Carboximetilcelulosa (CMC), Glicerol, el extracto polifenólico y agua. En cuanto a materiales, se usa una placa calefactora, una varilla, una báscula, un vidrio de reloj y un vaso de precipitado de 50mL. Para realizar el gel se pone a calentar por un lado el agua, y por otro se mezcla el Glicerol con la CMC hasta que se obtenga una mezcla homogénea. Se añade esta mezcla al agua calentada, se deja enfriar. Una vez frío se añade las microesferas de alginato (32).

3.4.3 Gominolas

Las gominolas son muy estudiadas y existe mucha variedad de composición y protocolos. Trabajos previos (34,35), usan de manera genérica gelatina, un acidificante y agua. En ese estudio se usa Gelatina, Sacarosa, ácido cítrico, almidón, el extracto polifenólico y agua. Una vez pesados todos los componentes, se pulveriza en el mortero la sacarosa y se pone a calentar el agua. Una vez caliente, se añade la sacarosa y se remueve hasta la disolución completa. Se pulveriza la gelatina y luego se añade a la mezcla anterior. Se calienta esta mezcla a 60°C con agitación constante, hasta que se disuelve completamente la gelatina de manera que se obtiene una solución clara y transparente. Con los mismos parámetros de temperatura y agitación se incorpora el almidón a la mezcla. Una vez disuelto el almidón, se espera que se enfríe a temperatura ambiente. Se agrega el extracto polifenólico y el ácido cítrico, y una vez homogénea, la mezcla se vierte en los moldes y se deja formar la estructura polimérica al aire libre. Posteriormente se deja estabilizar durante 24 horas en nevera, aunque después la conservación se hará a temperatura ambiente. Todas las muestras realizadas serán analizadas en función de sus características organolépticas considerando textura, aspecto, color y adhesividad, basándose en previos estudios (35,36).

3.5 Ensayos

3.5.1 Ensayos de disolución

La realización de ensayos de disolución, se sigue las recomendaciones de la Real Farmacopea Española, ya que es ella que rige todas las normas de calidad de las sustancias (37). Se emplea para este ensayo el aparato de paleta con los siguientes medios uno que simula el entorno intestinal y otro que simula el entorno gástrico. Antes de empezar con el ensayo, se rellena los cestillos con el medio y se configura la temperatura, a $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y la velocidad de las palas. Una vez se encuentran las condiciones establecidas, se coloca una unidad de la formulación por cestillo, evitando burbujas y se pone en marcha el estudio, siguiendo el protocolo del ensayo 2.9.5 RFE (37). Para evaluar la disolución, se extrae una muestra de 1mL a cada tiempo de estudio. Cada vez que se extrae una muestra se tiene que reponer medio a los cestillos, la misma cantidad que la extraída, para conservar la concentración del medio de disolución estable. Para el análisis, la muestra se filtra a través de un poro de $4,5\mu\text{m}$ y se cuantifica por HPLC.

3.5.2 Ensayos microbiológicos

Los ensayos microbiológicos se realicen usando diferentes medios para poder cultivar una amplia gama de microorganismos, basándose en estudios previos (38). Se cultivan las diferentes muestras en placas de agar sangre y en placas de agar Müller-Hinton. La siembra de las placas se realiza inoculando en la placa 0,1mL de cada muestra, y se deja incubar 24 horas a temperatura entre 35° - 37°C . Luego se observa si hay crecimiento o no, a las 24 horas y a las 72 horas.

4 Resultados y Discusión

4.1 Caracterización del estrés oxidativo y Determinación de la capacidad antioxidante

Antes de la adición de la sonda, se evaluó a nivel microscópico el estado de las células tras el tiempo de incubación. En la Ilustración 4, se puede observar en el microscopio invertido el comportamiento de las células 3T3 con el extracto polifenólico antes de tratarla con la sonda. Se aprecia que a concentración alta del extracto casi la totalidad de las células están muertas. Sin embargo, si se compara con la concentración baja, no se aprecia mucha diferencia puesto que a esta concentración también las células están muertas.

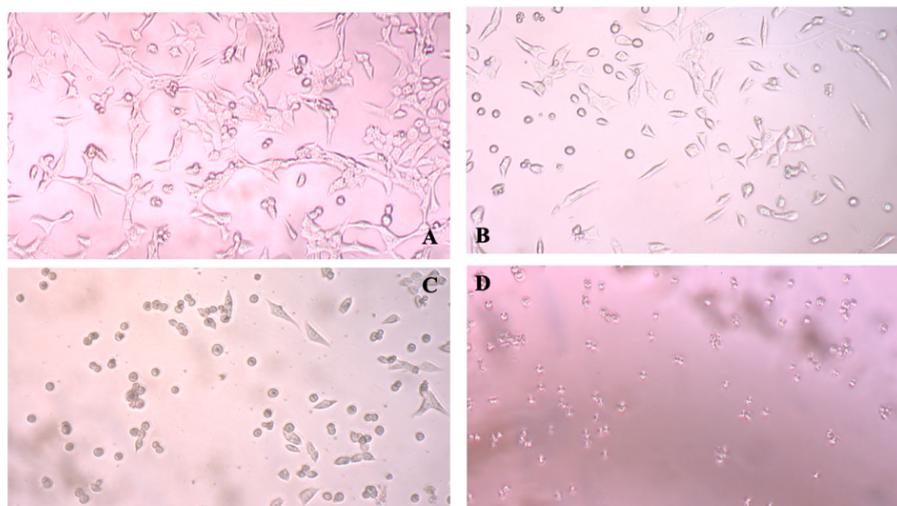


Ilustración 4. Imagen de microscopio del cultivo celular 3T3 y el extracto PF del AOVE a diferentes concentraciones. (A): control células sin extracto PF. (B): células con baja concentración del extracto PF. (C): células con concentración intermedia de extracto PF. (D): células con alta concentración del extracto PF.

En la Ilustración 5, se puede observar cómo han reaccionado las células una vez en contacto con el t-BuOOH. Se aprecia que en la foto A, el control, todas las células aparecen muertas, debido al poder oxidativo del t-BuOOH. En cuanto a los resultados obtenidos cuando se combinan el t-BuOOH y el extracto, se presentan en la imagen B, C y D. Los resultados son los siguientes: a dosis baja del extracto las células están muertas, al igual que con la dosis alta. Se destaca un resultado diferente con la imagen C, a concentración intermedia, hay una mezcla de células vivas y otras muertas. Viendo los resultados de la caracterización del estrés, no fue posible leer las células con la sonda DCFH-DA. Esto se debe a que las células tienen que estar vivas para poder generar la reacción y poder emitir el marcador fluorescente.

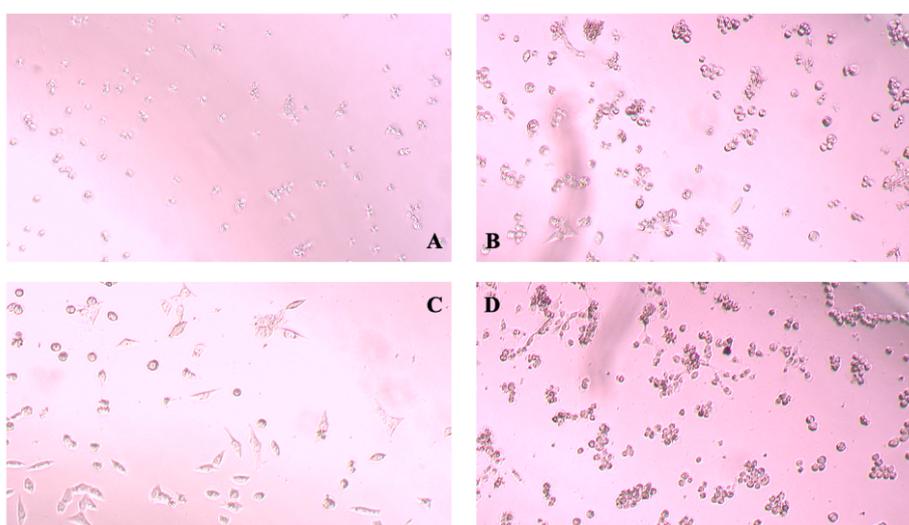


Ilustración 5. Imagen al microscopio del resultado del ensayo oxidativo celular con células 3T3. (A): Células tratadas con t-BuOOH 50 μ molar. (B): Células tratadas con t-BuOOH 50 μ molar y la alta baja del extracto de AOVE. (C): Células tratadas con t-BuOOH 50 μ molar y la dosis intermedia del extracto de AOVE. (D) Células tratadas con t-BuOOH 50 μ molar y la dosis baja del extracto de AOVE.

En conjunto los resultados sugieren que, el t-BuOOH genera estrés oxidativo hasta conducir a muerte celular en la mayoría de la población celular. Estos hallazgos preparan la base para discutir el efecto del extracto polifenólico, donde el tratamiento con el extracto polifenólico no fue el esperado en la hipótesis inicial, ya que no se puede apreciar viabilidad celular en las muestras tratadas. Una posible explicación de estos resultados es que los compuestos fenólicos presente en el extracto se muestran tan concentrados que, en vez de actuar como protector del daño oxidativo actúa al contrario como pro-oxidante. Estos resultados están en concordancia con trabajos previos, (39,40), que tratan del efecto dual de los compuestos fenólicos a dosis altas e incluso a la hora de combinarlos con alimentos. Otra explicación puede derivarse a causa de problemas en el protocolo de extracción. En este proceso, la extracción se realiza con Metanol, que es tóxico para las células, y se puede valorar la posibilidad de que queden cantidades relativas en el extracto. Estudios previos (41,42), demuestran la citotoxicidad e incluso el efecto pro-oxidante del metanol en células incluso en cantidades micro molares. Estos resultados ofrecen líneas de investigación en la mejora de los protocolos de extracción y purificación de los polifenoles.

4.2 Formulación

4.2.1 Composición en polifenoles de las formulaciones

Con el fin de ejecutar correctamente todas las formulaciones de este trabajo era importante conocer la presencia de compuestos polifenólicos del extracto, así como su composición. Por este motivo, se realizó un cromatograma del extracto polifenólico, representado en la Figura 2. Se puede observar un pico a los 23 minutos que correspondería a la OLE. Así como un pico a 11 min, que se corresponde con el HT, según los tiempos de retención por la columna de extracción reflejados en estudios previos (43). Alrededor de los 35min, se registran varios picos que se podría pensar, teniendo en cuenta su polaridad, que podría corresponderse a una mezcla de polifenol que no han sido caracterizados.

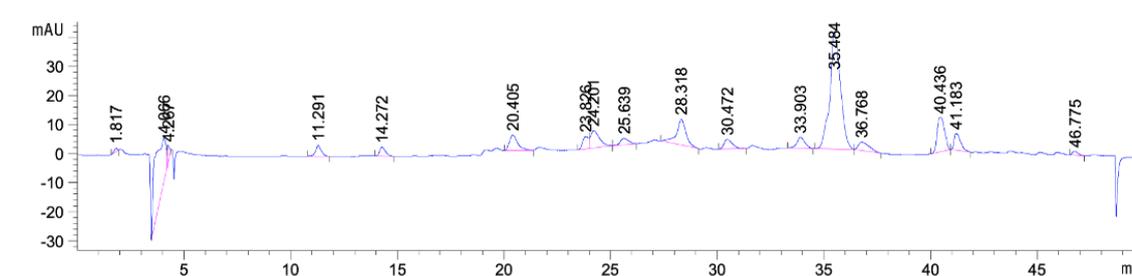


Figura 2. Cromatograma del estándar de HT y OLE.

La concentración final del extracto era de 15 mg/mL. La concentración de polifebol obtenida es muy baja, una explicación a este resultado podría ser el método de extracción usado, que podría no ser el más adecuado. Otros autores sugieren métodos de extracción más eficientes (44), pero que incluyen compuestos tóxicos o difíciles de eliminar (24).

4.2.2 Gel con encapsulación de alginato sódico

La Ilustración 6 muestra el resultado de las primeras encapsulaciones de Alginato Sódico que se realizaron, donde se puede ver que las esferas no son uniformes y que tienden más a formar una forma de gota que esférica. El tamaño de la partícula es bastante grande. En la Ilustración 7, se contempla que las partículas tienen un tamaño más pequeño, las formas esféricas son más uniformes y se nota una mayor cantidad de encapsulación. También se nota que la solución de Cloruro Cálculo es más coloreada que en la Ilustración 6. El cambio de tamaño en las esferas es debido a que las esferas realizadas en la Ilustración 7 se hicieron con una aguja 21G y también que en vez de un volumen total de Cloruro Cálculo de 25mL se cogió 60mL. Los resultados obtenidos muestran una mejora en las características físicas con la adición de la aguja y el aumento del volumen de la solución. Estudios previos (31,45), definen que el aumento del volumen de Cloruro Cálculo favorece la formación de las esferas ya que dependen de la concentración del ion Ca^{2+} disponible. Con el objetivo de favorecer aún más la formulación, se podría realizar ensayos de eficacia de encapsulación del principio activo, ya que se puede considerar la pérdida de polifenoles, observando la coloración presente en el Cloruro Cálculo debido a los colorantes alimentarios que se emplearon para visualizar la encapsulación.

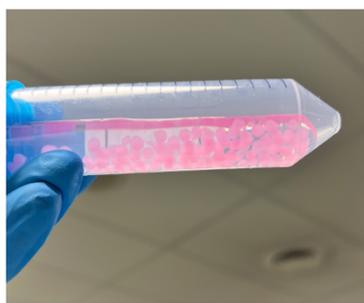


Ilustración 6. Primeras encapsulaciones realizadas

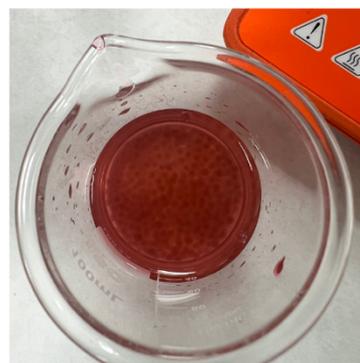


Ilustración 7. Encapsulación después de cambio en protocolo

Para la realización del vehículo de las encapsulaciones de alginato, se realiza un gel con consistencia “miel”. Con el objetivo de obtener la consistencia deseada se testaron diferentes composiciones, ver la Tabla 2. La composición que mejor correspondía a la consistencia deseada a era la prueba 3. La composición 3 fue la más adecuada, ya que su composición en

CMC es mayor y que la CMC es el ingrediente clave para conseguir la textura ideal. La CMC es un producto muy usado en la industria farmacéutica por su poder espesante y estabilizante. En concentraciones superiores al 1% actúa como gelificante, lo que supone una consistencia más viscosa.

Tabla 2. Composición del Gel

Composición del Gel			
Componentes	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
CMC	0,50%	0,75%	1%
Glicerol	15%	15%	15%
Extracto	0,50%	0,50%	0,50%
H₂O	84,0%	83,8%	83,50%
Total	100%	100%	100%

4.2.3 Gominolas

Para la elaboración de las gominolas, se ensayaron varias composiciones, como precisa la Tabla 3. Con el objetivo de elegir la que mejor correspondía con las características organolépticas deseadas se desarrolla en Tabla 4. La prueba 1 fue descartada ya que contenía cristales de sacarosa en su forma final y la consistencia era demasiada gomosa y pegajosa. Por este motivo, se redujo el contenido en sacarosa en la prueba 2 y se aumentó el contenido en gelatina. El resultado obtenido mejoró en aspecto, pero no tanto en textura. La prueba 3 fue la que mejor correspondía a los parámetros de textura y aspecto, pero no en color.

Tabla 3. Composición de las gominolas

Composición Gominolas				
Componentes	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 3
Gelatina	3,5%	6,0%	6,0%	6%
Almidón	0,0%	0,0%	0,0%	5%
Sacarosa	40,0%	20,0%	20,0%	20%
Ácido cítrico	0,0%	0,0%	1,0%	1%
Extracto	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%
H₂O	56,0%	73,5%	72,5%	67,5%
	100,0%	100,0%	100,0%	100%

La prueba 4, fue la que mejor cumplía con las características organolépticas elegidas. Esto se debe a la adición de almidón, que mejoró el parámetro color, pero también la textura, contribuyendo a que se parezcan más a las gominolas del mercado.

Tabla 4. Resumen de las características organolépticas en función de las diferentes pruebas.

Características organolépticas gominolas				
	Textura	Aspecto	Color	Adhesividad
Prueba 1	Rugosa, gomosa, pegajosa	Regular, translucido, heterogéneo	Pálido	Alta
Prueba 2	Rugosa, gomosa, pegajosa	Regular, translucido, homogéneo,	Pálido	Alta
Prueba 3	Rugosa, gomosa, pegajosa	Regular, translucido, homogéneo	Pálido	Alta
Prueba 4	Masticable, pegajosa	Regular, opaco, homogéneo	Intenso	Alta



Ilustración 8. Resultado de 2 lotes de gominolas con la composición 3

Como se puede observar en la Ilustración 8, aunque sean con la composición 3 las gominolas no tienen las características organolépticas adecuadas a la venta. Se aprecia en la parte superior del producto un precipitado opaco y con textura cristalizada. Los resultados obtenidos muestran la posibilidad de formular gominolas con extracto polifenólico. Los resultados finales no fueron los esperados, ya que se esperaba obtener formulaciones con mejores características organolépticas a pesar de seguirse parámetros similares a investigaciones anteriores (35,36). Esto podría deberse a las composiciones de las formulaciones, en cuanto a porcentajes, pero también a la falta de compuestos importantes para la textura y el aspecto o a la alta solubilidad de la sacarosa. Otra explicación posible es el método de extracción del molde de las gominolas, por lo que se podría investigar el uso de agentes que lo mejoren.

Tabla 5. Parámetros de conservación

Parámetros de conservación			
	Temperatura	Lugar	Tiempo
Lote 1	4°C	Nevera	1 semana
Lote 2	25°C	Estanterías	1 semana

En cuanto a la estabilidad de las gominolas, se ensayaron sometiéndolas a varios parámetros, como la temperatura y el lugar de conservación, ver Tabla 5. Los lotes fueron conservados en envases herméticos. Ninguno de los lotes fue estable. El lote 2 conservó durante más tiempo las mismas características organolépticas, pero en ambos hubo crecimiento microbiológico.

Además, al estar conservadas todas las unidades del lote juntas y al tener una alta adhesividad se pegaron unas a otras. Para solventar el parámetro de adhesividad, se intentó recubrir las unidades con cera comestible. Se eligió la cera por sus características ya que, su carácter liposoluble ayuda a la formación de una capa protectora alrededor del producto. Esta estructura protectora, al solidificarse previene de la contaminación y favorece la estabilidad de la formulación. Por ello, se probaron 2 técnicas: la técnica de encamisado y la técnica de cobertura por inmersión (46). Ninguna de las 2 técnicas nos permitió un resultado concluyente. En ambos casos la gominola se derritió. A diferencia de la hipótesis inicial, los datos revelan que la composición de las gominolas no permite asegurar la estabilidad y conservación del producto. Estos resultados difieren de lo reportado en estudios previos, consiguieron estabilidad durante 2 meses de almacenamiento (47). Una explicación posible es la falta de compuestos como los conservantes y las técnicas de recubrimiento usadas. Estos resultados ofrecen información cualitativa sobre la composición de las gominolas, dejando posibles investigaciones sobre los excipientes. Otra explicación es el alto contenido hídrico de la formulación, ya que favorece la inestabilidad del producto. Por este motivo, muchos estudios apoyan el uso de recubrimientos de diferentes tipos, uno de ellos trata la creación de bioplásticos compatibles con la industria alimentaria (48).

4.3 Ensayos

4.3.1 Ensayos de disolución

Para realizar el ensayo de disolución en primer lugar se evaluó la solubilidad de las encapsulaciones en medio ácido o básico, para determinar su posible disolución a pH gástrico o intestinal, respectivamente. Para la evaluación de la disolución ácida se dispone 20mL de la solución ácido Clorhídrico 0,1M en un vaso de precipitado, con agitación magnética a 110 rpm, a temperatura 37°C. A este medio se añade 2mg de las esferificaciones. Para la evaluación de la disolución básica, se utiliza los mismos protocolos que para la evaluación en medio ácido, pero cambiando el medio. El que se usó es una solución PBS (tampón fosfato).

Tabla 6. Resultado del ensayo de rotura de las encapsulaciones en medio ácido y básico.

Ensayo de rotura de encapsulación			
Medio ácido		Medio básico	
Tiempo (min)	Apariencia	Tiempo (min)	Apariencia
0	Esferas enteras, medio transparente	0	Esferas enteras, medio transparente
35	Cambio de color en el medio, Esferas con un contorno borroso	35	Esferas deterioradas, medio transparente pero con partículas disueltas
50	Cambio de color en el medio, Esferas con un contorno borroso	50	Deterioro casi completo de las esferas, medio turbio

La Tabla 6 muestra los resultados del ensayo de rotura de encapsulación en los dos medios. Se aprecia que, para el medio ácido, a los 35 minutos, se obtiene un cambio de color de las esferas en el medio pero no se aprecia la rotura de las mismas. Se mantuvo en agitación durante 50 minutos, sin ningún cambio significativo observable, ver la Ilustración 9 en [Anexo 1](#). Sin embargo, en el medio básico, a los 35 minutos se observa deterioro de las esferas, pero ningún cambio de color del medio. Posteriormente, a los 50 minutos, se observa la desaparición total o casi total de las encapsulaciones y el medio se encuentra mucho más turbio, ver Ilustración 10 en [Anexo 1](#). Teniendo en cuenta estos resultados, se decide realizar el ensayo de disolución 2.9.5 RFE en medio básico. El ensayo de rotura permite la elección del medio de disolución que se usará para el ensayo 2.9.5 RFE. Se obtiene esta conclusión por la composición de las esferas, ya que están formadas por la unión del ion calcio y los grupos carboxilo del alginato (31). Al ser una unión iónica, es sensible a la composición iónica de la solución en la que se encuentre. Por lo que, al estar bañada en un tampón fosfato, estos iones fosfato atrapan los iones de calcio, lo que produce rotura de los enlaces formados y así producir disolución del principio activo (49).

Se realiza el ensayo de disolución 2.9.5 RFE (37), en medio básico. Para ello, se rellenan los pocillos de 750mL del tampón fosfato (PBS) a pH=6,7. Se elaboraron 6 muestras de ambas formulaciones, representando cada una un lote experimental. Con el objetivo de asegurar confiabilidad y reproducibilidad en los resultados, cada uno de los 6 lotes fue dividido en tres réplicas de igual cantidad. Las muestras triplicadas se sometieron al ensayo de disolución. Para la toma de las muestras del medio se evalúan distintos tiempos de disolución: 0, 5, 10, 15, 30, 45, 50, 55, 60, 70 y 90 min. En el HPLC se analizan dos muestras de 1mL extraídas a los tiempos 0 y 60 min, con el objetivo de encontrar de manera cualitativa la HT y la OLE. El objetivo era poder analizar la liberación del principio activo, por ello primero se analizaron dos tiempos.

- **Ensayo de disolución del Gel con las perlas de alginato**

El ensayo de disolución del Gel con las perlas de alginato se realizó usando las muestras 1 y 2.

Como se puede ver en los diferentes cromatogramas de las muestras, no se obtuvieron picos relevantes de la presencia de los principios activos. En la Figura 3 se aprecia un pico en el cual se podía medir una área. En los demás cromatogramas, Figuras 5 a 8, no se puede evaluar ningún pico o área, ver [Anexo 2](#). Por tanto, se puede inferir que no hay concentraciones de polifenol detectables en esas muestras.

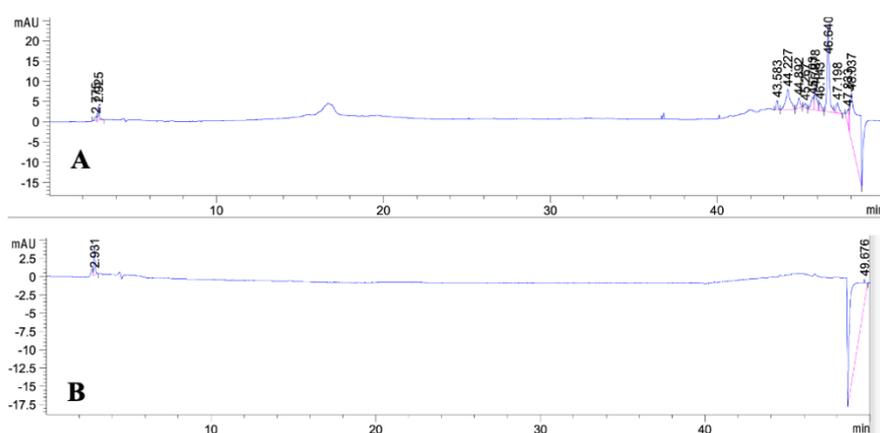


Figura 3. Cromatograma del Triplicado 1 de la Muestra 1 del Gel con las Encapsulaciones de Alginato con extracto polifenólico. (A) Cromatograma al tiempo 0 min. (B) Cromatograma al tiempo 60 min.

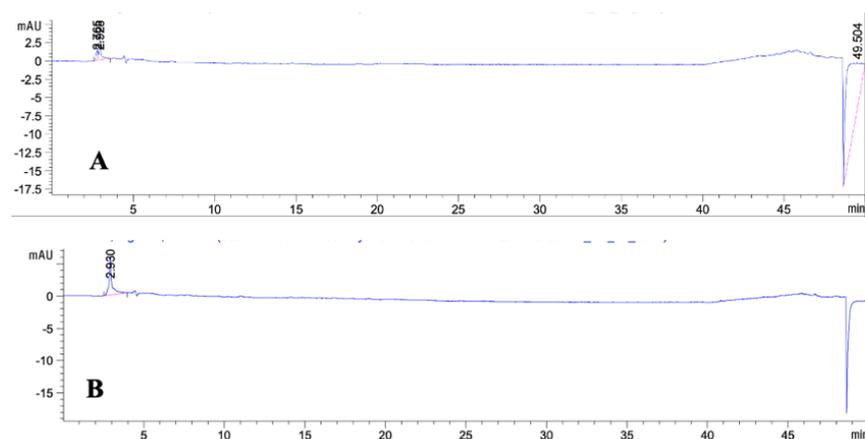


Figura 4. Cromatograma del Triplicado 2 de la Muestra 1 del Gel con las encapsulaciones de Alginato con extracto polifenólico. (A) Cromatograma al tiempo 0 min. (B) Cromatograma al tiempo 60 min.

Con los resultados obtenidos, en los ensayos de disolución con la formulación del gel con las encapsulaciones de alginato se puede asumir que no se liberó el principio activo. Es probable que las muestras analizadas no hayan sido representativas del comportamiento general. Una explicación posible es que el principio activo no estaba en concentración suficiente para poder apreciar su liberación. Estos resultados permiten abrir una perspectiva de estudio de liberación del principio en la realización de formulaciones a base de los polifenoles. Otra explicación posible es que las perlas de alginato no se disgregaron por completo durante el ensayo, debido

a que las palas del aparato no generaban una rotación suficientemente profunda para provocar el efecto deseado o para mover las esferificaciones que quedaron alojadas en el fondo del vaso, o bien que el diseño del ensayo no ha sido el adecuado y no se ha podido liberar de manera adecuada el contenido de las perlas. Esto demuestra una de las limitaciones del estudio. Líneas de investigación posibles podrían contemplar mejorar la composición de la formulación, añadiendo al alginato otro vehículo (49) o modificar el sistema de liberación (34,35).

○ **Ensayo de disolución de las Gominolas**

El ensayo de disolución de las gominolas no se llevó a cabo, por lo que no se presentan resultados de liberación del principio activo. No ejecutar este ensayo se explica por los hallazgos encontrados en la anterior formulación, con la inexistente detección o liberación del principio activo en la formulación del gel con encapsulación de alginato. El extracto PF en el gel se encuentra en una matriz del alginato, que es de tamaño menor que la de las gominolas. De modo que, al no encontrar liberación de polifenoles en una fórmula donde la relación concentración/tamaño de partícula es mayor, se preveían dificultades para encontrarla en la de menor. Sin embargo, hay diversos estudios que indican que sí encontró liberación de compuestos antioxidantes en formulaciones del tipo gominola (34,35), por lo que futuras líneas de investigación podrían ir encaminadas en primer lugar a aumentar la concentración del extracto disponible, y en segundo, vehiculizarlas en gominolas.

4.3.2 Ensayos microbiológicos

Para realizar el ensayo microbiológico se inocularon 0,1mL de cada muestra de ambas formulaciones, el gel con las perlas de alginato y las gominolas. El muestreo de las gominolas se realizó cogiendo un trozo de aproximadamente 3 milímetros, se colocaron en un tubo Eppendorf de 1 ml y se añadieron 750 μ L de agua destilada. De este modo, se consiguió resuspenderlas y así poder inocular las placas. En cuanto al muestreo del gel con las perlas de alginato, se cogieron 750 μ L del gel y un par de las perlas y se colocó ambos en un tubo Eppendorf de 1mL. Todo el ensayo ha sido realizado con las formulaciones que llevaba el extracto polifenólico. Los ensayos sobre el medio de cultivo se realizan a las 24 horas y a las 72 horas ver [Anexo 3](#). Como se observa en la Ilustración 11, a las 24 horas de cultivo, la única muestra contaminada es la muestra E. Además, este crecimiento solo se nota en un medio, el Müller-Hinton. A la hora de examinar los cultivos a las 72 horas, en la Ilustración 13 e Ilustración 14 se registra un alto contenido en colonias bacterianas, aunque existen muestras que no lo presentan las muestras G, H y K. El resultado obtenido de las muestras A, B C y D, revela un crecimiento muy diferente de las demás muestras. Es importante destacar que no todas

las muestran que presentan crecimiento bacteriano en un medio lo presentan en el otro. Esto se explica por las características del medio, ya que no se crece las mismas bacterias en ambos. En el Müller-Hinton se crece bacterias como *Pseudomonas* y *Staphylococcus* mientras que en Agar Sangre se encuentra bacterias más exigentes como *Streptococcus pyogenes*. Los resultados presentan más contenido en cuanto a crecimiento bacteriano a las 72 horas. En definitiva, se puede establecer que ambas formulaciones estaban contaminadas. Esto implica que las formulaciones no son estables al nivel microbiológico, por lo que no son aptas al consumo humano. Sin embargo, estos resultados son contrarios a lo esperado, ya que son formulaciones con el extracto polifenólico, con potenciales propiedades antimicrobianas descritas (17) , por lo que este crecimiento debería ser menor o casi nulo. Estudios previos (50), señalan que concentraciones equivalentes a 62,5 mg/mL de extracto polifenólico, pueden implicar una desaparición del crecimiento bacteriano. Los resultados encontrados en este trabajo son opuestos en este sentido, y podrían deberse a la baja concentración del extracto trabajado. Otra explicación es el alto contenido hídrico de las formulaciones o el hecho de que la realización de todas las formulaciones no se desarrolló en entornos estériles o bajo de campanas de flujo laminar. Futuras investigaciones podrían contemplar repetir los ensayos con mejoras al nivel de las composiciones de las formulaciones, o elaborándolas en condiciones de esterilidad.

4.3.3 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)

Los resultados obtenidos en este trabajo se pueden alinear con los ODS. En primer lugar, se pueden relacionar con el ODS 3 que trata de la Salud y del Bienestar, puesto que se desarrolla formulaciones nutricosméticas con propiedades antioxidantes. En segundo lugar, al usar un extracto derivado de AOVE y fomentar el uso de compuestos biodegradables se alinea con el ODS 12 de Producción y Consumo responsable. Finalmente, los resultados obtenidos ofrecen la posibilidad de investigar en diversas líneas, lo que se desarrolla en el ODS 9 de Industria, Innovación e Infraestructura.

5 Conclusiones

En resumen, los resultados obtenidos permiten sostener que:

- La formulación nutricosmética a partir de un extracto de AOVE fue posible, pero se necesitan mejoras al nivel de formulación, principalmente en las características organolépticas.
- La estabilidad microbiológica no se ha podido conseguir, ya que existió crecimiento microbiológico en todas las muestras analizadas.

- Los ensayos de disolución desarrollados de las formulaciones no son determinantes, ya que no se consiguió el perfil de liberación del extracto polifenólico.
- Los estudios de capacidad antioxidante no son concluyentes, debido a la muerte presentada por las líneas celulares, lo que puede demostrar un fallo en la capacidad antioxidante del extracto o una composición oxidante del mismo debido al proceso de extracción.
- Los resultados obtenidos se alinean con los ODS 3 de Salud y Bienestar, el ODS 9 de Industria, Innovación e Infraestructura y el ODS 12 de Producción y Consumo responsable.

6 Bibliografía

1. Cecchi L, Migliorini M, Mulinacci N. Virgin olive oil volatile compounds: Composition, sensory characteristics, analytical approaches, quality control, and authentication. Vol. 69, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society; 2021. p. 2013-40.
2. IOC STANDARDS, METHODS AND GUIDES - International Olive Council [Internet]. [citado 24 de abril de 2025]. Disponible en: <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/chemistry-standardisation-unit/standards-and-methods/>
3. RAMDAOUI Soufiane, ROUABI Soufyane. Evaluation des propriétés antioxydantes des extraits des feuilles de l'olivier cultivé (*Olea europaea* L). 2022.
4. Romani A, Ieri F, Urciuoli S, Noce A, Marrone G, Nediani C, et al. Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients* 2019, Vol 11, Page 1776 [Internet]. 1 de agosto de 2019 [citado 14 de abril de 2025];11(8):1776. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/8/1776/htm>
5. Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Gammazza AM, Knap N, et al. Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018.
6. Jimenez-Lopez C, Carpena M, Lourenço-Lopes C, Gallardo-Gomez M, M. Lorenzo J, Barba FJ, et al. Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil. *Foods* 2020, Vol 9, Page 1014 [Internet]. 28 de julio de 2020 [citado 22 de abril de 2025];9(8):1014. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/8/1014/htm>
7. Brkić Bubola K, Krapac M, Sladonja B. Influence of olive fruit fly attack on quality and composition of «Rosinjola» virgin olive oil. En: *Acta Horticulturae*. International Society for Horticultural Science; 2018. p. 489-95.
8. Robles-Almazan M, Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Rodriguez-Garcia C, Quiles JL, et al. Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. Vol. 105, *Food Research International*. Elsevier Ltd; 2018. p. 654-67.
9. Monteiro M, Silva AFR, Resende D, Braga SS, Coimbra MA, Silva AMS, et al. Strategies to Broaden the Applications of Olive Biophenols Oleuropein and Hydroxytyrosol in Food Products. *Antioxidants* [Internet]. 1 de marzo de 2021 [citado 10 de marzo de 2025];10(3):444. Disponible en:

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8000085/>

10. Flores-Chávez B, Hernández-León S, Guzmán-Elizalde AL, Espitia-López J, Garza-López PM. Methods for determination of antioxidant capacity of traditional and emergent crops of interest in Mexico: An overview. Vol. 15, *Scientia Agropecuaria*. Universidad Nacional de Trujillo; 2024. p. 593-615.
11. Vázquez-Ovando A, Mejía-Reyes JD, García-Cabrera KE, Velázquez-Ovalle G. Capacidad antioxidante: conceptos, métodos de cuantificación y su aplicación en la caracterización de frutos tropicales y productos derivados. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*. 29 de abril de 2022;9(1):9-33.
12. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. Vol. 97, *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS; 2015. p. 55-74.
13. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* [Internet]. 1 de enero de 2018 [citado 25 de mayo de 2025];13:757. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5927356/>
14. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 1 de septiembre de 2021 [citado 7 de mayo de 2025];20(9):689-709. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34194012/>
15. Hajam YA, Rani R, Ganie SY, Sheikh TA, Javaid D, Qadri SS, et al. Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. *Cells* [Internet]. 1 de febrero de 2022 [citado 7 de mayo de 2025];11(3). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35159361/>
16. Carmen Crespo M, Tomé-Carneiro J, Dávalos A, Visioli F. Pharma-Nutritional Properties of Olive Oil Phenols. Transfer of New Findings to Human Nutrition. *Foods* 2018, Vol 7, Page 90 [Internet]. 11 de junio de 2018 [citado 12 de mayo de 2025];7(6):90. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2304-8158/7/6/90/htm>
17. Kiani AK, Medori MC, Bonetti G, Aquilanti B, Velluti V, Matera G, et al. Modern vision of the Mediterranean diet. *J Prev Med Hyg* [Internet]. 1 de junio de 2022 [citado 3 de junio de 2025];63(2):E36-43. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36479477/>
18. Teleanu DM, Niculescu AG, Lungu II, Radu CI, Vladâcenco O, Roza E, et al. An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 5938 [Internet]. 25 de

- mayo de 2022 [citado 7 de mayo de 2025];23(11):5938. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/11/5938/htm>
19. Reboredo-Rodríguez P, Varela-López A, Forbes-Hernández TY, Gasparrini M, Afrin S, Cianciosi D, et al. Phenolic Compounds Isolated from Olive Oil as Nutraceutical Tools for the Prevention and Management of Cancer and Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 6 de agosto de 2018 [citado 12 de mayo de 2025];19(8):2305. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6121682/>
 20. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), mainte. *EFSA Journal* [Internet]. abril de 2011;9(4):2033. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2011.2033>
 21. Wan S, Luo J, Zhu Y, An P, Luo Y, Xing Q. The Effect of Antioxidant Polyphenol Supplementation on Cardiometabolic Risk Factors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* [Internet]. 5 de diciembre de 2024 [citado 3 de junio de 2025];16(23):4206. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39683599>
 22. Di Salvo E, Gangemi S, Genovese C, Cicero N, Casciaro M. Polyphenols from Mediterranean Plants: Biological Activities for Skin Photoprotection in Atopic Dermatitis, Psoriasis, and Chronic Urticaria. *Plants* [Internet]. 1 de octubre de 2023 [citado 6 de junio de 2025];12(20):3579. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10609915/>
 23. Cecchi L, Piazzini V, D'Ambrosio M, Luceri C, Rocco F, Innocenti M, et al. Formulation of a phenol-rich extract from unripe olives (*olea europaea* l.) in microemulsion to improve its solubility and intestinal permeability. *Molecules*. 1 de julio de 2020;25(14).
 24. Tasioula-Margari M, Tsabolidou E. Extraction, separation, and identification of phenolic compounds in virgin olive oil by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Antioxidants*. 1 de septiembre de 2015;4(3):548-62.
 25. NIH-3T3 Tissue Culture Methods.
 26. Cave E, Crowther NJ. The Use of 3T3-L1 Murine Preadipocytes as a Model of Adipogenesis. En: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2019. p. 263-72.
 27. Park EH, Kim SJ. Protective effect of Buddha's Temple extract against tert-butyl hydroperoxide stimulation-induced oxidative stress in DF-1 cells. *Anim Biosci*. 1 de julio de 2023;36(7):1120-9.
 28. Faust D, Wenz C, Holm S, Harms · Gregory, Greffrath W, Dietrich · Cornelia. *Cell-cell*

- contacts prevent t-BuOOH-triggered ferroptosis and cellular damage in vitro by regulation of intracellular calcium. *Arch Toxicol* [Internet]. 2024 [citado 4 de junio de 2025];98:2953-69. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03792-5>
29. Wenz C, Faust D, Linz B, Turmann · Christian, Nikolova T, Bertin J, et al. MOLECULAR TOXICOLOGY t-BuOOH induces ferroptosis in human and murine cell lines. 2066 [citado 3 de junio de 2025];92:759-75. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2066-y>
 30. Furger C, Power AO. Live Cell Assays for the Assessment of Antioxidant Activities of Plant Extracts. *Antioxidants* 2021, Vol 10, Page 944 [Internet]. 11 de junio de 2021 [citado 28 de mayo de 2025];10(6):944. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/6/944/htm>
 31. Uyen NTT, Hamid ZAA, Tram NXT, Ahmad N. Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: A review. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 15 de junio de 2020 [citado 30 de abril de 2025];153:1035-46. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31794824/>
 32. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). PN/L/FF/003/00. Procedimiento de elaboración de formas farmacéuticas: Preparación de geles [Internet]. [citado 29 de mayo de 2025]. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/formulario-nacional/procedimientos-normalizados-de-trabajo/procedimientos-de-elaboracion-de-formas-farmaceuticas/pn_l_ff_003_00.pdf
 33. Agencia Española de Medicamento y Productos Sanitarios. FN/2003/FMT/016. Fórmulas Magistrales Tipificadas: Lidocaína Viscosa 2% [Internet]. A G E N C I A E S P A Ñ O L A D E M E D I C A M E N FORMULARIO NACIONAL. [citado 29 de mayo de 2025]. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/formulario-nacional/monografias/formulas-magistrales-tipificadas/fn_2003_fmt_016.pdf
 34. Aiello F, Caputo P, Oliviero Rossi C, Restuccia D, Spizzirri UG. Formulation of Antioxidant Gummies Based on Gelatin Enriched with Citrus Fruit Peels Extract. *Foods*. 1 de enero de 2024;13(2).
 35. Roudbari M, Barzegar M, Sahari MA, Gavlighi HA. Formulation of functional gummy candies containing natural antioxidants and stevia. *Heliyon*. 15 de junio de 2024;10(11).
 36. Sabri LA, Khasraghi AH, Sulaiman HT. Preparation and evaluation of oral soft chewable jelly containing flurbiprofen. *J Adv Pharm Technol Res* [Internet]. 1 de octubre de 2022 [citado 19 de marzo de 2025];13(4):306. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9784038/>

37. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). 2.9.3. Ensayo de Disolución de las Formas Farmacéuticas Sólidas. En: Real Farmacopea Española [Internet]. 5°. Madrid; 2012 [citado 7 de abril de 2025]. Disponible en: <https://extranet.boe.es/farmacopea/doc.php?id=20903>
38. Ratajczak M, Kubicka MM, Kamińska D, Sawicka P, Długaszewska J. Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products. Saudi Pharmaceutical Journal [Internet]. 1 de julio de 2015 [citado 30 de abril de 2025];23(3):303-7. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319016414001510>
39. Martini S, Cavalchi M, Conte A, Tagliazucchi D. The paradoxical effect of extra-virgin olive oil on oxidative phenomena during in vitro co-digestion with meat. Food Research International [Internet]. 1 de julio de 2018 [citado 4 de junio de 2025];109:82-90. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996918303016>
40. Artajo LS, Romero MP, Morelló JR, Motilva MJ. Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: Evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index. J Agric Food Chem [Internet]. 9 de agosto de 2006 [citado 4 de junio de 2025];54(16):6079-88. Disponible en: [/doi/pdf/10.1021/jf060874q](https://doi.org/10.1021/jf060874q)
41. Nguyen ST, Nguyen HTL, Truong KD. Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. Biomedical Research and Therapy [Internet]. 29 de julio de 2020 [citado 4 de junio de 2025];7(7):3855-9. Disponible en: <https://bmrat.org/index.php/BMRAT/article/view/614>
42. Datta NJ, Namasivayam A. In vitro effect of methanol on folate-deficient rat hepatocytes. Drug Alcohol Depend [Internet]. 20 de julio de 2003 [citado 4 de junio de 2025];71(1):87-91. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0376871603000668>
43. Pirisi FM, Cabras P, Cao CF, Migliorini M, Muggelli M. Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures. J Agric Food Chem. 2000;48(4):1191-6.
44. Pirisi FM, Cabras P, Cao CF, Migliorini M, Muggelli M. Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures. J Agric Food Chem. 2000;48(4):1191-6.
45. Zhang H, Cheng J, Ao Q. Preparation of Alginate-Based Biomaterials and Their Applications in Biomedicine. Mar Drugs [Internet]. 1 de mayo de 2021 [citado 6 de mayo de 2025];19(5):264. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8150954/>

46. Suhag R, Kumar N, Petkoska AT, Upadhyay A. Film formation and deposition methods of edible coating on food products: A review. *Food Research International* [Internet]. 1 de octubre de 2020 [citado 5 de junio de 2025];136:109582. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996920306074>
47. Vojvodić Cebin A, Bunić M, Mandura Jarić A, Šeremet D, Komes D. Physicochemical and Sensory Stability Evaluation of Gummy Candies Fortified with Mountain Germander Extract and Prebiotics. *Polymers (Basel)* [Internet]. 1 de enero de 2024 [citado 5 de junio de 2025];16(2). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38257059/>
48. Florido-Moreno P, Benítez JJ, González-Buesa J, Porrás-Vázquez JM, Hierrezuelo J, Grifé-Ruiz M, et al. Plasticized cellulose bioplastics with beeswax for the fabrication of multifunctional, biodegradable active food packaging. *Food Hydrocoll* [Internet]. 1 de mayo de 2025 [citado 4 de junio de 2025];162:110933. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X24012074>
49. Pereira A da S, Souza CPL, Moraes L, Fontes-Sant'ana GC, Amaral PFF. Polymers as Encapsulating Agents and Delivery Vehicles of Enzymes. *Polymers (Basel)* [Internet]. 1 de diciembre de 2021 [citado 3 de junio de 2025];13(23):4061. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8659040/>
50. Selim S, Albqmi M, Al-Sanea MM, Alnusaire TS, Almuhayawi MS, AbdElgawad H, et al. Valorizing the usage of olive leaves, bioactive compounds, biological activities, and food applications: A comprehensive review. *Front Nutr* [Internet]. 8 de noviembre de 2022 [citado 3 de junio de 2025];9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36424930/>

7 Anexos

7.1 Anexo 1. Resultado del ensayo de rotura de las encapsulaciones de Alginato Sódico.

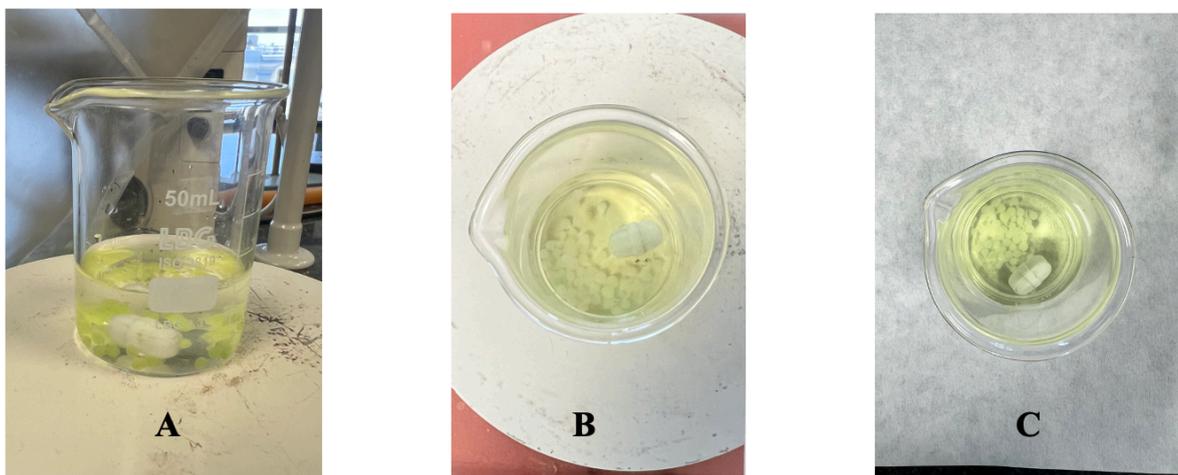


Ilustración 9. Ensayo de rotura de las encapsulaciones en medio ácido. (A) encapsulación al principio del ensayo. (B) encapsulación en la mitad del ensayo. (C) encapsulación al final del ensayo.

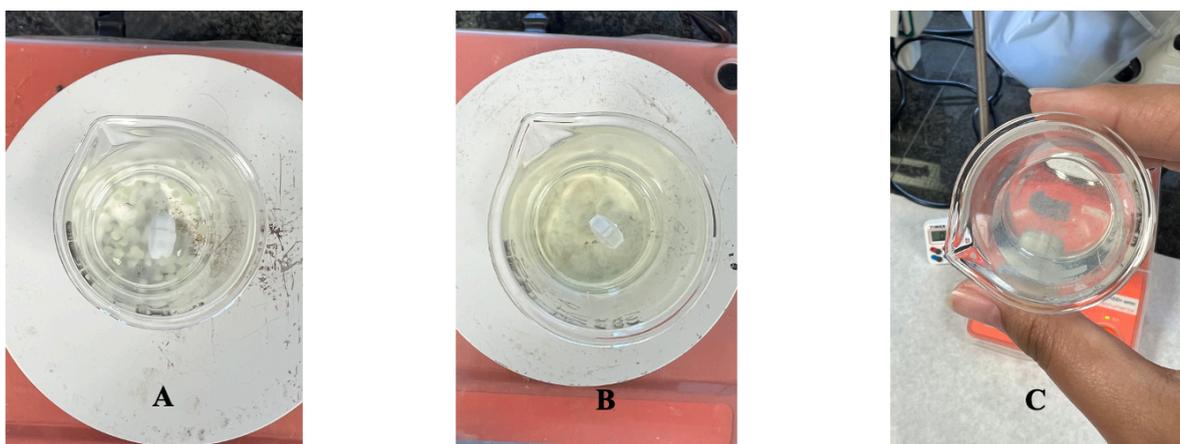


Ilustración 10. Ensayo de rotura de las encapsulaciones en medio básico. (A) encapsulación al principio del ensayo. (B) encapsulación en la mitad del ensayo. (C) encapsulación al final del ensayo.

7.2 Anexo 2. Cromatogramas de los ensayos de disolución del gel con las encapsulaciones de Alginato

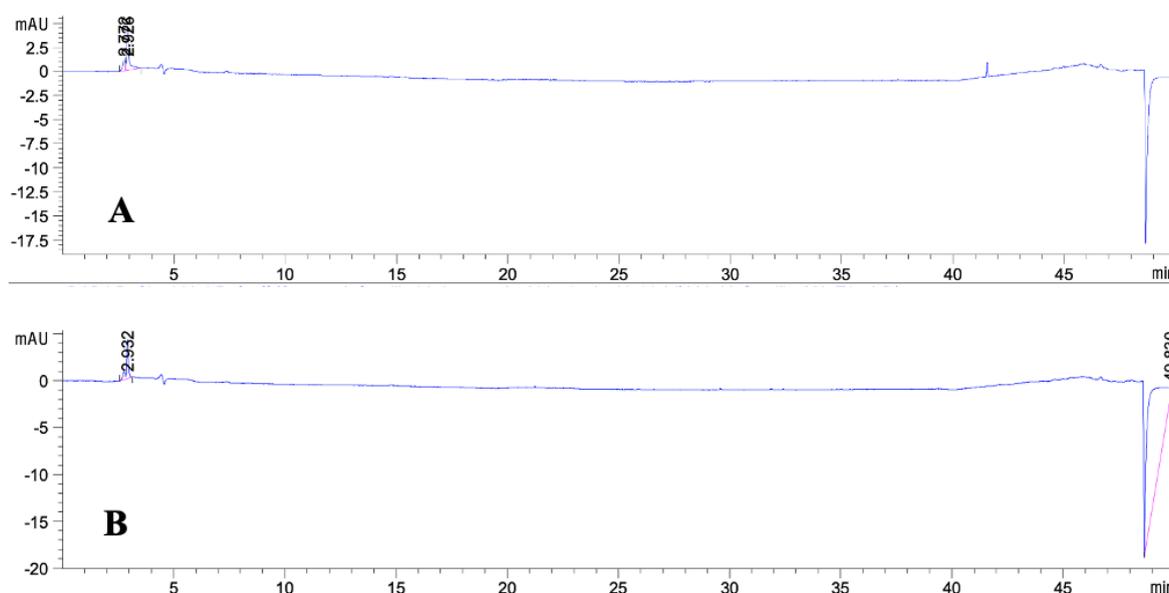


Figura 5. Cromatograma del Triplicado 3 de la Muestra 1 del Gel con las encapsulaciones de Alginato con extracto PF. (A) Cromatograma al tiempo 0 min. (B) Cromatograma al tiempo 60 min.

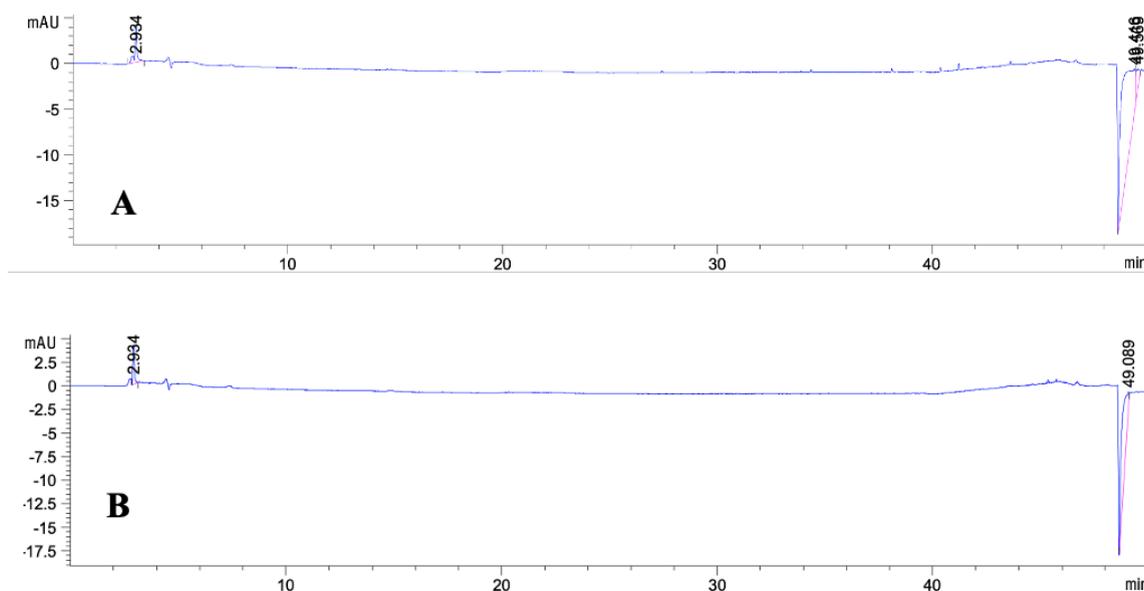


Figura 6. Cromatograma del Triplicado 1 de la Muestra 2 del Gel con las encapsulaciones de Alginato con extracto PF. (A) Cromatograma al tiempo 0 min. (B) Cromatograma al tiempo 60 min.

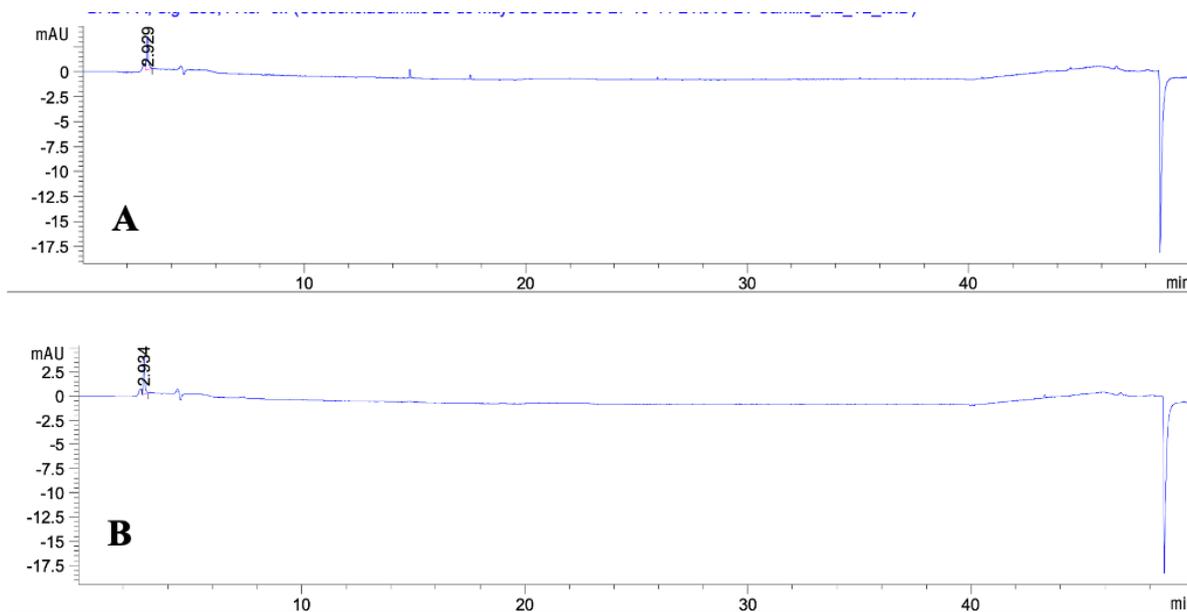


Figura 7. Cromatograma del Triplicado 2 de la Muestra 2 del Gel con las encapsulaciones de Alginato con extracto PF. (A) Cromatograma al tiempo 0 min. (B) Cromatograma al tiempo 60 min.

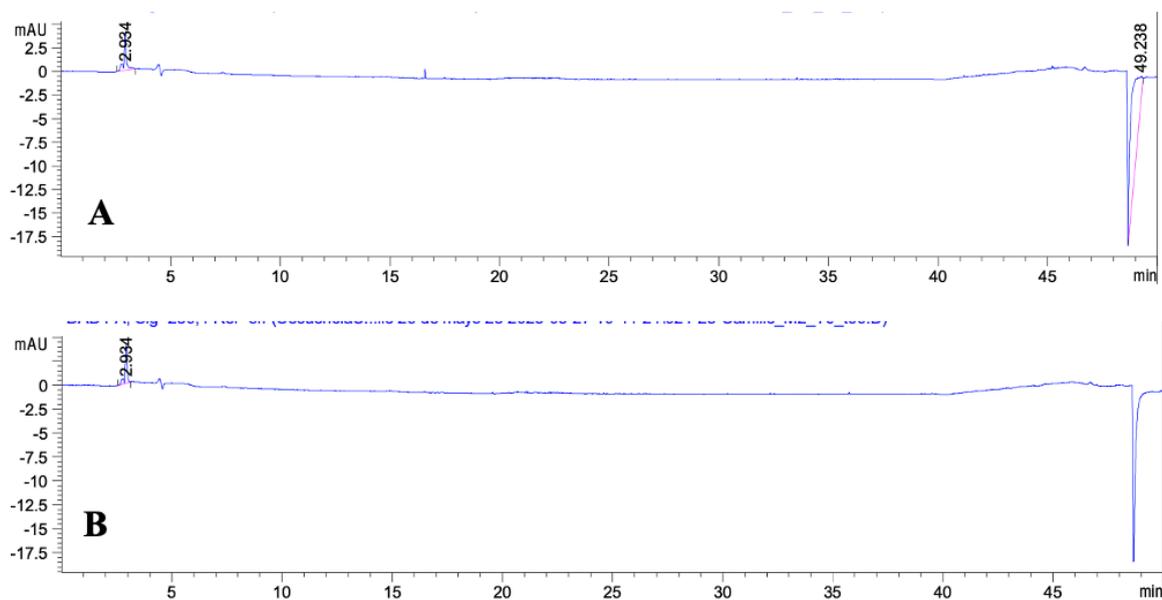


Figura 8. Cromatograma del Triplicado 3 de la Muestra 2 del Gel con las encapsulaciones de Alginato con extracto PF. (A) Cromatograma al tiempo 0 min. (B) Cromatograma al tiempo 60 min.

7.3 Anexo 3: Resultados de los ensayos microbiológicos de las formulaciones nutricosmética

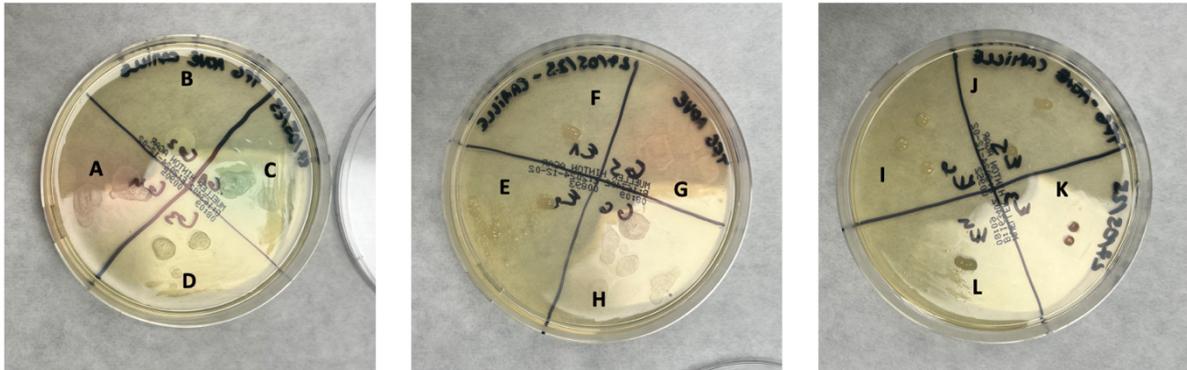


Ilustración 11. Resultados ensayo microbiológico, en placas Müller-Hinton a 24h. (A): Ensayo del lote 4 de gominola. (B): Ensayo del lote 2 de gominola. (C): Ensayo del lote 1 de gominola. (D): Ensayo del lote 3 de gominola. (E): Ensayo del lote 2 del gel con las perlas de alginato. (F): Ensayo del lote 1 del gel con las perlas de alginato. (G): Ensayo del lote 5 de gominola. (H): Ensayo del lote 6 de gominola. (I): Ensayo del lote 6 del gel con las perlas de alginato. (J): Ensayo del lote 5 del gel con las perlas de alginato. (K): Ensayo del lote 3 del gel con las perlas de alginato. (L): Ensayo del lote 4 del gel con las perlas de alginato.

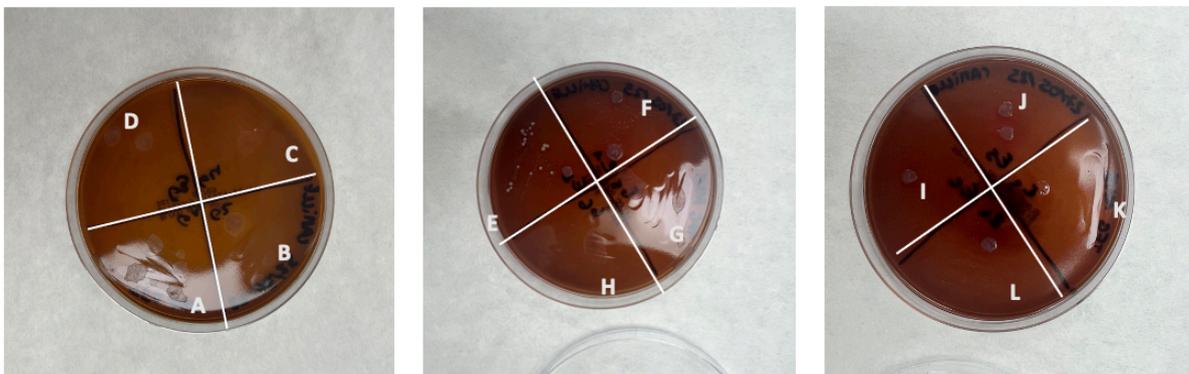


Ilustración 12. Resultados ensayo microbiológico, en placa agar sangre a 24h. (A): Ensayo del lote 4 de gominola. (B): Ensayo del lote 2 de gominola. (C): Ensayo del lote 1 de gominola. (D): Ensayo del lote 3 de gominola. (E): Ensayo del lote 2 del gel con las perlas de alginato. (F): Ensayo del lote 1 del gel con las perlas de alginato. (G): Ensayo del lote 5 de gominola. (H): Ensayo del lote 6 de gominola. (I): Ensayo del lote 6 del gel con las perlas de alginato. (J): Ensayo del lote 5 del gel con las perlas de alginato. (K): Ensayo del lote 3 del gel con las perlas de alginato. (L): Ensayo del lote 4 del gel con las perlas de alginato.

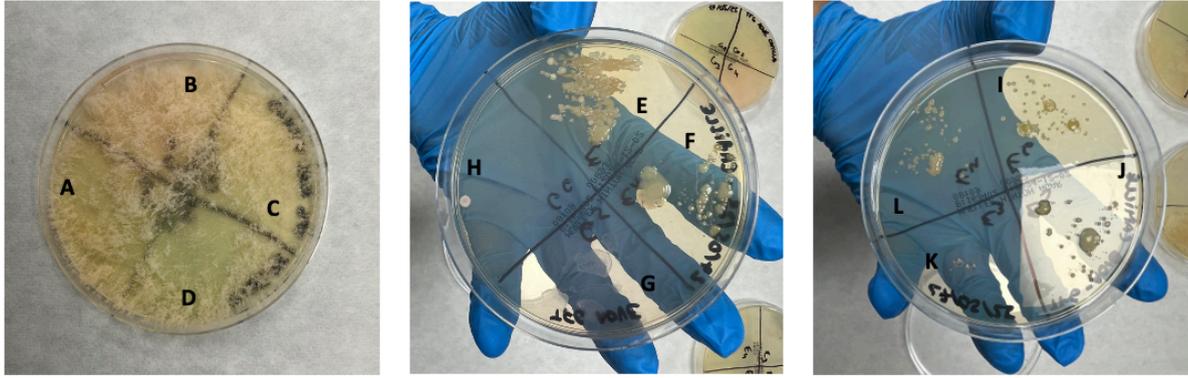


Ilustración 13. Resultado ensayo microbiológico, en placa Müller-Hinton a 72h. (A): Ensayo del lote 4 de gominola. (B): Ensayo del lote 2 de gominola. (C): Ensayo del lote 1 de gominola. (D): Ensayo del lote 3 de gominola. (E): Ensayo del lote 2 del gel con las perlas de alginato. (F): Ensayo del lote 1 del gel con las perlas de alginato. (G): Ensayo del lote 5 de gominola. (H): Ensayo del lote 6 de gominola. (I): Ensayo del lote 6 del gel con las perlas de alginato. (J): Ensayo del lote 5 del gel con las perlas de alginato. (K): Ensayo del lote 3 del gel con las perlas de alginato. (L): Ensayo del lote 4 del gel con las perlas de alginato

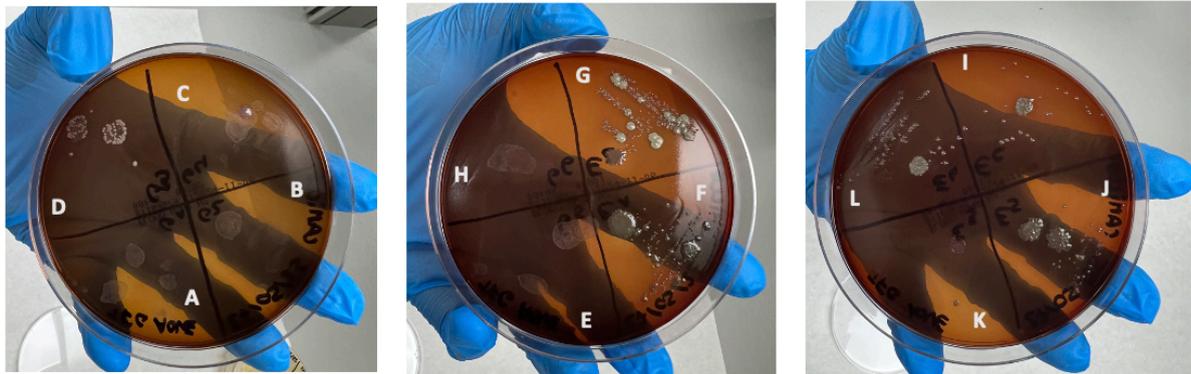


Ilustración 14. Resultado ensayo microbiológico, en placas agar sangre, a 72h. (A): Ensayo del lote 4 de gominola. (B): Ensayo del lote 2 de gominola. (C): Ensayo del lote 1 de gominola. (D): Ensayo del lote 3 de gominola. (E): Ensayo del lote 2 del gel con las perlas de alginato. (F): Ensayo del lote 1 del gel con las perlas de alginato. (G): Ensayo del lote 5 de gominola. (H): Ensayo del lote 6 de gominola. (I): Ensayo del lote 6 del gel con las perlas de alginato. (J): Ensayo del lote 5 del gel con las perlas de alginato. (K): Ensayo del lote 3 del gel con las perlas de alginato. (L): Ensayo del lote 4 del gel con las perlas de alginato