

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud

Sede Trelew



Tesis de Grado

“Actividad inhibitoria de alimentos obtenidos mediante fermentación controlada de brasicáceas y *Undaria pinnatifida* sobre enzimas relacionadas con la diabetes tipo II”

Alumna: Brenda Micaela Martinez Caliarì

Directora: Dra. Marisol Vallejo

Codirector: Lic. Franco Matias Sosa

Asesor: Dr. Emilio Rogelio Marguet



## Índice

.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Agradecimientos .....	7
Resumen .....	9
Introducción.....	13
1.1 Alimentos funcionales .....	13
1.2 Alimentos fermentados.....	14
1.3 Alga undaria .....	16
1.4 Bacterias ácido lácticas.....	18
1.5 Diabetes .....	19
Objetivos .....	23
2.1 Objetivo General .....	23
2.1.2 Objetivos Específicos.....	23
Materiales y métodos .....	24
3. 1 Material Biológico .....	24
3.1.1 Cepas seleccionadas .....	24
3.1. 2 Brasicáceas .....	25
3.1.3 Undaria pinnatifida.....	25
3.2 Fermentaciones.....	25
3.2.1 Fermentación controlada (FC).....	26
3.2.2 Fermentación espontánea (FE).....	26
3.2.3 Calidad microbiológica .....	27
3.3 Preparación de extractos .....	27
3.4 Inhibición de enzimas vinculadas con la diabetes .....	28

3.4.1 Inhibición de $\alpha$ -amilasa .....	28
3.4.2 Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa .....	29
3.4.3 Determinación del tipo de inhibición .....	30
3.5 Análisis Estadístico .....	30
Resultados y discusión .....	31
4.1 Fermentaciones.....	31
4.2 Calidad microbiológica .....	32
4.3 Inhibición enzimática.....	33
4.3.1 Inhibición de $\alpha$ -amilasa .....	33
4.2.2 Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa .....	40
.....	44
Conclusiones .....	46
Bibliografía .....	47

## Lista de figuras

Figura 1: Akusai ( <i>Brassica rapa</i> L. var. <i>glabra</i> Regel), repollo colorado y blanco ( <i>B. oleracea</i> ssp. <i>capitata</i> (L.) Metzg) .....	15
Figura 2: Wakame ( <i>Undaria pinnatifida</i> (Harvey) Suringar) .....	17
Figura 3: Reacción de hidrólisis del almidón, mediada por la enzima $\alpha$ -amilasa (a) y reacción de hidrólisis de la maltosa, mediada por la enzima $\alpha$ -glucosidasa (b).....	20
Figura 4: Esquema general de los ensayos inhibitorios .....	30
Figura 5: Alineamiento de secuencias de aminoácidos entre la $\alpha$ -amilasa humana (P04746) y la porcina (P00690).....	33
Figura 6: Gráfico de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa por los extractos acuoso (a) y metanólico (b) obtenidos a partir de la fermentación espontánea y controlada de AKU.....	35
Figura 7: Gráfico de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa por los extractos acuoso (a) y metanólico (b) obtenidos a partir de la fermentación espontánea y controlada de RBU.....	36

Figura 8: Gráfico de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa por los extractos acuoso (a) y metanólico (b) obtenidos a partir de la fermentación espontánea y controlada de RCU.....	38
Figura 9: Gráfico de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa por los extractos acuoso (a) y metanólico (b) obtenidos a partir de la fermentación espontánea y controlada de AKU.....	41
Figura 10: Gráfico de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa por los extractos acuoso (a) y metanólico (b) obtenidos a partir de la fermentación espontánea y controlada de RBU.....	42
Figura 11: Gráfico de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa por los extractos acuoso (a) y metanólico (b) obtenidos a partir de la fermentación espontánea y controlada de RCU.....	44

## Lista de tablas

Tabla 1: Cepas de BAL seleccionadas como inóculos .....	24
Tabla 2: valores de los parámetros cinéticos obtenidos de la inhibición de $\alpha$ -amilasa con akusai + alga undaria .....	34
Tabla 3: valores de los parámetros cinéticos obtenidos de la inhibición de $\alpha$ -amilasa con repollo blanco + alga undaria.....	36
Tabla 4: valores de los parámetros cinéticos obtenidos de la inhibición de $\alpha$ -amilasa con repollo colorado + alga undaria.....	37
Tabla 5: valores de los parámetros cinéticos obtenidos de la inhibición de $\alpha$ -glucosidasa con akusai + alga undaria.....	40
Tabla 6: valores de los parámetros cinéticos obtenidos de la inhibición de $\alpha$ -glucosidasa con repollo blanco + alga undaria.....	42
Tabla 7: valores de los parámetros cinéticos obtenidos de la inhibición de $\alpha$ -glucosidasa con repollo colorado + alga undaria.....	43



## Agradecimientos

*A mi madre, gracias por tu apoyo incondicional todos estos años, por tus palabras de aliento y ser refugio cada vez que lo necesité*

*A mis directores, Marisol y Franco, gracias por todo su apoyo a lo largo de este último año, tanto en lo académico como en lo personal, por sus consejos y recomendaciones que enriquecieron mi formación*

*A mi asesor, Rogelio, gracias por tus enseñanzas, las cuales siempre van más allá de lo académico. Ha sido un placer cursar y trabajar con vos en el laboratorio*

*A todo el equipo del laboratorio, por la calidez y las risas compartidas, hicieron que el camino fuera más ligero y agradable*

*A mi hermana de la vida, Karen, gracias por tu amistad estos últimos 24 años, por siempre creer en mí incluso cuando a mí misma me costaba hacerlo*

*A mis amigos, Marianela, Lucía y Alexis, por acompañarme y saber darme mi espacio cuando lo necesité, por las risas y momentos compartidos*

*A mi compañero, Alexis, gracias por el aguante estos últimos años, por impulsarme a mejorar cada día y apoyarme en el cumplimiento de mis objetivos*

*A mi querida Uma, mi amiga de cuatro patas, cuya compañía y ternura han sido un apoyo esencial en mi vida en estos ocho años*

*A todos los docentes, quienes con su dedicación, conocimiento y guía han sido fundamentales en mi formación universitaria*

*A mis compañeros de cursadas, gracias por no dejarme abandonar cada vez que quise rendirme, por los mates, charlas y horas de estudio compartidas*

*A todas las personas que de alguna manera han sido parte de esta trayectoria*

*Al Consejo Interuniversitario Nacional por el otorgamiento de la beca “Estímulo a las Vocaciones Científicas” (beca EVC-CIN)*

*A la Secretaría de Ciencia & Tecnología de la provincia de Chubut por el apoyo económico brindado para la finalización de mi tesis*

*A la Secretaría de Ciencia & Técnica de la UNPSJB por el PI N° 1867 (RD R/10 N° 388/2024) mediante el cual desarrolle mi trabajo de tesis*

*Al Dr. Fernando Dellatorre por su colaboración en la recolección del alga Undaria*



## Resumen

La diabetes de tipo II es un desorden metabólico asociado con la resistencia a la insulina y disfunción de las células beta del páncreas, productoras de la hormona. Hoy representa el 95% de los casos de diabetes y conduce a patologías de largo término como por ejemplo complicaciones micro y macro vasculares, neuropatías, retinopatías, nefropatías, entre otras. No obstante, existir factores genéticos, se puede prevenir en la mayoría de los casos evitando el sedentarismo, siguiendo una dieta equilibrada, una adecuada higiene del sueño y eliminando el estrés crónico. La OMS advierte sobre el aumento descontrolado de esta patología considerándola una de las pandemias globales del siglo XXI.

Con referencia específica a las dietas saludables, durante los últimos años la industria alimenticia ha estimulado el desarrollo de nuevos productos que contribuyan a la salud y bienestar humano. En la década de los '80, el gobierno de Japón, a través del Ministerio de Educación, Ciencia y Cultura, desarrolló la idea de alimentos funcionales, describiéndolos como aquellos que, además de su función nutritiva y sensorial, exhiben la capacidad de mejorar la salud o reducir el riesgo de contraer enfermedades.

En particular, los alimentos fermentados obtenidos a partir de brasicáceas y algas pardas, como *Undaria pinnatifida*, pueden aportar compuestos bioactivos (polifenoles, fucoidanos, alginatos) con potencial efecto antihiperoglucémico. El aprovechamiento de esta especie invasora aporta, además, beneficios ambientales y económicos.

El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar alimentos funcionales mediante fermentaciones controladas de brasicáceas suplementadas con *U. pinnatifida* que inhiban enzimas relacionadas con la diabetes tipo 2. Las fermentaciones controladas se compararon con fermentaciones espontáneas en cuanto a la capacidad inhibitoria frente a las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa. Además, se determinó el tipo de inhibición (competitiva, no competitiva o mixta) y se evaluó la calidad microbiológica de los productos fermentados.

Las materias primas utilizadas fueron los vegetales akusai, repollo blanco y repollo colorado en combinación con el alga *Undaria*, denominadas AKU, RBU y RCU respectivamente (proporción 80:20). La fermentación controlada se realizó con inóculos de *Leuconostoc* (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* y *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum*) y *Lactiplantibacillus* (*Lactiplantibacillus argentoratensis*, *L. plantarum* y *L. pentosus*), incorporados en dos etapas, y la fermentación espontánea se llevó a cabo con la flora epífita propia de los vegetales, ambas durante 30 días a 18 °C.

Se realizó la preparación de extractos acuosos y metanólicos a partir de muestras obtenidas de las matrices fermentadas (día 30), con los que se llevaron a cabo los ensayos de inhibición enzimática. Se realizó la medición de inhibición sobre  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa mediante la técnica enzimática colorimétrica GOD-POD. Por último, se llevó a cabo el análisis cinético por Lineweaver-Burk para clasificar el tipo de inhibición, seguido del análisis estadístico correspondiente.

Las fermentaciones controladas alcanzaron un pH < 4 en la mayoría de los modelos; los recuentos de bacterias ácido lácticas (BAL) exhibieron un valor similar en los 3 modelos estudiados ( $\approx 6$  log UFC/g). En las matrices de AKU y RCU se detectaron <1 log UFC/g de hongos y levaduras, mientras que para RBU el valor fue de  $2,5 \pm 0,31$  log UFC/g. Los valores de aerobios totales resultaron <5 log UFC/g en todas las matrices, mientras que no se detectaron coliformes totales en ninguna de las matrices analizadas.

En cuanto a la inhibición *in vitro* de la  $\alpha$ -amilasa, se observaron inhibiciones de tipo mixta y competitiva según matriz y tipo de extracto. En cambio, cuando se ensayó la  $\alpha$ -glucosidasa, predominó la inhibición competitiva en los extractos acuosos de AKU, RBU y en el extracto metanólico de RCU.

Los valores obtenidos de *Km* fueron significativamente mayores en los extractos provenientes de las fermentaciones controladas, lo que se relaciona directamente con el aumento de la oferta de compuestos fenólicos durante la fermentación controlada.

Estos resultados nos permiten concluir que el uso de cultivos autóctonos de BAL en fermentaciones controladas potencia la bioactividad de las brasicáceas suplementadas con *U. pinnatifida*, incrementando la capacidad inhibitoria frente a  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa. De la misma manera, los productos fermentados estudiados constituyen alternativas prometedoras como alimentos funcionales para ayudar a controlar la hiperglucemia postprandial en diabetes tipo 2, con la ventaja potencial de menores efectos gastrointestinales que los inhibidores sintéticos.

Si bien los resultados obtenidos fueron satisfactorios, en el presente trabajo no se determinó la concentración inhibitoria máxima media ( $IC_{50}$ ), por lo que se recomienda incluir este análisis en estudios futuros para mejorar la precisión técnica.



# Introducción

## 1.1 Alimentos funcionales

El concepto de alimento funcional surgió en Japón en la década de 1980, bajo el término FOSHU (*Foods for Specified Health Use*), para referirse a aquellos productos que, además de nutrir, contienen componentes biológicamente activos que ofrecen beneficios a la salud o reducen el riesgo de enfermedades (Virgen-Carrillo & Mojica, 2024). Sin embargo, el paradigma de los alimentos funcionales se sustenta en la filosofía ancestral oriental de considerar a la alimentación y a la medicina son considerados igualmente importantes en la prevención y curación de enfermedades (Cortés *et al.*, 2005).

Los alimentos funcionales se caracterizan por contener compuestos bioactivos (polifenoles, carotenoides, vitaminas, ácidos grasos poliinsaturados, etc.) que proporcionan beneficios adicionales a la salud. La evidencia científica sugiere que estos componentes, provenientes de fuentes diversas incluyendo organismos marinos y vegetales, exhiben propiedades bioactivas clave, como la capacidad antioxidante, anticancerígena o antihiper glucémica, entre otras (Tarahi *et al.*, 2026).

A nivel mundial, la legislación varía considerablemente. En la actualidad, Japón es el único país con una categoría legalmente definida y específica. En la Unión Europea, si bien no hay una definición legal de "alimento funcional", se regulan estrictamente bajo el Reglamento (CE) N° 1924/2006 sobre declaraciones nutricionales y de propiedades saludables, requiriendo evidencia científica sólida y aprobación de la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria). Mientras que, en Argentina, el Código Alimentario Argentino (CAA) no define explícitamente el término "alimento funcional" como una categoría única, sino que regula sus componentes y las alegaciones de salud a través de resoluciones conjuntas y capítulos específicos sobre alimentos enriquecidos y suplementos (ANMAT, 2024).

El Functional Food Center define los alimentos funcionales como "alimentos naturales o procesados que contienen 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” (<https://www.functionalfoodscenter.net/> visitado el 15/1/2026).

Los alimentos funcionales surgen en parte, como una respuesta al incremento de ciertas enfermedades relacionadas con el estilo de vida moderno, convirtiéndose en una alternativa para mejorar la nutrición, contribuyendo a la salud pública, ya que se integran de manera simple en la dieta cotidiana del consumidor, permitiendo que su ingesta habitual aporte beneficios fisiológicos (Siró *et al.*, 2008). En este sentido, la convergencia entre los avances biotecnológicos y la evidencia científica ha permitido identificar componentes alimentarios que mejoran la calidad de vida de la población.

## 1.2 Alimentos fermentados

Los alimentos fermentados se definen como alimentos o bebidas que se obtienen mediante la transformación de las materias primas por microorganismos (bacterias, hongos y levaduras), capaces de metabolizar los carbohidratos presentes, mejorando las propiedades organolépticas y su digestibilidad. Al mismo tiempo, durante el proceso de fermentación, se producen elevadas concentraciones de ácidos orgánicos, provocando una disminución del pH, que inhibe el crecimiento de bacterias patógenas y/o microorganismos deteriorantes, lo que aumenta la seguridad del producto (Dimidi *et al.*, 2019). Además, constituyen fuentes estables y significativas de proteínas, vitaminas, minerales y otros nutrientes; al mismo tiempo, aportan probióticos que benefician la microbiota intestinal, el sistema inmunológico y la absorción de nutrientes (Rezac *et al.*, 2018).

Desde la antigüedad, diversas matrices han sido utilizadas para la fermentación, predominando los productos de origen lácteo (ej. yogur, kéfir y quesos) y más recientemente, sustratos vegetales como las legumbres y hortalizas como por ejemplo, el natto y el chucrut respectivamente. Particularmente, esta familia de

vegetales utilizada en la gastronomía tradicional de muchos países se destaca por un perfil nutricional denso en fibra dietética, vitaminas y minerales esenciales.

Estos vegetales sobresalen como modelos de estudio debido a su alta concentración de biomoléculas activas como glucosinolatos, flavonoides, antocianinas, taninos, y otros compuestos bioactivos, que exhiben efectos beneficiosos para la salud humana, entre los que podemos citar la regulación de la glucemia postprandial influenciando positivamente la salud de las personas con diabetes de tipo II (Gupta *et al.*, 2022).

La familia Brassicaceae comprende especies de plantas angiospermas dicotiledóneas que pertenecen al orden Brassicales. Este grupo es monofilético y está formado por aproximadamente 352 géneros y 3.660 especies distribuidas globalmente, aunque predominan en las regiones templadas (Zhou *et al.*, 2024). Se considera que la amplia diversidad genética presente en esta familia facilitó que los primeros seres humanos pudieran seleccionar, propagar, cultivar y domesticar variedades con características morfológicas distintas de las plantas silvestres (Wu *et al.*, 2022). La familia incluye numerosas especies cultivadas de gran importancia económica a nivel mundial, como, por ejemplo: *Brassica rapa* L. var. *glabra* Regel (Akusai) y *B. oleracea* ssp. *capitata* (L.) Metzg (repollo blanco y repollo colorado), entre otras.



Figura 1: Akusai (*Brassica rapa* L. var. *glabra* Regel), repollo colorado y blanco (*B. oleracea* ssp. *capitata* (L.) Metzg)

Estos vegetales pueden consumirse crudos, cocidos y/o fermentados. Este proceso puede ocurrir de manera espontánea o controlada. El proceso de fermentación espontánea ocurre por la microbiota, particularmente bacterias ácido lácticas (BAL) que están presentes de manera natural en la superficie del vegetal. Las especies más frecuentes aisladas en los vegetales frescos y sus fermentaciones espontáneas son *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Enterococcus* y *Pediococcus* (Di Cagno *et al.*, 2013).

La fermentación controlada es un proceso que requiere de cultivos iniciadores, es decir, cepas de una o más especies bacterianas seleccionadas según sus propiedades biotecnológicas, que se inoculan en una matriz previamente pasteurizada, con el fin de iniciar su fermentación. Al utilizar cultivos iniciadores se obtienen ventajas, tales como reducir el tiempo de fermentación, disminuir la probabilidad de que se produzcan alteraciones y permitir la obtención de productos de mejor calidad sensorial, más estables y homogéneos (Di Cagno *et al.*, 2013).

Más allá de los vegetales terrestres, las algas marinas representan un recurso infrutilizado; sin embargo, son sustratos versátiles para la obtención de ingredientes funcionales, utilizados tanto en la industria alimenticia como en la industria cosmética. Entre sus compuestos bioactivos se destacan los fucoidanos, polifenoles, carotenoides y polisacáridos sulfatados, involucrados en la prevención de enfermedades y la promoción de la salud. No obstante, la bioaccesibilidad de estos metabolitos se ve limitada por la complejidad estructural de su pared celular. En este contexto, la fermentación se presenta como una estrategia que facilita la extracción de las moléculas de interés sin producir residuos tóxicos (Pérez-Alva *et al.*, 2022).

### 1.3 Alga undaria

El alga *Undaria pinnatifida* es una macroalga parda originaria del este de China, Corea, Japón y sureste de Rusia. Se estima que llegó accidentalmente a las costas de Puerto Madryn a principios de la década de los '90, siendo el principal mecanismo de propagación el transporte marítimo (Casas *et al.*, 2004). La

dispersión ocurre a través de dos vías clave: el biofouling (individuos adheridos a los cascos de las embarcaciones) y la liberación de esporas contenidas en el agua de lastre, lo que facilita su colonización en nuevas regiones geográficas.



Figura 2: Wakame (*Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar)

Actualmente, ocupa más de 1.000 km de costas patagónicas y continúa dispersándose. Su ciclo de vida alterna entre un esporofito estacional y un gametofito microscópico de alta persistencia. Esta invasión biológica genera importantes alteraciones en el turismo costero y provoca efectos ecológicos adversos, desplazando comunidades de algas nativas y afectando la biodiversidad de peces en arrecifes locales (Dellatorre *et al.*, 2012).

El alga undaria (wakame) es consumida tradicionalmente en la gastronomía oriental debido a sus propiedades nutricionales. Sus componentes bioactivos, especialmente los fucoidanos y alginatos, exhiben efectos inhibitorios sobre enzimas relacionadas con el metabolismo de los hidratos de carbono (Ryu *et al.*, 2023). Su aprovechamiento como alimento funcional no solo ofrece una solución ambiental, sino también nutricional.

Por otro lado, las algas pardas en general son utilizadas para producir biofertilizantes, debido a sus propiedades higroscópicas, es decir, que ayudan al suelo a retener más humedad; a su riqueza mineral y a la presencia de fitohormonas como citoquinas y auxinas que actúan como estimulantes de la división celular (Khan *et al.*, 2009).

Dado que la erradicación es casi imposible, investigadores y cocineros locales impulsan su cosecha sostenible e incorporación a la dieta ya que es altamente nutritiva. Ejemplos de estos emprendimientos son el proyecto gastronómico “Amar

Algas” de Camarones y la empresa “Jono Patagonia” de la ciudad de Puerto Madryn.

#### 1.4 Bacterias ácido lácticas

Las BAL son bacterias Grampositivas con una estrecha relación filogenética, lo que se traduce en homologías morfológicas, metabólicas y fisiológicas (Dridier & Rivera, 2016). La mayoría de las BAL pertenecen al filo Firmicutes, clase Bacilli y orden Lactobacillales. Este orden incluye seis familias: Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae y Streptococcaceae (Mora-Villalobos *et al.*, 2020).

Generalmente se encuentran en las plantas, formando parte de la microbiota epífita, en productos lácteos y también se han aislado del ambiente marino. Muchas BAL son consideradas por la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) como seguras para su uso en los alimentos (GRAS: Generalmente Reconocida como Segura).

Como su nombre lo indica, son productoras de ácido láctico, a partir de la fermentación de azúcares. Durante siglos, esta particularidad ha desempeñado un papel muy importante en la industria alimentaria, mejorando las propiedades organolépticas (sabor, aroma y textura) como así también reduciendo los riesgos microbiológicos (Parra Huertas, 2010).

Durante la fermentación, las BAL no solo conservan el alimento mediante la producción de ácido láctico, sino que también son productoras de bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados mayoritariamente por BAL, que poseen una importante actividad biológica: inhibir el crecimiento de cepas patógenas y/o deteriorantes de alimentos, como, por ejemplo, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* o *Clostridium botulinum* (Lahiri *et al.*, 2022).

El impacto beneficioso de estos microorganismos no se limita solo a la preservación del producto, sino que se extiende a la fisiología del consumidor. Los procesos de

hidrólisis y biotransformación enzimática realizados por bacterias de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, entre otras, sobre las matrices vegetales, aumentan la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos (Ozidal *et al.*, 2016). Por consiguiente, el proceso fermentativo podría considerarse como una herramienta biotecnológica que permite aumentar las características nutricionales para el consumidor.

## 1.5 Diabetes

La diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico crónico que se caracteriza principalmente por el aumento de la concentración de glucosa en sangre y conduce a patologías de largo término como complicaciones microvasculares y macrovasculares, neuropatías, retinopatías y nefropatías (Harreiter, J., & Roden, M., 2023). Se estima que en la actualidad 589 millones de personas padecen esta enfermedad, por lo cual es considerada de importancia a nivel mundial (Federación Internacional de Diabetes, 2025).

La DM puede clasificarse en diferentes tipos, como ser la DM de tipo I que suele detectarse antes de los 25 años de edad, y es causada principalmente por la destrucción autoinmune de células  $\beta$  o la secreción de insulina defectuosa. La DM de tipo II, por el contrario, se declara normalmente pasados los 25 años de edad y representa el 95% de los casos de diabetes a nivel mundial (Punthakee *et al.*, 2018). En Argentina, la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo indica que afecta aproximadamente al 12,7% de la población. No obstante la existencia de factores genéticos, la enfermedad puede prevenirse en la mayoría de los casos

Uno de los principales signos de la DM de tipo II es la hiperglucemia post-prandial, lo cual se relaciona directamente con el tipo de dieta y un estilo de vida sedentario (Barber *et al.*, 2021). Existen evidencias que indican que una dieta rica en hidratos de carbono (HC), como los presentes en los cereales altamente procesados (como la harina y el arroz blanco), puede incrementar la predisposición a padecer DM tipo II. Esto se debe a que son fácilmente hidrolizados en el organismo, produciendo una rápida elevación de glucosa en sangre (Zaharudin *et al.*, 2018).

La hidrólisis de los HC es llevada a cabo por diversas enzimas durante las etapas de la digestión, entre ellas,  $\alpha$ -glucosidasa y la  $\alpha$ -amilasa. La enzima  $\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1) es producida en las glándulas salivares y en el páncreas (Assefa *et al.*, 2020) e hidroliza los enlaces  $\alpha$  1,4-glucosídicos de los polisacáridos (almidón y glucógeno) obteniéndose dímeros de maltosa (Figura 3.a). Las  $\alpha$ -glucosidasas (EC 3.2.1.20/3) son un grupo de enzimas que se expresan principalmente en el intestino delgado (Elferink *et al.*, 2020). Estas últimas hidrolizan los enlaces  $\alpha$  1,4-glucosídicos de los oligo o disacáridos convirtiéndolos en monosacáridos que son absorbidos por el yeyuno (Figura 3.b).

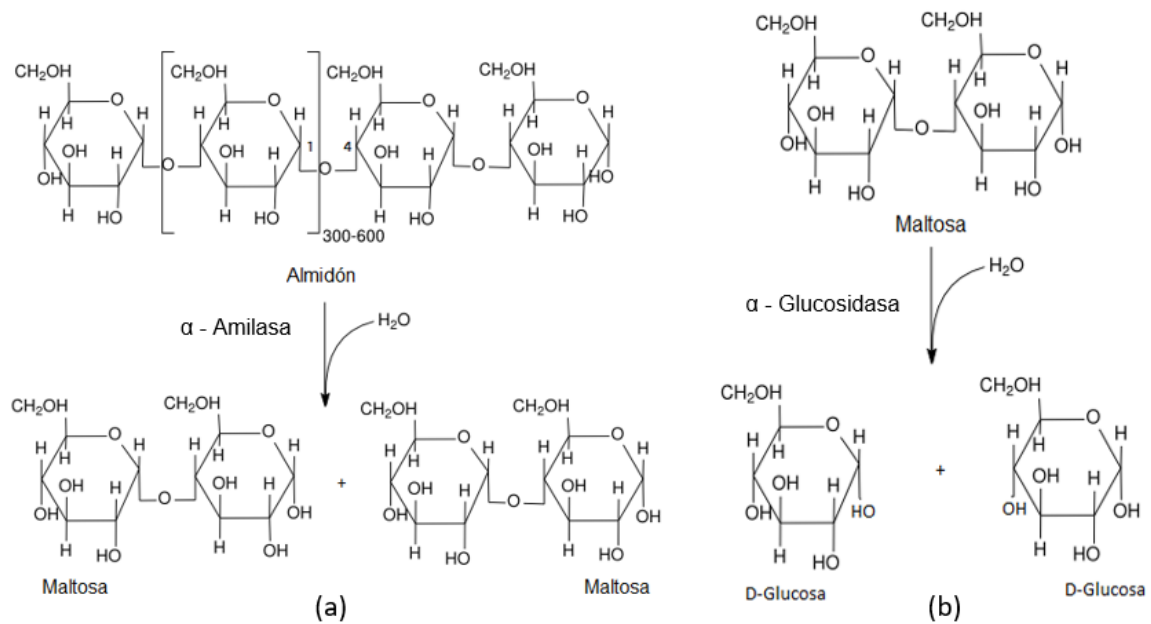


Figura 3: Reacción de hidrólisis del almidón, mediada por la enzima  $\alpha$ -amilasa (a) y reacción de hidrólisis de la maltosa, mediada por la enzima  $\alpha$ -glucosidasa (b).

Un enfoque terapéutico eficaz para controlar la hiperglucemia asociada con la diabetes tipo 2 es actuar sobre la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa. Dentro de los tratamientos, los más habituales son los que se basan en la administración de como la metformina, la acarbosa y la voglibosa.

El principal mecanismo de acción de la metformina implica la reducción de la gluconeogénesis hepática, lo que genera una disminución de glucosa en sangre, a su vez, altera el recambio de glucosa en el intestino y disminuye su absorción, mientras que tanto la voglibosa como la acarbosa son inhibidores competitivos de las  $\alpha$ -glucosidasas y la  $\alpha$ -amilasa, es decir, disminuyen y retardan la hidrólisis de los HC y su posterior absorción en las microvellosidades del intestino delgado (Dabhi *et al.*, 2013; Calle Pascual A. L. & Charro Salgado A. L., 2021; DrugBank, 2026). No obstante la utilización prolongada de dichos fármacos, puede derivar en efectos secundarios como malestar estomacal, flatulencia y diarrea (Kashtoh, H. & Baek, K.H., 2023). Por este motivo, diversos grupos de investigación se han dedicado al desarrollo de nuevos inhibidores, de origen natural (principalmente polifenoles), eficaces y con mínimos efectos secundarios (Papoutsis *et al.*, 2021).

La inhibición enzimática se clasifica según la forma en que el inhibidor interactúa con la enzima y afecta sus parámetros cinéticos: la  $V_{m\acute{a}x}$  (velocidad máxima), que representa la capacidad de saturación de la enzima, y la  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten), que indica la afinidad de la enzima por su sustrato (a menor  $K_m$ , mayor afinidad). En la inhibición competitiva, el inhibidor se une al sitio activo, aumentando la  $K_m$  (disminuye la afinidad aparente) pero manteniendo la  $V_{m\acute{a}x}$  inalterada, ya que el efecto se revierte con exceso de sustrato. En la inhibición no competitiva, el inhibidor se une a un sitio alostérico, reduciendo la  $V_{m\acute{a}x}$  sin afectar la  $K_m$ , debido a que no interfiere con la unión del sustrato sino con la capacidad catalítica. Finalmente, en la inhibición mixta, el inhibidor puede unirse tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato, lo que resulta en una disminución de la  $V_{m\acute{a}x}$  y una alteración de la  $K_m$  (Assefa *et al.*, 2020).

Las brasicáceas constituyen un modelo de trabajo que permite determinar la influencia que ejercen los procesos bioquímicos durante la fermentación en el aporte de metabolitos relacionados con la nutrición y la salud. Estudios realizados por otros investigadores han demostrado el aumento de compuestos bioactivos en vegetales fermentados y las propiedades funcionales que exhiben las algas marinas, especialmente *U. pinnatifida*. Sin embargo, no hay registros de su inclusión como suplemento de una fermentación controlada en matrices vegetales y la potencial inhibición de enzimas relacionadas con la DM tipo 2.

Mediante lo expuesto previamente, el presente proyecto de trabajo final busca, bajo un enfoque biotecnológico, desarrollar productos alimenticios funcionales y novedosos, que no sólo contribuyen a mejorar el perfil nutricional de la población, sino también, a aprovechar un recurso local, como lo es el alga undaria. Combinar el potencial biotecnológico de las brasicáceas con las propiedades del alga puede ser una estrategia para abordar la diabetes tipo 2.

## Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Mediante lo expuesto previamente, el presente proyecto de trabajo final busca, bajo un enfoque biotecnológico, desarrollar productos alimenticios funcionales y novedosos, que no sólo contribuyen a mejorar el perfil nutricional de la población, sino también, a aprovechar un recurso local, como lo es el alga undaria. Combinar el potencial biotecnológico de las brasicáceas con las propiedades del alga es una estrategia innovadora que podría contribuir al abordaje nutricional de la diabetes tipo 2.

#### 2.1.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa, relacionadas con la diabetes tipo 2 de los extractos acuosos y metanólicos de las fermentaciones espontáneas y controladas de brasicáceas y alga undaria.
- Determinar el tipo de inhibición de los extractos acuosos y metanólicos sobre la actividad de enzimas relacionadas con la diabetes tipo 2.
- Evaluar la calidad microbiológica de los alimentos procesados mediante fermentación espontánea y controlada.

## Materiales y métodos

### 3. 1 Material Biológico

#### 3.1.1 Cepas seleccionadas

El Laboratorio de Biotecnología Bacteriana (FCNyCS-Sede Trelew) cuenta con un cepario de más de 400 cepas de BAL provenientes de la fermentación espontánea de brasicáceas (akusai, pak choi, repollo blanco y colorado). Se utilizaron cepas de los géneros *Lactiplantibacillus* y *Leuconostoc* (Tabla 1); cepas con estatus GRAS para uso en alimentos. La selección se realizó sobre la base de sus capacidades tecnológicas y/o funcionales, consideradas adecuadas para alcanzar el objetivo del plan de trabajo propuesto. Las cepas se repicaron a agar de Man, Rogosa & Sharp (MRS) (Biokar, Francia) para su reactivación y posterior estudio.

Inóculo	Cepas*	Nº GenBank	Origen	
1	RCTw1.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>jonggajibkimchii</i>	MT702992	Repollo colorado
	RBTw100	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i>	MT178435	Repollo blanco
2	RBTw102	<i>Lactiplantibacillus argenteratensis</i>	MT178436	Repollo blanco
	AKTw180	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MT178440	Akusai
	AKTw332	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	MT178445	Akusai

\*Taxonomía según Zheng *et al.* (2020).

Tabla 1: Cepas de BAL seleccionadas como inóculos

### 3.1. 2 Brasicáceas

Se utilizaron ejemplares de akusai (*Brassica rapa* L. var. *glabra* Regel), repollo colorado y blanco (*B. oleracea* ssp. *capitata* (L.) Metzg), todos cultivados en el Valle Inferior del Río Chubut en la temporada verano-invierno. El procesamiento de los vegetales para el ensayo se realizó individualmente. Este proceso incluyó la eliminación de las partes externas secas o dañadas del bulbo, el lavado de las hojas restantes y su posterior corte en tiras de aproximadamente 2 mm de grosor.

### 3.1.3 Undaria pinnatifida

La recolección del alga *U. pinnatifida* se realizó durante las temporadas invierno-primavera del 2024 en las áreas costeras del Golfo Nuevo (Puerto Madryn). Los ejemplares se obtuvieron de forma aleatoria por buceo autónomo a profundidades que variaron de 3 a 15 metros, cortándose manualmente justo por encima de su base (el grampón) de los sustratos duros. Los ejemplares se conservaron en bolsas plásticas herméticas a -30 °C hasta el momento de su procesamiento.

Los ensayos se realizaron solo con las láminas de undaria, para tal fin se lavaron con agua corriente y se les eliminó la nervadura. Posteriormente, se sumergieron en una solución con 100 ppm de lavandina comercial apta para frutas y verduras (3,5% hipoclorito de sodio) durante 5 min para su sanitización. Finalmente, las láminas se enjuagaron nuevamente con agua corriente y se procesaron con un mixer de 400 W (Atma LM 852, Kunshan, China) durante 5 min para su posterior uso.

## 3.2 Fermentaciones

Se realizaron fermentaciones controladas y espontáneas de 3 matrices vegetales: akusai, repollo colorado y repollo blanco en combinación con el alga undaria, denominadas AKU, RCU y RBU, respectivamente. La fermentación espontánea se llevó a cabo con el objetivo de comparar las diferencias entre ambos procesos.

### 3.2.1 Fermentación controlada (FC)

La matriz de fermentación se preparó mezclando cada vegetal con la lámina de *Undaria pinnatifida* previamente procesada en una relación 80:20. Posteriormente se agregó NaCl de grado alimentario (3% m/m) y se mezcló con una espátula de madera hasta lograr una distribución homogénea. El material se fraccionó en frascos de vidrio con capacidad de 300 cc, los cuales se llenaron con el material a fermentar utilizando un pilón para compactarlo. Luego, los frascos se sometieron a un tratamiento térmico en autoclave a 120 °C durante 3 min con el objetivo de reducir la microbiota epífita inicial presente en los vegetales, sin buscar la esterilización completa del sistema. Posteriormente, los frascos se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de continuar con el proceso de fermentación.

Las 5 cepas de BAL previamente seleccionadas por sus propiedades biotecnológicas se sembraron en 2 ml de caldo MRS y se incubaron durante 12 h a 30°C. Se prepararon dos inóculos, el primero conformado por dos cepas del género *Leuconostoc* y el segundo, por tres cepas del género *Lactiplantibacillus* (Tabla 1).

Las tres matrices destinadas a los experimentos se inocularon en dos etapas con cultivos microbianos específicos, siguiendo la metodología propuesta por Jagannath *et al.*, (2012). Al comienzo del proceso (tiempo 0), se agregó el primer inóculo (cepas de *Leuconostoc*) y se realizó una primera incubación durante 3 días a 18°C. El segundo inóculo (cepas de *Lactiplantibacillus*) se adicionó en la segunda etapa, cuando el pH se encontraba próximo a 4,0. La fermentación continuó a la misma temperatura (18°C) durante los 27 días restantes.

### 3.2.2 Fermentación espontánea (FE)

El vegetal y el alga se procesaron como se mencionó anteriormente y se adicionó NaCl al 3% (m/m), pero a diferencia de los ensayos controlados, estos no se esterilizaron, como tampoco se inocularon con las cepas seleccionadas. Los frascos se incubaron a la misma temperatura por el mismo periodo (30 días, 18°C).

### 3.2.3 Calidad microbiológica

Para evaluar la calidad microbiológica de los productos fermentados, se homogeneizaron las muestras mediante una dilución inicial (1/10) en agua estéril destilada. A partir de allí, se realizaron diluciones seriadas empleando el método de dilución en gota.

La cuantificación de microorganismos se realizó bajo las siguientes condiciones:

- Aerobios totales: recuento en agar PCA (Biokar, Francia) durante 48 h de incubación a 30 °C.
- Levaduras y hongos: recuento en agar Sabouraud (Biokar, Francia) suplementado con vancomicina 30 mg/l y ácido nalidíxico 20 mg/l para inhibir el crecimiento de bacterias Grampositivas y Gramnegativas respectivamente, incubados a 25 °C durante 5 días.
- Coliformes totales: recuento en agar violeta rojo bilis (Biokar, Francia), mediante técnica de doble capa a 30 °C durante 24 h.

Todos los análisis se hicieron por triplicado y los recuentos se reportaron en log UFC/g.

### 3.3 Preparación de extractos

Se tomaron muestras tanto de las FC como de las FE, de las tres matrices, al final del proceso fermentativo (día 30) y se procedió a su desecación en estufa a 30 °C hasta peso constante.

El extracto acuoso se obtuvo a partir de 1 g del material seco suspendido en 10 ml de agua destilada y luego se trató en autoclave a 120 °C durante 15 min. El extracto metanólico se obtuvo a partir de 1 g de material seco suspendido en 10 ml de metanol y con agitación durante 3 h a 37 °C. Posteriormente en ambos casos los extractos se centrifugaron a 3.000 rpm y los sobrenadantes obtenidos se conservaron a -20 °C hasta el momento de su procesamiento.

### 3.4 Inhibición de enzimas vinculadas con la diabetes

El ensayo enzimático consistió en evaluar la actividad inhibitoria, de metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos en el punto 3.3, sobre las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa. El procedimiento para evaluar la actividad inhibitoria se realizó siguiendo el protocolo descrito por Proença *et al.* (2019), con las modificaciones que se mencionan a continuación: se utilizaron diluciones seriadas de almidón soluble como sustrato para la enzima  $\alpha$ -amilasa en lugar del sustrato 2-cloro-p-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltotriósido; y diluciones seriadas de maltosa como sustrato para la enzima  $\alpha$ -glucosidasa en lugar del sustrato 4-nitrofenil  $\alpha$ -D-glucopiranosido.

En ambos casos, como control enzimático, se incubó la enzima con el sustrato sin presencia de inhibidor. La concentración final de maltosa y glucosa se determinó siguiendo el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa GOD-POD (Wiener, Argentina).

#### 3.4.1 Inhibición de $\alpha$ -amilasa

Para determinar la actividad de la enzima se utilizó almidón soluble como sustrato. Se preparó una solución madre (concentración 16 mM) y se realizaron cinco diluciones al medio en buffer Z (100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 10 mM KCl; 1,6 mM  $\text{MgSO}_4$ , pH=6,8), obteniendo concentraciones finales de 8; 4; 2; 1 y 0,5 mM.

Las pruebas de inhibición se realizaron incubando previamente 500  $\mu\text{l}$  de  $\alpha$ -amilasa pancreática porcina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), en una concentración de 30 mg/ml en buffer Z, con 50  $\mu\text{l}$  de los extractos realizados según se indica en el punto 3.3, durante 1 h a 36 °C en baño seco. En el caso del control, se incubó 100  $\mu\text{l}$  de la enzima con 10  $\mu\text{l}$  de metanol o agua destilada, según el tipo de extracto que se utilizó para cada ensayo.

Luego, la mezcla de enzima + extracto se fraccionó en partes iguales en series de 5 tubos eppendorf por cada tratamiento (control, FC y FE).

Posteriormente, se añadieron 100  $\mu$ l de las diluciones de almidón a cada tubo y se incubó a 40°C en baño seco durante 15 min. Por último, se determinó la concentración de maltosa utilizando la técnica GOD-POD, midiendo la absorbancia a 505 nm según el trabajo de Visvanathan *et al.* (2018).

#### 3.4.2 Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa

La enzima  $\alpha$ -glucosidasa se obtuvo de *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura se cultivó en primer lugar en un medio líquido con 1% de glucosa, 1% de peptona y 0,5% de extracto de levadura durante 24 h; luego, se incubó durante 24 h más, reemplazando la glucosa por 1% de maltosa. Para la obtención de la enzima las células se lisaron y re-suspendieron en buffer Z.

Los ensayos de inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa se evaluaron utilizando diluciones seriadas de maltosa como sustrato. Se incubó en baño seco a 36 °C durante 1 h 500  $\mu$ l de la suspensión de levaduras con 50  $\mu$ l de los extractos utilizados en el punto 3.3. En el caso del control, se incubó 100  $\mu$ l de la suspensión de levaduras con 10  $\mu$ l de metanol o agua destilada, según el tipo de extracto que se utilizó para cada ensayo.

Luego, la mezcla de enzima + extracto se fraccionó en partes iguales en series de 5 tubos eppendorf por cada tratamiento (control, FC y FE) y se añadieron 100  $\mu$ l de cada dilución de maltosa. Se incubó durante 40 min en baño seco, a 36 °C.

Por último, se procedió a centrifugar a 12000 *g* durante 2 min. Se determinó la concentración de glucosa utilizando el método GOD-POD, midiendo la absorbancia a 505 nm.

Ambos ensayos de inhibición siguieron el siguiente flujo de trabajo, con las condiciones especificadas anteriormente para cada enzima.

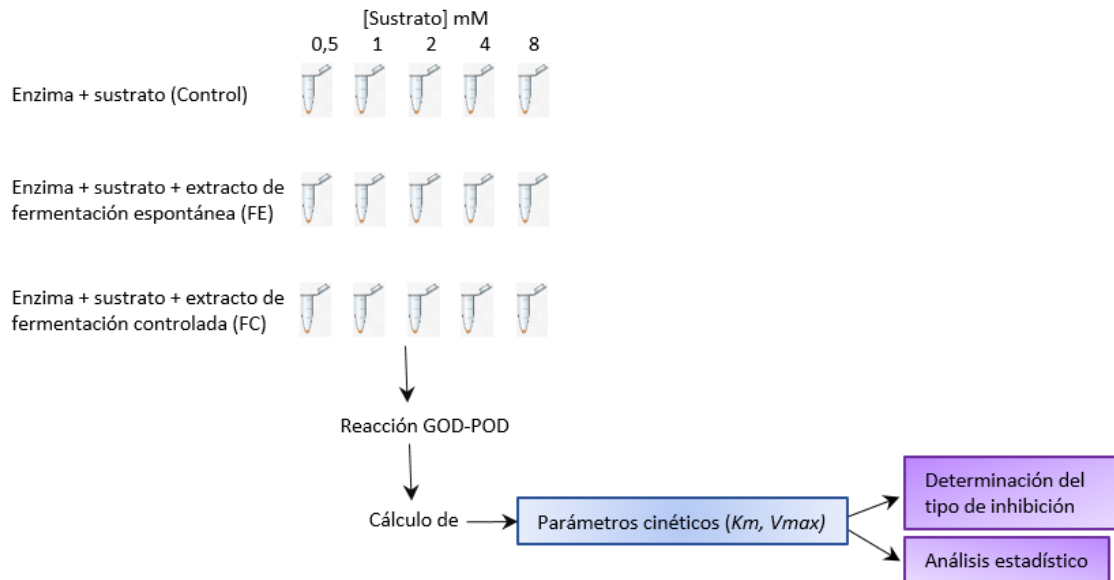


Figura 4: Esquema general de los ensayos inhibitorios

### 3.4.3 Determinación del tipo de inhibición

Se utilizó el modelo cinético de Michaelis-Menten, mediante la gráfica de Lineweaver-Burk (LB), a partir de la cual se obtuvieron los valores de la constante de Michaelis ( $K_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) para cada enzima. A partir de estos parámetros cinéticos se determinó el tipo de inhibición de los extractos acuosos y metanólicos sobre la actividad de la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa.

### 3.5 Análisis Estadístico

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. Se evaluó la normalidad y homogeneidad de la varianza de los datos. En caso de cumplirse los supuestos, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con un test post-hoc de Tukey. De no cumplirse dichos supuestos, se empleó el análisis de Kruskal-Wallis con un nivel de  $p < 0,05$ , utilizando el software estadístico R Studio para Windows.

## Resultados y discusión

### 4.1 Fermentaciones

La fermentación de las brasicáceas y el alga undaria se llevó a cabo mediante dos tipos de procesos: fermentación espontánea y controlada, con el propósito de comparar su potencial inhibición contra enzimas relacionadas con la DM tipo 2.

En trabajos previos, Parada *et al.* (2023) realizaron el aislamiento, la caracterización tecnológica y la selección de BAL para conformar los cultivos iniciadores a partir de fermentaciones espontáneas de brasicáceas. Un primer cultivo se conformó por dos cepas de *Leuconostoc*, la cepa *Ln. mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* RCTw1.1 y *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum* RBTw100, seleccionadas por su mayor capacidad acidificante y actividad dextransacarasa. El segundo cultivo iniciador, se conformó con tres cepas de *Lactiplantibacillus*, las cepas *L. plantarum* AKTw180 y *L. argentoratensis* RBTw102 por su capacidad acidificante, y esta última también por su actividad inhibitoria frente a *L. innocua* y *L. monocytogenes* y exhibir diversos genes de plantaricinas. La cepa *L. pentosus* AKTw332 se seleccionó por su actividad antilisteria y por presentar diversos genes de plantaricinas.

El proceso fermentativo se evaluó en tres modelos de Brassica: akusai, repollo blanco y repollo colorado, suplementados con un 20% de alga undaria (AKU, RBU y RCU). Se realizó la determinación del pH y el recuento de BAL al inicio y al final de la fermentación (día 30) en ambos procesos (FC y FE).

Tal como se indicó anteriormente, el pH es un parámetro crítico para el monitoreo del proceso, dado que el ácido láctico es el producto principal de este tipo de fermentación. Aunque los tres modelos iniciaron en condiciones uniformes (pH≈6), los valores finales mostraron ligeras variaciones entre los tratamientos (fermentación controlada / espontánea): el modelo RBU alcanzó los niveles más bajos de pH ( $3,63\pm 0,04$  controlado y  $3,70\pm 0,01$  espontáneo), seguido por el AKU ( $3,68\pm 0,06$  y  $3,98\pm 0,04$ ) y, finalmente, el RCU con valores de  $3,72\pm 0,01$  y  $4,04\pm 0,06$ , respectivamente.

En cuanto a la viabilidad de las BAL, en la fermentación espontánea los tres modelos estudiados mostraron un recuento de  $\approx 4$  log UFC/g al inicio del proceso. En las fermentaciones controladas, se realizó una inoculación inicial de *Leuconostoc* spp. ( $\approx 5$  log UFC/g), lo que permite una acidificación temprana del sustrato según los resultados de Parada *et al.* (2023). Esta etapa es crítica, ya que el descenso del pH limita el crecimiento de microbiota competidora o alterante desde las primeras horas. Al alcanzar un pH próximo a 4,0 (día 3), siguiendo las recomendaciones de Jagannath *et al.* (2012) se adicionó el segundo inóculo de *Lactiplantibacillus* spp. ( $\approx 5$  log UFC/g), lo que aseguró la continuidad del proceso fermentativo.

Transcurrido el periodo de 30 días, el modelo AKU presentó recuentos similares en ambos procesos ( $\approx 6$  log UFC/g). En contraste, los modelos RBU y RCU exhibieron un patrón distinto, donde la fermentación espontánea mantuvo poblaciones superiores ( $\approx 7$  y  $6,5$  log UFC/g, respectivamente) en comparación con la fermentación controlada, que finalizó con valores de  $5,9$  y  $5,8$  log UFC/g para RBU y RCU, respectivamente.

A diferencia de lo observado por Brochu (2018), quien asoció la presencia de algas con una acidificación menos pronunciada, en este estudio los modelos AKU, RBU y RCU bajo condiciones controladas lograron valores inferiores a 4,0. Este resultado es fundamental, ya que cumple con las exigencias del CAA (Art. 976) para la denominación oficial de “chucrut”.

## 4.2 Calidad microbiológica

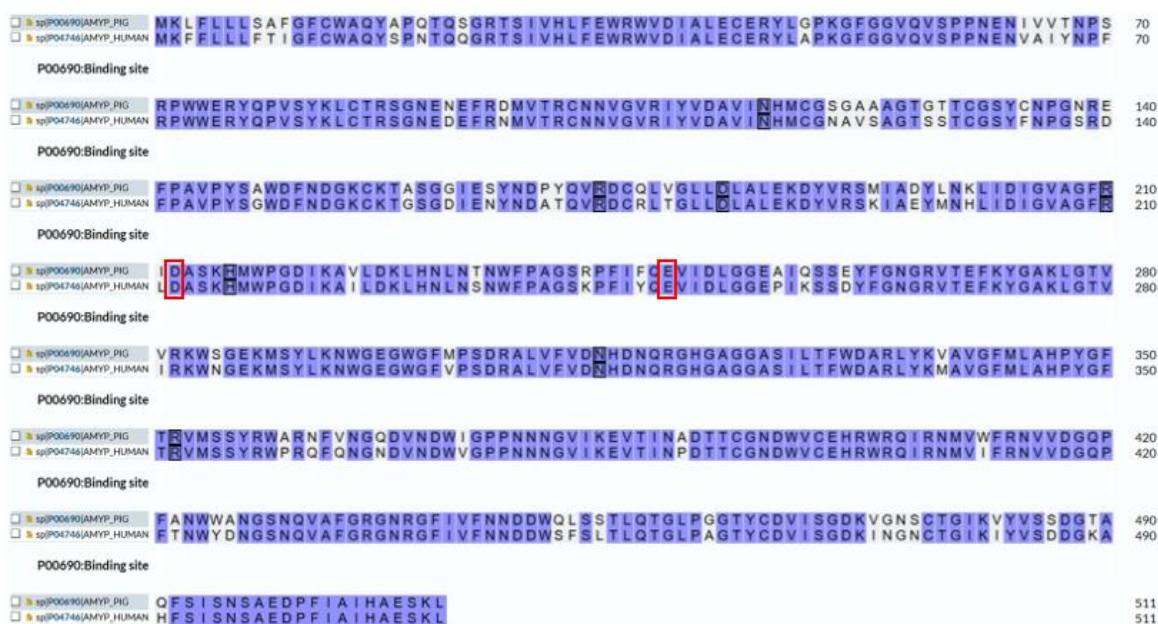
El análisis de control microbiológico se realizó en los productos obtenidos luego de 30 días de fermentación. Tanto en AKU como en RCU, se detectó  $<1$  log UFC/g de hongos y levaduras, mientras que para RBU el valor fue de  $2,5 \pm 0,31$  log UFC/g. En cuanto a aerobios totales, los valores del recuento fueron de  $4,70 \pm 0,16$  log UFC/g;  $4,81 \pm 0,37$  log UFC/g y  $4,85 \pm 0,02$  log UFC/g para AKU, RBU y RCU, respectivamente. No se detectaron coliformes totales en ninguna de las matrices.

### 4.3 Inhibición enzimática

En el presente trabajo se utilizaron dos enzimas como modelos para ensayar los efectos inhibitorios que tienen los extractos obtenidos a partir de las fermentaciones, la  $\alpha$ -amilasa pancreática porcina y la  $\alpha$ -glucosidasa obtenida de *S. cerevisiae*.

#### 4.3.1 Inhibición de $\alpha$ -amilasa

Para verificar la similitud estructural, se realizó un alineamiento de secuencias de aminoácidos entre la  $\alpha$ -amilasa humana (P04746) y la porcina (P00690) utilizando la herramienta de alineamiento de la base de datos UniProt (UniProt Consortium, 2023). El análisis reveló una identidad de secuencia del 86,3%, con una conservación total de los residuos que conforman el sitio activo, validando el uso de la enzima de origen porcino como modelo experimental para evaluar los diferentes tipos de inhibición (Figura 5).



Los recuadros negros indican los residuos pertenecientes a los sitios de unión y los rojos a los del sitio activo (en ambos casos, una similitud del 100%).

Figura 5: Alineamiento de secuencias de aminoácidos entre la  $\alpha$ -amilasa humana (P04746) y la porcina (P00690).

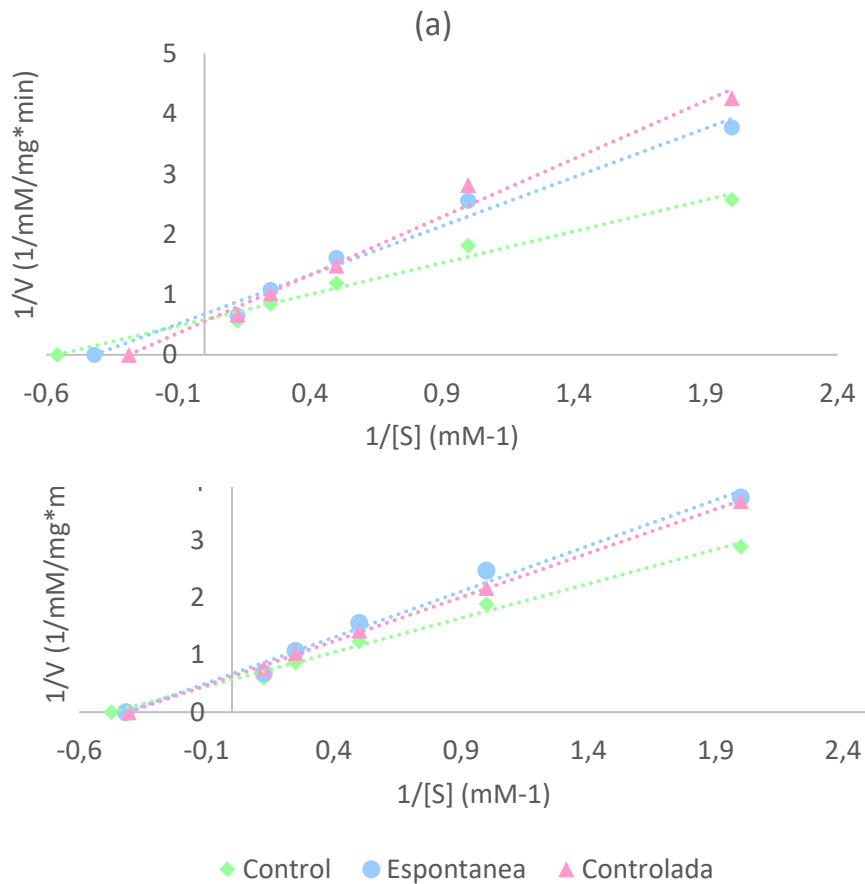
Los ensayos de inhibición realizados *in vitro* sobre la  $\alpha$ -amilasa con el extracto acuoso de AKU mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para el  $K_m$ , indicando

una inhibición de tipo competitiva sobre la enzima. El extracto metanólico no exhibió diferencias significativas en los parámetros cinéticos evaluados ( $p > 0,05$ ) (Tabla 2).

	<b>Acuoso</b>		<b>Metanólico</b>	
	<i>Km</i>	<i>V<sub>máx</sub></i>	<i>Km</i>	<i>V<sub>máx</sub></i>
<b>Control</b>	1,80±0,08 <sup>a</sup>	1,80±0,11 <sup>a</sup>	2,16±0,05 <sup>a</sup>	1,79±0,02 <sup>a</sup>
<b>Espontánea</b>	2,49±0,55 <sup>a</sup>	1,55±0,39 <sup>a</sup>	2,47±0,43 <sup>a</sup>	1,55±0,44 <sup>a</sup>
<b>Controlada</b>	4.98±0.51 <sup>b</sup>	1,75±0,41 <sup>a</sup>	2,59±0,68 <sup>a</sup>	1,77±0,51 <sup>a</sup>

Tabla 2: valores de los parámetros cinéticos obtenidos de la inhibición de  $\alpha$ -amilasa con akusai + alga undaria

Los gráficos de Linewaver-Burk (LB) (Figura 6) muestran correspondencia con estos resultados para la *V<sub>máx</sub>* de ambos extractos, ya que puede observarse que las líneas de tendencia atraviesan el eje Y aproximadamente en el mismo punto. En el caso de la *Km*, en el gráfico correspondiente a los extractos metanólicos se observa un comportamiento similar tanto para el caso de la fermentación espontanea como de la fermentación controlada, no así con los extractos acuosos, donde se puede observar que el valor de *Km* correspondiente para la FC es superior al valor de la fermentación espontánea y el control.



Cada punto representa la media de 3 repeticiones.

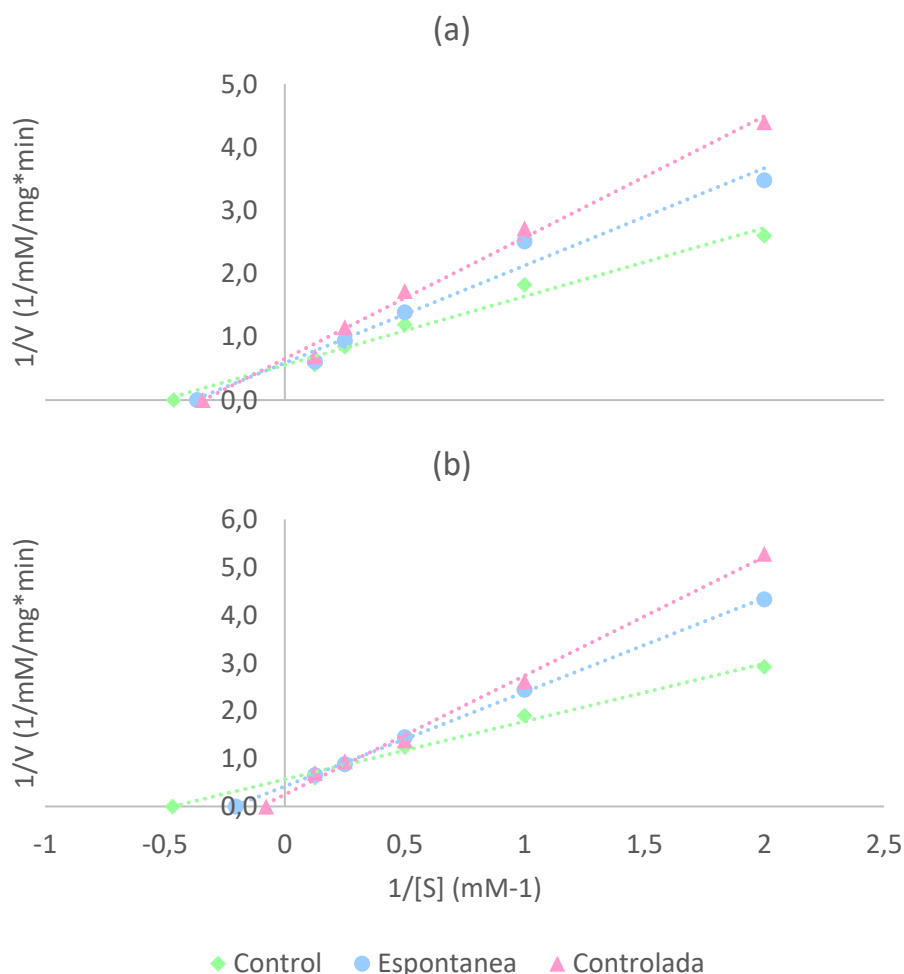
Figura 6: Gráfico de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa por los extractos acuoso (a) y metanólico (b) obtenidos a partir de la fermentación espontánea y controlada de AKU.

En el caso de los extractos obtenidos a partir del repollo blanco suplementado con el alga, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) únicamente con los extractos metanólicos, entre la  $V_{m\acute{a}x}$  del control y la FC, y entre la FE y FC. En cuanto a la  $K_m$ , sólo se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y la FC. Si bien no se observaron dichas diferencias en los valores de  $K_m$  entre los tratamientos control y FE, el valor promedio correspondiente a la fermentación espontánea fue aproximadamente el doble del observado en el control, lo que podría sugerir una tendencia a una menor afinidad aparente de la enzima por el sustrato bajo estas condiciones.

Estos datos estarían indicando una inhibición de tipo mixta en el caso del extracto metanólico obtenido a partir de la FC y de tipo competitiva en el caso del mismo extracto obtenido a partir de la FE (Tabla 3). Puede observarse en la figura 7 que el análisis estadístico se condice con los gráficos de LB.

	Acuoso		Metanólico	
	$K_m$	$V_{m\acute{a}x}$	$K_m$	$V_{m\acute{a}x}$
<b>Control</b>	1,79±0,08 <sup>a</sup>	1,80±0,1 <sup>a</sup>	2,15±0,05 <sup>a</sup>	1,78±0,01 <sup>a</sup>
<b>Espontánea</b>	2,68±1,05 <sup>a</sup>	1,71±0,36 <sup>a</sup>	4,55±0,39 <sup>ab</sup>	2,32±0,05 <sup>a</sup>
<b>Controlada</b>	3,44±2,03 <sup>a</sup>	1,72±0,78 <sup>a</sup>	8,91±0,09 <sup>b</sup>	3,66±0,55 <sup>b</sup>

Tabla 3: valores de los parámetros cinéticos obtenidos de la inhibición de  $\alpha$ -amilasa con repollo blanco + alga undaria



Cada punto representa la media de 3 repeticiones.

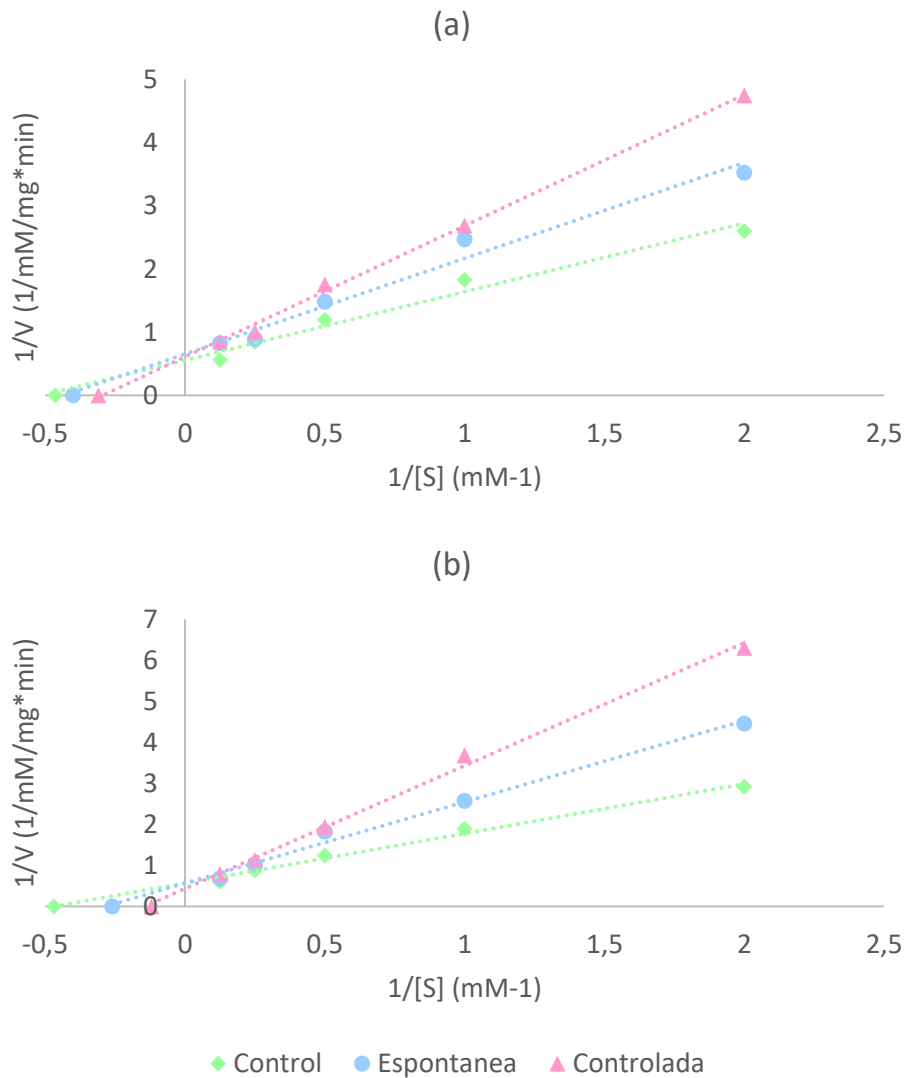
Figura 7: Gráfico de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa por los extractos acuoso (a) y metanólico (b) obtenidos a partir de la fermentación espontánea y controlada de RBU.

Por último, esta enzima también fue ensayada con los extractos acuoso y metanólico obtenidos a partir de las fermentaciones espontánea y controlada del repollo colorado suplementado con undaria. La velocidad máxima no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos. En cambio, para la  $K_m$  se observaron diferencias entre el control y la fermentación controlada para ambos tipos de extractos, así como entre la fermentación espontánea y la controlada en los extractos acuosos (Tabla 4, Figura 8).

Si bien no se observaron diferencias estadísticas entre los valores de  $K_m$  entre los tratamientos FE y FC, el valor promedio correspondiente a la fermentación controlada fue aproximadamente el triple del observado en la fermentación espontánea, lo que podría sugerir una tendencia a una menor afinidad aparente de la enzima por el sustrato bajo estas condiciones.

	<b>Acuoso</b>		<b>Metanólico</b>	
	<i>K<sub>m</sub></i>	<i>V<sub>máx</sub></i>	<i>K<sub>m</sub></i>	<i>V<sub>máx</sub></i>
<b>Control</b>	1,79±0,08 <sup>a</sup>	1,80±0,10 <sup>a</sup>	2,15±0,05 <sup>a</sup>	1,78±0,01 <sup>a</sup>
<b>Espontánea</b>	2,22±0,18 <sup>a</sup>	1,50±0,18 <sup>a</sup>	2,37± 0,0002 <sup>ab</sup>	1,75±0,36 <sup>a</sup>
<b>Controlada</b>	3,48±0,56 <sup>b</sup>	1,69±0,21 <sup>a</sup>	11,15±2,08 <sup>b</sup>	2,61±1,24 <sup>a</sup>

Tabla 4: valores de los parámetros cinéticos obtenidos de la inhibición de  $\alpha$ -amilasa con repollo colorado + alga undaria



Cada punto representa la media de 3 repeticiones.

Figura 8: Gráfico de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa por los extractos acuoso (a) y metanólico (b) obtenidos a partir de la fermentación espontánea y controlada de RCU.

Los parámetros cinéticos obtenidos a partir de las matrices RBU y RCU muestran un aumento tanto en  $K_m$  como en  $V_{m\acute{a}x}$  en presencia de los extractos metanólicos provenientes de las fermentaciones espontánea y controlada respecto del control (Tabla 3 y Tabla 4). Este comportamiento no se ajusta estrictamente a los modelos clásicos de inhibición enzimática. Por lo tanto, si bien los resultados evidencian una interacción entre los compuestos presentes en los extractos y la enzima  $\alpha$ -amilasa,

no es posible establecer con certeza el tipo de mecanismo de inhibición. Serían necesarios ensayos adicionales utilizando distintas concentraciones de inhibidor para confirmar el mecanismo involucrado.

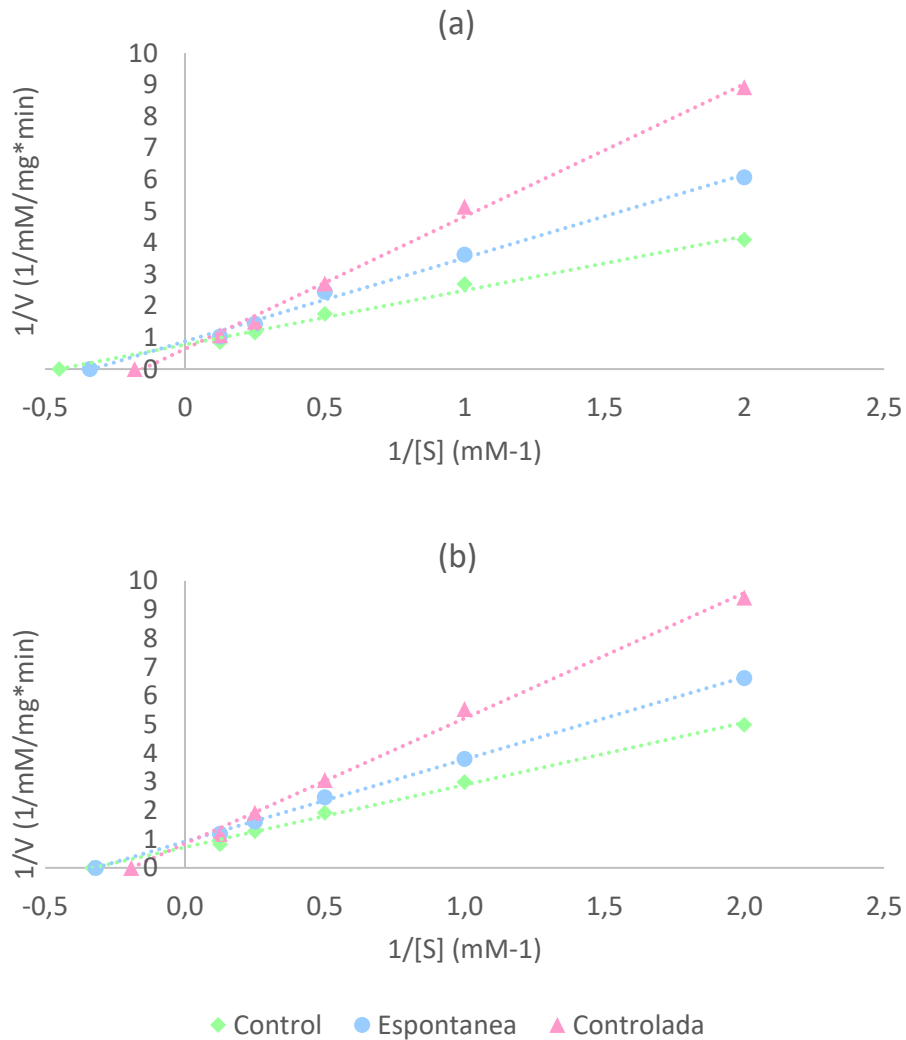
#### 4.2.2 Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa

A pesar de su uso frecuente, la  $\alpha$ -glucosidasa de levadura muestra una similitud estructural de tan solo el 4% con la  $\alpha$ -glucosidasa humana, correspondiente al sitio activo (Damani *et al.*, 2018). Esta diferencia implica que los ensayos realizados con enzimas de levadura solo permiten validar procesos de inhibición competitiva, donde el inhibidor desplaza al sustrato en el sitio catalítico, sin necesariamente representar otros tipos de interacciones alostéricas propias de las enzimas humanas (Rebollar-Ramos *et al.*, 2021).

Los ensayos de inhibición realizados *in vitro* sobre la  $\alpha$ -glucosidasa con los extractos acuoso y metanólico obtenidos de la fermentación de AKU, mostraron diferencias significativas en la  $K_m$  entre el control y la fermentación controlada del extracto acuoso ( $p < 0,05$ ) (Tabla 5).

	<b>Acuoso</b>	<b>Metanólico</b>
	<i>K<sub>m</sub></i>	<i>K<sub>m</sub></i>
<b>Control</b>	2,19±0,11 <sup>a</sup>	3,13±0,12 <sup>a</sup>
<b>Espontánea</b>	3,06±0,13 <sup>ab</sup>	3,29±1,31 <sup>a</sup>
<b>Controlada</b>	7,67±2,54 <sup>b</sup>	5,86±2,50 <sup>a</sup>

Tabla 5: valores de los parámetros cinéticos obtenidos de la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa con akusai + alga undaria



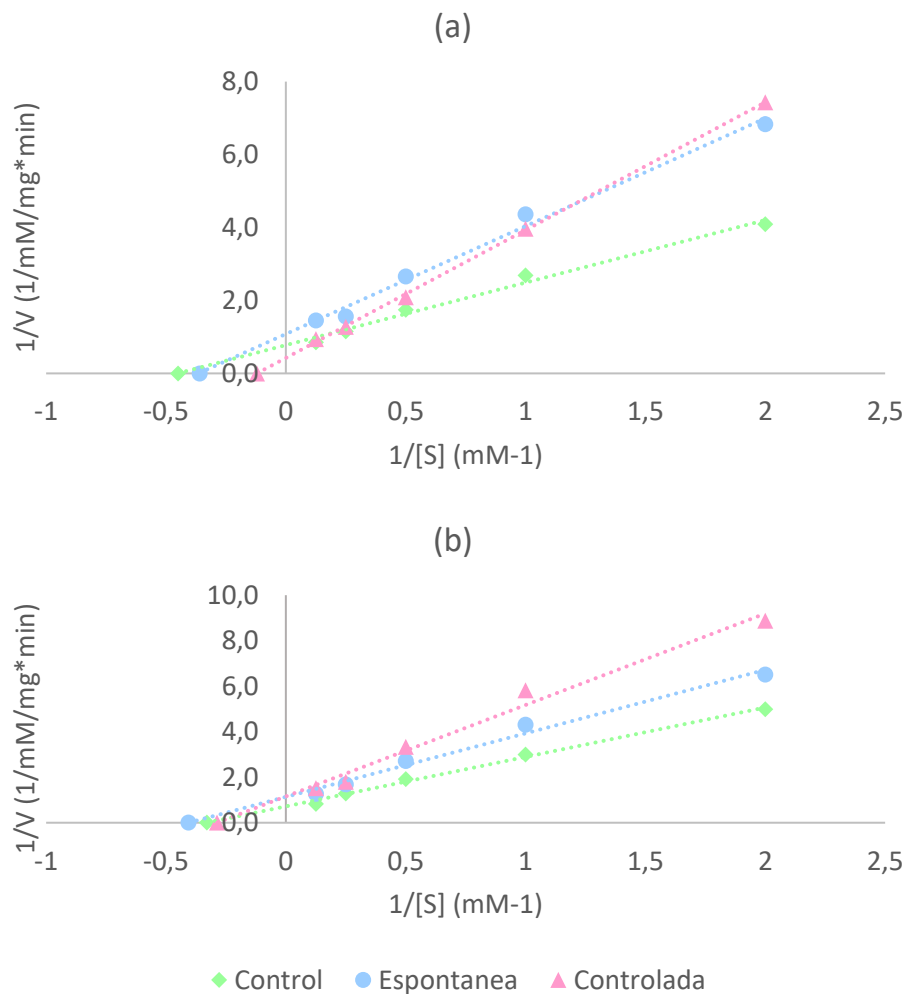
Cada punto representa la media de 3 repeticiones

Figura 9: Gráfico de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa por los extractos acuoso (a) y metanólico (b) obtenidos a partir de la fermentación espontánea y controlada de AKU.

El modelo RBU únicamente exhibió diferencias significativas en la  $K_m$  entre el control y la fermentación controlada de los extractos acuosos, lo que sugiere un mecanismo de inhibición de tipo competitiva sobre la enzima ensayada (Tabla 6).

	Acuoso	Metanólico
	$K_m$	$K_m$
<b>Control</b>	$2,19 \pm 0,10^a$	$3,01 \pm 0,12^a$
<b>Espontánea</b>	$2,71 \pm 0,33^{ab}$	$2,45 \pm 0,03^a$
<b>Controlada</b>	$6,58 \pm 2,34^b$	$3,44 \pm 0,74^a$

Tabla 6: valores de los parámetros cinéticos obtenidos de la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa con repollo blanco + alga Undaria



Cada punto representa la media de 3 repeticiones.

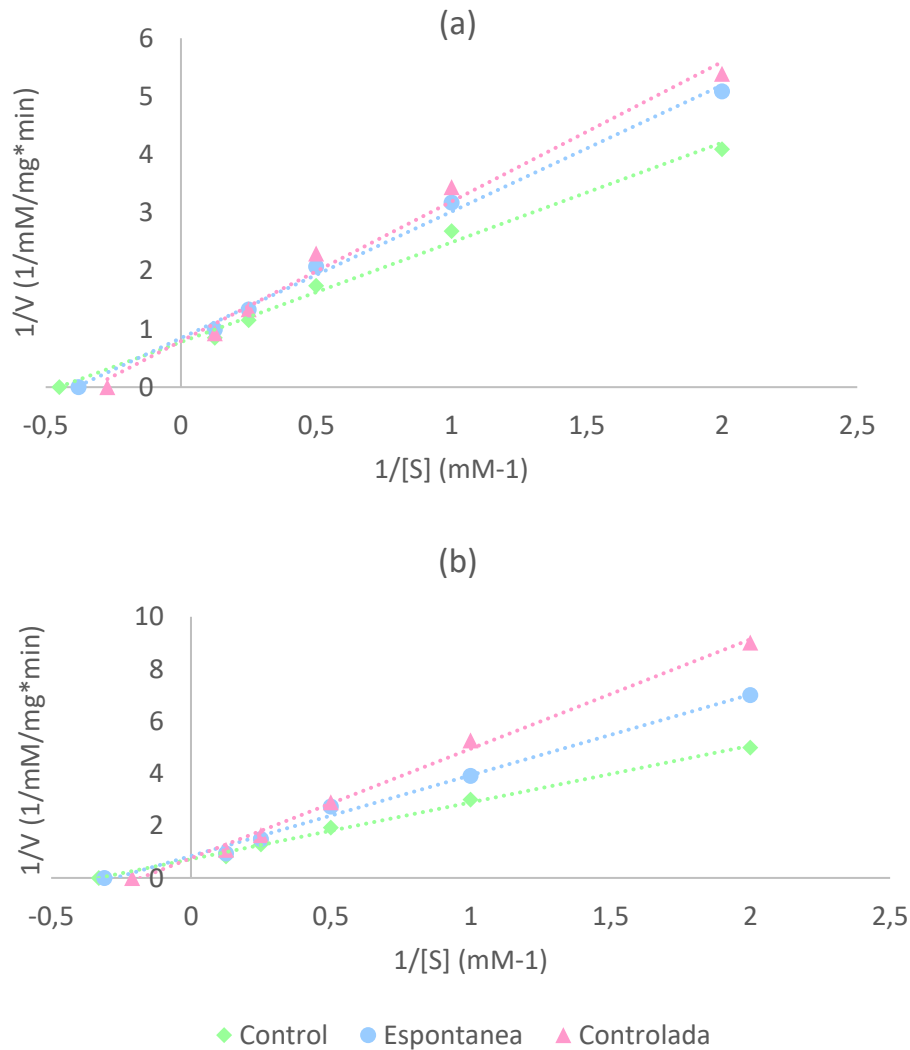
Figura 10: Gráfico de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa por los extractos acuoso (a) y metanólico (b) obtenidos a partir de la fermentación espontánea y controlada de RBU.

En la figura 10, podemos observar que para el extracto metanólico (b) los puntos que cortan el eje X están muy cercanos entre sí, lo que indicaría que las diferencias en la  $K_m$  son mínimas entre los tratamientos. Sin embargo, en el gráfico que corresponde al extracto acuoso, las líneas de tendencia muestran valores de  $1/K_m$  diferentes entre sí.

Por último, se realizó el análisis de los datos obtenidos de la inhibición *in vitro* de la enzima a partir de los extractos acuoso y metanólico obtenidos de las fermentaciones del RCU. Al igual que se observó para la enzima  $\alpha$ -amilasa, se detectó una inhibición de tipo competitiva mediada por el extracto metanólico, ya que se hallaron diferencias significativas sólo entre el valor de  $K_m$  del control y la FC, siendo superior para esta última. En cambio, a diferencia de los resultados obtenidos para  $\alpha$ -amilasa, el extracto acuoso no inhibió la enzima significativamente (Tabla 7). Estas diferencias se ven reflejadas en los gráficos correspondientes (Figura 11).

	<b>Acuoso</b>	<b>Metanólico</b>
	<i>K<sub>m</sub></i>	<i>K<sub>m</sub></i>
<b>Control</b>	2,19±0,08 <sup>a</sup>	3,13±0,12 <sup>a</sup>
<b>Espontánea</b>	2,69±0,91 <sup>a</sup>	3,14±0,06 <sup>a</sup>
<b>Controlada</b>	2,74±0,51 <sup>a</sup>	8,59±2,01 <sup>b</sup>

Tabla 7: valores de los parámetros cinéticos obtenidos de la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa con repollo colorado + alga undaria



Cada punto representa la media de 3 repeticiones.

Figura 11: Gráfico de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa por los extractos acuoso (a) y metanólico (b) obtenidos a partir de la fermentación espontánea y controlada de RCU.

Koh *et al.* (2020), aislaron fucoidano de *U. pinnatifida* y realizaron ensayos *in vitro* sobre las enzimas mencionadas y hallaron una inhibición competitiva sobre la  $\alpha$ -glucosidasa, mientras que para la  $\alpha$ -amilasa la inhibición fue de tipo mixta. Zaharudin *et al.* (2018) estudiaron los efectos inhibitorios de diferentes especies de algas pardas, entre ellas la undaria, sobre la  $\alpha$ -amilasa, determinando una inhibición de tipo mixta. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en este trabajo

para la  $\alpha$ -amilasa de los extractos metanólicos obtenidos a partir de RBU, sin embargo, RCU mostró inhibición de tipo competitiva sobre ambas enzimas.

Según Parada *et al.* (2023), los extractos de RCU exhiben un mayor contenido de compuestos fenólicos totales que el AKU y RBU, esto coincide con trabajos realizados por Tabart *et al.* (2018). Por otro lado, estudios previos han demostrado que los flavonoides, un tipo de compuestos fenólicos, exhiben actividad inhibidora de la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro* (Papoutsis *et al.*, 2021).

Otros trabajos, como el de Podsędek *et al.* (2017) o el de Uuh Narvaez *et al.* (2025), evaluaron el potencial inhibidor de *B. oleracea*, demostrando que las brasicáceas exhiben inhibición tanto competitiva como mixta sobre las enzimas estudiadas.

Los resultados obtenidos son comparables con los antecedentes en cuanto a la existencia de inhibición. Sin embargo, la bibliografía es escasa en relación con matrices de brasicáceas, ensayados tanto de manera individual, como en combinación con el alga undaria, donde se estimen los parámetros cinéticos determinados en este trabajo.

Una limitación operativa fue la elevada desviación estándar observada en algunos valores de  $K_m$ . Esta variabilidad podría atribuirse a la variabilidad experimental inherente al método y al uso del ajuste lineal de Lineweaver–Burk, que tiende a amplificar los errores experimentales, particularmente a bajas concentraciones de sustrato. Esto podría haber contribuido a la dispersión observada entre réplicas. No obstante, pese a estas consideraciones, fue posible identificar inhibiciones de tipo mixto y competitivo en las enzimas ensayadas.

## Conclusiones

El empleo del cultivo iniciador con cepas autóctonas potencia la bioactividad de las brasicáceas utilizadas, esto queda demostrado en un aumento de la inhibición enzimática, en comparación con la fermentación espontánea.

Como se observó en la sección anterior, la enzima  $\alpha$ -amilasa fue inhibida competitivamente por los extractos acuoso y metanólico de RCU, también se detectó una inhibición mixta por el extracto metanólico de RBU y competitiva por el extracto acuoso de AKU. En cambio, la enzima  $\alpha$ -glucosidasa fue inhibida competitivamente por los extractos acuosos obtenidos de AKU y RBU, y también por el extracto metanólico de RCU, siendo este último el modelo más destacado por su actividad inhibitoria frente a las dos enzimas estudiadas.

Cabe resaltar que, en todos estos casos, los valores de  $K_m$  fueron significativamente mayores en las fermentaciones controladas, lo que podría relacionarse con un aumento de la oferta de compuestos fenólicos durante la fermentación controlada.

Estos hallazgos sugieren que la incorporación de estos alimentos en la dieta no solo constituye una estrategia nutricional válida, sino que también representa una alternativa prometedora frente a los inhibidores sintéticos, con el potencial de reducir efectos secundarios gastrointestinales y favorecer una mejor gestión de la diabetes tipo 2.

En la actualidad, en Argentina no se ha investigado la incorporación de *U. pinnatifida* a matrices vegetales fermentadas y su actividad inhibitoria contra enzimas relacionadas con la DM tipo 2. En consecuencia, este trabajo se convierte en un punto de partida para el desarrollo de un prototipo de alimento funcional, aprovechando un recurso escasamente utilizado en nuestra región.

Como consideraciones finales, si bien los resultados fueron concluyentes y satisfactorios, existen variables como la concentración inhibitoria máxima media

(IC<sub>50</sub>) que no fueron evaluadas en este trabajo. En consecuencia, se recomienda que, para futuros ensayos, se incluya este análisis previo para mejorar la precisión técnica. También, se debe tener en consideración que, aunque la  $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* presenta diferencias estructurales respecto de la enzima humana, su empleo como modelo experimental es válido para la detección de inhibición competitiva, dada la homología del sitio activo. Por ello, aun con sus limitaciones, constituye una herramienta válida para la evaluación preliminar de compuestos con potencial inhibitorio sobre la  $\alpha$ -glucosidasa humana. A futuro, sería conveniente incorporar enzimas filogenética y estructuralmente más cercanas a la humana (como la  $\alpha$ -glucosidasa de *Rattus norvegicus* o la propia enzima humana) para obtener resultados más representativos y comparables.

## Bibliografía

- Assefa, S.T., Yang, E.Y., Chae, S.-Y., Song, M., Lee, J., Cho, M.C., & Jang, S. (2020). Alpha glucosidase inhibitory activities of plants with focus on common vegetables. *Plants*, 9(1), 2. <https://doi.org/10.3390/plants9010002>
- Barber, E., Houghton, M.J., & Williamson, G. (2021). Flavonoids as human intestinal  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Foods*, 10(8), 1939. <https://doi.org/10.3390/foods10081939>
- Brochu, S. (2018). Development and shelflife evaluation of a novel fermented seaweed sauerkraut utilizing commercially important maine seaweeds. [Tesis de Maestría]. *University of Maine*. 117 pp. Disponible en: <https://digitalcommons.library.umaine.edu/etd/2891/>
- Calle Pascual A. L., Charro Salgado A. L. (2021). Acarbosa y diabetes mellitus. Implicaciones prácticas. *Anales de Medicina Interna*; Vol. 18, 231-233 pp. ISSN: 0212-7199. <https://scielo.isciii.es/pdf/ami/v18n5/editorial.pdf>
- Casas, G., Scrosati, R., & Piriz, M.L. (2004). The invasive kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) in Patagonia, Argentina. *Biological Invasions*, 6, 435–439. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/30155>

- Código Alimentario Argentino (CAA). 2021. Capítulo XVII: Alimentos de régimen o dietéticos. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/caa\\_cap\\_xvii\\_2021.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/caa_cap_xvii_2021.pdf)
- Cortés, R.M., Chiralt B.A., & Puente D.L. (2005). Alimentos funcionales: una historia con mucho presente y futuro. *Vitae*, 12(1), 5–14. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-40042005000100001](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042005000100001)
- Dabhi, A.S., Bhatt, N.R., & Shah, M.J. (2013). Voglibose: an alpha glucosidase inhibitor. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(12), 3023–3027. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/6373.3838>
- Damani, J.J., Gupta, R.P., & Mangalore N. (2018). Maltase inhibitory activity of aqueous extracts of *Zingiber officinale* Rosc. and *Trigonella foenum-graecum* Linn. *Pharmacognosys Journal*.10(2):226-9. <https://doi.org/10.5530/pj.2018.2.39>
- Dellatorre, F.G., Amoroso, R.O., & Baron, P.J. (2012). El alga exótica *Undaria pinnatifida* en Argentina: Biología, distribución y potenciales impactos. *Editorial Académica Española*. Disponible en <http://hdl.handle.net/11336/108429>
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003>
- Dimidi, E., Cox, S. R., Rossi, M., & Whelan, K. (2019). Fermented foods: definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. *Nutrients*, 11(8), 1806. <https://doi.org/10.3390/nu11081806>
- Drider, D., & Rivera, V.M. (2016). Bacterias ácido lácticas. Fundamentos y aplicaciones (1.ª ed.). *Editorial Alfaomega*. Disponible en: <https://dokumen.pub/bacterias-acido-lacticas-fundamentos-y-aplicaciones-1.html>
- DrugBank. (s. f.). *Acarbose*. Recuperado el 7 de febrero de 2026, de <https://go.drugbank.com/drugs/DB00284>
- Elferink, H., Bruekers, J.P.J., Veeneman, G.H., & Boltje, T.J. (2020). A comprehensive overview of substrate specificity of glycoside hydrolases and

transporters in the small intestine. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77, 4799–4826. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03564-1>

Gupta, S., Burman, S., Nair, A. B., Chauhan, S., Sircar, D., Roy, P., Dhanwat, M., Lahiri, D., Mehta, D., Das, R., & Khalil, H.E. (2022). *Brassica oleracea* Extracts Prevent Hyperglycemia in Type 2 Diabetes Mellitus. *Preventive Nutrition and Food Science*, 27(1), 50–62. <https://doi.org/10.3746/pnf.2022.27.1.50>

Harreiter, J., & Roden, M. (2023). Diabetes mellitus –definition, klassifikation, diagnose, screening und prävention (Update 2023). *Wiener klinische Wochenschrift*, 135(1), 7–17. <https://doi.org/10.1007/s00508-022-02122-y>

IDF Diabetes Atlas. (2025). *IDF Diabetes Atlas* (11.<sup>a</sup> ed.). <https://diabetesatlas.org/>

Jagannath, A., Raju, P.S., & Bawa, A.S. (2012). A two-step controlled lactic fermentation of cabbage for improved chemical and microbiological qualities. *Journal of Food Quality*, 35(1), 13–20. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2011.00427.x>

Kashtoh, H. & Baek, K.H. (2023). New insights into the latest advancement in  $\alpha$ -amylase inhibitors of plant origin with anti-diabetic effects. *Plants*, 12 (16), 2944. <https://doi.org/10.3390/plants12162944>

Khan, W., Rayirath, U.P., Subramanian, S., Jithesh, M.N., Rayorath, P., Hodges, D.M., Critchley, A.T., Craigie, J.S., Norrie, J., & Prithiviraj, B. (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, 386-399. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>

Koh, H.S.A., Lu, J., & Zhou, W. (2020). Structural dependence of sulfated polysaccharide for diabetes management: fucoidan from *Undaria pinnatifida* inhibiting  $\alpha$ -glucosidase more strongly than  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00831>

Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Sarkar, T., Pati, S., Basu, D., Abdul Kari, Z., Wei, L. S., Smaoui, S., Wen Goh, K., & Ray, R.R. (2022). Bacteriocin: A natural approach for food safety and food security. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1005918>

Mora-Villalobos, J.A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A., &

- López-Gómez, J. P. (2020). Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. *Fermentation*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/fermentation6010023>
- Ozidal, T., Sela, D.A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F. & Capanoglu, E. (2016). The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients*, 8 (2), 78. <https://doi.org/10.3390/nu8020078>
- Papoutsis, K., Zhang, J., Bowyer, M. C., Brunton, N., Gibney, E. R. & Lyng, J. (2021). Fruit, vegetables, and mushrooms for the preparation of extracts with  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition properties: A review. *Food Chemistry*, 338. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128119>
- Parada, R.B., Marguet, E., Campos, C., & Vallejo, M. (2023). Improved antioxidant capacity of three Brassica vegetables by two-step controlled fermentation using isolated autochthone strains of the genus *Leuconostoc* spp. and *Lactiplantibacillus* spp. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 6. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2023.100163>
- Parra Huertas, R. A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93–105. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612010000100012](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000100012)
- Pérez-Alva, A.J., MacIntosh, A.J., Baigts-Allende, D.K., García-Torres, R., & Ramírez-Rodrigues, M. M. (2022). Fermentation of algae to enhance their bioactive activity: A review. *Algal Research*, 64, 102684. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102684>
- Podsędek, A., Majewska, I., & Kucharska, A. Z. (2017). Inhibitory potential of red cabbage against digestive enzymes linked to obesity and type 2 diabetes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(33), 7192–7199. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02499>
- Proença C, Freitas M, Ribeiro D, Tomé S, Oliveira E, Viegas M, Araújo A, Ramos M, Silva A, Fernandes P & Fernandes E. (2019). Evaluation of a flavonoids library for inhibition of pancreatic  $\alpha$ -amylase towards a structure–activity relationship. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 34(1):577–588. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1558221>
- Punthakee, Z., Goldenberg, R., & Katz, P. (2018). Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome. *Canadian Journal of Diabetes*, 42, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2017.10.003>

- Rebollar-Ramos, D., Ovalle-Magallanes, B., Palacios-Espinosa, J. F., Macías-Rubalcava, M. L., Raja, H. A., González-Andrade, M., & Mata, R. (2021). Inhibitory potential of secondary metabolites from the endophytic fungus *Penicillium* sp. (strain P-2) against enzymes related to type 2 diabetes and obesity. *ACS Omega*, 6(35), 22969–22981. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c03708>
- Rezac, S., Kok, C.R., Heermann, M., & Hutkins, R. (2018). Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1785. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01785>
- Ryu, J.W., Lee, M.S., Yim, M.J., Lee, J.M., Lee, D.S., Kim, Y.M., & Eom, S.H. (2023).  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition effects of Korean edible brown, green, and red seaweed extracts. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 26(3). <https://doi.org/10.47853/fas.2023.e15>
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, 51(3), 456-467. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.05.060>
- Tabart J, Pincemail J, Kevers C, et al. (2018). Processing effects on antioxidant, glucosinolate, and sulforaphane contents in broccoli and red cabbage. *European Food Research and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3126-0>
- Tarahi, M., Singh, M., Farahnaky, A., Ghasemlou, M., & Dokouhaki, M. (2026). Plant-based delivery systems for bioactive compounds: Mechanisms of release and functional food applications. *Advances in Colloid and Interface Science*. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2026.103787>
- Uuh Narvaez, J.J., Moguel Ojeda, G.E., Guerrero-Analco, J.A., Monribot-Villanueva, J.L., Vidal-Limon, A., Melgar Lalanne, G., Rojas Herrera, R., & Segura Campos, M.R. (2025). Identification of bioactive compounds in *Brassica oleracea* var. capitata L. with enzyme-inhibitory activity against postprandial hyperglycemia. *Fitoterapia*. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2024.106343>
- Virgen-Carrillo, C. A., & Mojica, L. (2024). Revisión histórica y conceptual de los alimentos funcionales: antecedentes, perspectivas y desafíos. *Journal of Behavior and Feeding*, 4(7), 11–20. <https://doi.org/10.32870/jbf.v4i7.48>
- Visvanathan, R., Jayathilake, C., Liyanage, R., & Sivakanesan, R. (2018). Applicability and reliability of the glucose oxidase method in assessing  $\alpha$ -

amylase activity. *Food Chemistry*, 275, 265-272.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.114>

Wu, J., Liang, J., Lin, R., Cai, X., Zhang, L., Guo, X., Wang, T., Chen, H., Wang, X., & Wang, X. (2022). Investigation of Brassica and its relative genomes in the post-genomic era. *Horticulture Research*, 9, Article uhac182.  
<https://doi.org/10.1093/hr/uhac182>

Zaharudin, N., Salmeán, A.A., & Dragsted, L.O. (2018). Inhibitory effects of edible seaweeds, polyphenolics and alginates on the activities of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase. *Food Chemistry*, 245, 1196–1203.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.027>

Zheng, J., S. Wittouck, E. Salvetti, C. M. A. P. Franz, H. M. B. Harris, P. Mattarelli, P. W. O'toole, B. Pot, P. Vandamme, J. Walter, K. Watanabe, S. Wuyts, G. E. Felis, M. G. Gänzle, & S. Lebeer. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 70: 2782–2858.  
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Zhou, R., Qin, X., Hou, J., & Liu, Y. (2024). Research progress on Brassicaceae plants: a bibliometrics analysis. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1285050.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1285050>