



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

Caracterización y estudio de la actividad fisiológica
de vesículas extracelulares presentes en productos
comestibles

Autora

María Cruz Manzaneque López

Directores

Dra. Carla Soler Quiles

Dr. Juan Francisco Merino Torres

Dr. Pedro Pérez-Bermúdez Inglés

Programa de Doctorado en Medicina

Valencia, abril 2025

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: **Merino Torres, Juan Francisco** N.I.F. **19100122W**,
Departamento: **Medicina** Centro: **Universitat de València**

2.- Apellidos y nombre: **Soler Quiles, Carla** N.I.F. **24380377D**, Departamento:
**Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y
Medicina Legal**, Centro: **Universitat de València**

3.- Apellidos y nombre: **Pérez-Bermudez Inglés, Pedro** N.I.F. **22457996Z**,
Departamento: **Biología Vegetal** Centro: **Universitat de València**

Tutor. Apellidos y nombre. **Merino Torres, Juan Francisco** N.I.F. **19100122W**,
Departamento/Instituto: **Medicina** Centro: **Universitat de València**.

Directores y tutor de la tesis doctoral: “**Caracterización y estudio de la actividad fisiológica de vesículas extracelulares presentes en productos comestibles**” de Dña. **María Cruz Manzaneque López**, estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe **favorable** para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 31 de enero de 2025

Fdo.: J. FRANCISCO MERINO
BERMUDEZ

Director/Tutor

Fdo.: CARLA SOLER

Directora

Fdo.: PEDRO PÉREZ-

Director

AGRADECIMIENTOS

*Però estaran
Les nostres sempre estaran
Com pedra dins la sabata
Com la palmera que aguanta l'huracà
I allà estaran
Fent burla i fent sacrilegi
Per sempre bruixa i heretge
Sempre a la contra i avant*

He escuchado música mientras escribía esta tesis y mientras estaba en el laboratorio. Las canciones me traen recuerdos de todo tipo y me hacen recordar a personas que siguen y que se fueron. No sé qué canción estaría escuchando el día que **Carla** me dijo que fuera a observar lo que estaban haciendo en el *lab* con unas nanopartículas. Gracias por pensar en mí aquel día.

Dicen que los años y las personas nos hacen cambiar de opinión, y agradezco que tú, **Pedro**, me dijeras que sí a ser mi director después de la decisión de no dirigir más tesis. Gracias **Dr Merino** por estar de acuerdo con todos los cambios que hemos hecho en estas tesis. Gracias **Antonio** y **Dolores**, por meterme caña como si fuera también una doctoranda vuestra.

Porque fuera hay cosas preciosas. Los inviernos al sol, mil canciones. Los cafés y las mañanas y las olas. Y también **Aran** y **Chris**. Gracias Chris por la generosidad tremenda que tienes, por cultivarme en todo esto de las EVs, por ser mi amigo y a veces confidente, por tus paellas y por ser mi chico favorito. Gracias Aran por hacerme reír, por hacerme reflexionar, por escucharme, por no juzgarme, por influenciarme en el *running* y por enseñarme más de lo que piensas. No puedo olvidarme de **Marieta**, **Pilar** y **Carla**, que aparecieron en el último momento y parece que hubieran estado siempre. *Trobar-te a tu és el millor regal.*

El día que pisé el laboratorio de biología vegetal o como lo llamo yo, el *Pedro's Lab*, un montón de personitas me acogieron con los brazos abiertos sin apenas conocerme, y ojalá hacer un equipo como ellos. Gracias **Andrea**, **Eva**, **Irene**, **Amparo**, **Alex**, **Sara**, **Miguel Ángel** y **Marwa**. *Desde ese momento supimos que iba pa largo.*

Entre los restos del desastre; He descubierto alguna luz. Y creo firmemente que era **David**. El primerito en mi lista de compañeros de tesis. Gracias por darme la mano sin apenas conocernos, y no dejarme, al revés, avanzar hasta ser miembros de una junta directiva, ser tutores de TFG, ser amigos y crecer junto con **Eva** y con **Felipe**. Sin nuestras conversaciones a cuatro creo que me hubiera costado mil salir de aquel agujero.

Hubo un punto de inflexión en mi etapa como doctoranda y fue cuando un grupo de jóvenes nutris investigadores decidieron hacer un congreso para aquellos que estábamos solos frente a la tesis. Gracias al **CoJIIN** por hacerme sentir acompañada como D-N investigadora. Y es que el asociacionismo mola, porque te juntas con gente increíble para luchar por intereses comunes. Gracias **Luis** por contar conmigo para formar parte de una “asociación” llamada **CODiNuCoVa** y conocer a gente increíble.

Música, ràbia i amor.

Una vez, cuando escuchaba a Silvana Estrada, esta frase apareció: *Por regresar a casa aunque esté lejos; brindo por cruzarme en tu camino y así mi voz vuelva a tener sentido.* La casa donde me crié está en La Mancha y aun cuando vuelvo de allá no me siento lejos porque el País Valencià ya forma parte de mí y Vinalopó se ha convertido en mi hogar gracias a **Paco, Belén, Blanca y Lucía**, que son familia a la que agradezco que se cruzaran en mi camino. Este hogar no sería lo mismo si no tuviéramos unos vecinos con los que hacemos comunidad. Gracias **Inma, Nacho, Nachete** y **Teo**, por cuidarnos.

Cuidar als amics com em cuiden ells a mi, contar-nos les misèries amb formatge pa i vi.

La mejor decisión que he tomado en mi vida fue elegir como carrera Nutrición Humana y Dietética porque las conocí a ellas: **Lyd, Miriam, Nuri, Inés** y **Andrea**. A veces siento que el orgullo que tengo por todo lo que habéis conseguido se me sale del pecho. Me pongo tremendamente feliz cuando hablo de vosotras, cuando hablo con vosotras, cuando cuento todas las historias que hemos vivido (y todo lo que nos queda por delante), cuando vuelvo a Madrid como si nunca me hubiera ido y cuando pienso que estáis a mi lado apoyándome. De verdad, gracias mis tetis.

Y aunque hay amigas que aparecen, hay otras que siempre han estado y son simplemente familia. **Car, Hel y María**, gracias por estar siempre con los brazos alerta para levantarme y dispuestas a no dejarnos caer cuando suena el *flying free*. Y gracias al resto de la **Cuadrilla** por desear más que nadie que fuera la Dra *emsi*.

Las ruedas del autobús girando van, girando van... Y mis pequeños crecerán. Y se convertirán en lo que ellos quieran con su chacha al lado como han estado conmigo sin ser conscientes. Gracias **Ana y Hugo**. Ojalá seáis igual de curiosos que vuestro padre y no paréis de preguntar jamás por mis investigaciones. Gracias **Jose**, por tu inmensa curiosidad.

La canción de La Moda, Héroes del sábado noche, decía: *No te olvides de dónde vienes; En las noches más oscuras; En las carreteras crudas; En los golpes de la vida; No te olvidas, no te olvidas*. Y claro que no me olvido porque, siempre en silencio, mi padre me lo recuerda. Gracias **papá**.

La niña bonita no entiende la vida pregunta a su hermana buscando una guía. En muchas ocasiones, cuando estaba bloqueada, cuando me quedaba parada, he pensado en qué haría mi hermana. **Gema** pensaría en negativo, sería pesimista pero no desistiría. Y con eso me quedo. Gracias por acompañarme aunque a veces queríamos estirarnos de los pelos como cuando éramos pequeñas.

No hay palabras ni canciones suficientes para agradecer todo lo que me ha dado mi madre. Agradezco que me enseñara a compartir y no a competir, a preocuparme por mí sin dañar a nadie, a pensar que todo irá bien y que todo pasará. Gracias **mamá**.

Por último, me quedo con una parte de la canción de Oques Grasses – De Bonesh: *Què passaria; Si ho tornés a viure tot?; Tornaria a fer-ho igual; Tornaria a ser qui soc*. Porque sí, cambiaría muchas actitudes, muchas decisiones y muchas acciones sabiendo lo que sé ahora, pero gracias a que sucedieron soy quien soy y tengo a toda esta gente a mi alrededor.

*Nos quedan muchos más
Regalos por abrir
Monedas que al girar
Descubran un perfil*

A mi tía Mari Cruz

CONTENIDO

1. Introducción.....	23
1.1. Granada.....	24
1.1.1. Composición.....	25
1.1.2. Beneficios del zumo de granada en la salud.....	34
1.1.3. Procesamiento industrial del zumo	37
1.2. Algarroba	39
1.2.1. Composición.....	41
1.2.2. Propiedades funcionales	51
1.3. Vesículas extracelulares (VEs).....	57
1.3.1. Definición.....	57
1.3.2. Biogénesis y tipología	57
1.3.3. Aislamiento de VEs.....	59
1.4. VEs en plantas	62
1.4.1. Historia y nomenclatura.....	62
1.4.2. Biogénesis	64
1.4.3. Propiedades funcionales	67
1.5. Nanovesículas (NVs) en zumo de granada y en subproductos de algarroba.....	80
2. Objetivos.....	82

3. Metodología.....	84
3.1. Preparación de las muestras.....	84
3.2. Aislamiento de las NVs	85
3.3. Caracterización de las NVs	86
3.3.1. Cuantificación de proteínas.....	86
3.3.2. Análisis de Rastreo de Nanopartículas (NTA).....	86
3.3.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET)	87
3.3.4. Análisis proteómico.....	87
3.4. Identificación de marcadores de VEs de plantas.....	89
3.4.1. Inmunomarcaje con oro	89
3.4.2. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).....	90
3.5. Cultivos celulares	91
3.5.1. Condiciones de las diferentes líneas celulares	91
3.5.2. Estudios in vitro sobre la actividad de las NVs.....	92
3.5.3. Marcaje de <i>Gr</i>NVs y tratamiento con proteinasa K	95
3.5.5. Análisis estadístico de los datos.....	97
4. Resultados y discusión.....	97
4.1. Caracterización y bioactividad de NVs aisladas de zumo de granada	98
4.1.1. El zumo de granada contiene NVs con características y proteómica típicas de VEs	98

4.1.2. Las Nat- <i>Gra</i> NVs tienen propiedades biológicas in vitro	107
4.2. Impacto de tratamientos industriales en NVs de zumo de granada	117
4.2.1. La pasteurización y la liofilización reducen el rendimiento y la pureza de las nanovesículas	117
4.2.2. El procesamiento del zumo de granada induce cambios en el contenido proteómico de <i>Gra</i> NVs afectando principalmente a las proteínas relacionadas con la membrana	122
4.2.3. La internalización de NVs de zumos procesados es inferior a la de NVs de zumos sin tratar	130
4.2.4. Las NVs aisladas de zumos de granada pasteurizados y liofilizados, no mantienen todas las propiedades biológicas	135
4.3. Caracterización y bioactividad de NVs aisladas del fluido apoplástico de la vaina de la algarroba	141
4.3.1. El fluido apoplástico de la vaina de algarroba contiene NVs con morfología y carga proteica similar a VEs	141
4.3.2. Las <i>Alg</i> NVs presentan actividades biológicas in vitro	148
5. Conclusiones	158
6. Referencias bibliográficas	160
7. ANEXOS	186

7.1. Anexo 1. Artículo publicado en la revista Food & Function	
.....	187
7.2. Anexo 2. Lista de proteínas identificadas en <i>GraNVs</i> por LC-MS/MS	
.....	188
7.3. Anexo 3. Artículo enviado a la revista Food Chemistry	
.....	193
7.4. Anexo 4. Lista de las proteínas expresadas de forma diferencial en <i>Nat-GraNVs</i>, <i>Lio-GraNVs</i> y <i>Pas-GraNVs</i>	
.....	240
7.5. Anexo 5. Análisis Gene Ontology de las proteínas con diferencias significativas post-tratamiento.	
.....	265
7.6. Anexo 6. Lista de proteínas identificadas en <i>AlgNVs</i> por LC-MS/MS	
.....	269

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos fenólicos del zumo de granada (var. Mollar de Elche). Elaboración propia.	31
Tabla 2. Polifenoles más comunes en la pulpa de algarroba.	45
Tabla 3. Componentes fenólicos de la piel de semilla de algarrobo.	49
Tabla 4. Componentes lipídicos encontrados en el germen.....	50
Tabla 5. Bacterias y hongos afectados por diferentes extractos de los subproductos de la algarroba.	56
Tabla 6. Comparación entre las técnicas de aislamiento por Ultracentrifugación Diferencial (UCD) y Exclusión por Peso Molecular (SEC). La puntuación se clasifica como elevado (+++), intermedio (++) y bajo (+). Fuente: Sidhom et al., 2020.	61
Tabla 7. Efectos descritos en NVs de frutas. Adaptada y actualizada a partir de Lo et al, 2024.....	69
Tabla 8. Efectos descritos en NVs de verduras y especias. Adaptada y actualizada a partir de la publicada por Lo et al, 2024	73
Tabla 9. Efectos descritos en NVs de otros vegetales comestibles. Adaptada y actualizada a partir de la publicada por Lo et al, 2024.....	76
Tabla 10. Lista de proteínas identificadas Nat-GrNVs en la biogénesis y el tráfico de VEs.	103
Tabla 11. Lista de proteínas significativamente diferentes en NVs aisladas de zumo natural de granada o de zumos sometidos a tratamientos industriales.....	124
Tabla 12. Comparación de la composición de los tampones utilizados y características del proceso de extracción de NVs del apoplasto de diferentes plantas.	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Granada var. Mollar de Elche	26
Figura 2. Esquema de la composición nutricional del zumo de granada extraído de los arilos sin semilla	28
Figura 3. Esquema de la composición del aceite extraído de las semillas de granada.....	33
Figura 4. Algarrobo o garrofera localizado en Sierra Calderona, en la población de Olocau (Valencia).....	40
Figura 5. Morfología del fruto del algarrobo	42
Figura 6. Diagrama del procesado de la goma garrofín.....	43
Figura 7. Principales componentes de la pulpa.....	44
Figura 8. Principales componentes de las diferentes partes de la semilla del algarrobo	48
Figura 9. Representación de la biogénesis de los dos grupos principales de VEs: ectosomas y exosomas.....	58
Figura 10. Técnicas de aislamiento más utilizadas para el aislamiento de VEs.....	59
Figura 11. Representación ilustrativa del aislamiento de las vesículas extracelulares (VEs) de plantas extraídas de fluidos y nanovesículas (NVs) resultantes de la ruptura de tejidos y células vegetales.....	64
Figura 12. Vías de biogenesis de NVs de plantas	66
Figura 13. Representación esquemática del contenido de NVs de plantas	68
Figura 14. Aislamiento y caracterización de Nat- <i>Gra</i> NVs.....	100
Figura 15. Caracterización proteómica de Nat- <i>Gra</i> NVs	106
Figura 16. Evaluación de la citotoxicidad inducida por las Nat- <i>Gra</i> NVs	108

Figura 17. Efecto citoprotector de las Nat-GraNVs sobre la viabilidad de las Caco-2 a las que se les ha inducido estrés con H ₂ O ₂	110
Figura 18. Las Nat-GraNVs muestran actividad antiinflamatoria en macrófagos humanos THP-1-XBlue™ CD14	113
Figura 19. Las Nat-GraNVs aceleran la cicatrización en células Caco-2	116
Figura 20. <i>Caracterización de nanovesículas aisladas de zumo de granada natural, pasteurizado y liofilizado</i>	119
Figura 21. Las GraNVs presentan diferentes perfiles proteómicos en respuesta al tratamiento industrial.	128
Figura 22. Captación de liposomas, Nat-GraNVs, Lio-GraNVs o Pas-GraNVs, marcados con FM4-64, por macrófagos humanos THP-1-XBlue™-CD14	132
Figura 23. El tratamiento con proteinasa K reduce la captación por los macrófagos THP-1-XBlue™-CD14 de las Nat-GraNVs pero no de Lio-GraNVs o Pas-GraNVs.	134
Figura 24. Los procesos industriales disminuyen el efecto antiinflamatorio de las Nat-GraNVs en macrófagos estimulados con LPS.....	136
Figura 25. Las GraNVs actúan como citoprotectoras en respuesta al estrés inducido por peróxido de hidrógeno en células HepG2, Caco-2 y THP-1-XBlue™-CD14	138
Figura 26. El tratamiento con Nat-GraNVs estimula una cicatrización más rápida en células epiteliales intestinales que las Lio-GraNVs o Pas-GraNVs	139
Figura 27. Aislamiento y caracterización de NVs de algarroba.....	144
Figura 28. Caracterización proteómica de las AlgNVs	147
Figura 29. Evaluación de la citotoxicidad inducida por AlgNVs.....	149

Figura 30. Evaluación de la citotoxicidad inducida por la fracción proteica sin NVs derivada de la SEC (F20) y del extracto total del fluido apoplástico de la pulpa de algarroba150

Figura 31. Las *AlgNVs* y el D-pinitol presentan actividad antiinflamatoria en macrófagos humanos THP-1-XBlue™ CD14 en presencia de LPS 154

Figura 32. Las *AlgNVs* estimulan el cierre de heridas en queratinocitos 156

ABREVIATURAS

AlgNVs: Nanovesículas de algarroba	MET: Microscopía electrónica de transmisión
AlgTE: Extracto total del fluido apoplastico de algarroba	MFI: Intensidad de fluorescencia media
DMSO: Dimetilsulfóxido	MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difeníl tetrazolio
ELISA: Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas	Nat-GraNVs: Nanovesículas de zumo de granada natural sin tratamiento
FA: Fluido apoplastico	NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	NTA: Análisis de rastreo de nanopartículas
GO: Gene ontology	NVs: Nanovesículas
GraNVs: Nanovesículas derivadas de zumo de granada	Pas-GraNVs: Nanovesículas de zumo de granada pasteurizado
Hsp70: Proteína de shock térmico de 70 KDa	PBS: Disolución salina tamponada con fosfato
HTST: Pasteurización alta temperatura corto tiempo	PFA: Paraformaldehído
LC-MS/MS: Cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem	PMA: Forbol 12-meristato 13-acetato
Lio-GraNVs: Nanovesículas de zumo de granada liofilizado	SEC: Cromatografía de exclusión molecular
LPS: Lipopolisacárido bacteriano	SFB: Suero fetal bovino
LTLT: Pasteurización baja temperatura largo tiempo	

TET8: Tetraspanina 8

TFF: Técnica de filtración
tangencial por flujo

TNF- α : Factor de necrosis
tumoral

UCD: Ultracentrifugación
Diferencial

VEs: Vesículas Extracelulares

ZG: Zumo de granada

1. Introducción

L'Horta de València no es solo un paisaje agrícola, sino que es un escenario histórico que alberga costumbres, tradiciones y ritos constituyendo un símbolo de identidad fundamental para los valencianos. Teodoro Llorente, el poeta más importante de la *Renaixença* valenciana, en su libro *Valencia. Sus monumentos y artes. Su naturaleza e historia*, decía sobre *L'Horta*: “Es este llano una elevada y extensa meseta, de buena tierra, que sería muy productiva si tuviese agua, y que, aun así, dividida en grandes haciendas (masos en la lengua del país), es afamada por sus buenos viñedos, olivares y algarrobales (garroferals)”. Tal y como se deduce en este fragmento, en la trilogía de cultivos de secano arbolado valencianos, los algarrobos ocupan un lugar destacado por haber tapizado los piedemontes de la provincia de Valencia, además de servir como alimento, tanto a humanos como animales. Tal ha sido su importancia que Francesc Almela i Vives le dedicaba el poema *Cant a la garrofera*.

Si la huerta valenciana ha llegado a ser un vínculo entre lo rural y lo urbano reconociéndose como “Sistema Importante del Patrimonio Agrícola Mundial” por la FAO, la huerta de Alicante ha sido conquistada por la urbanización perdiendo su actividad agraria y como consecuencia, perdiendo parte de sus valores. A pesar de esta degradación, la huerta de Alicante alberga las granadas con Denominación de Origen Protegido Granada var. Mollar de Elche. Este fruto está arraigado a la cultura ilicitana. Su nombre en valenciano, mangrana o magrana, se debe a la similitud que tiene con el aparato en el que desciende el ángel desde la cúpula de la iglesia de Santa María de Elche en la representación del drama medieval *Misteri d'Elx*.

Pero además de la relevancia histórica, tanto la algarroba como la granada, han tenido un impacto económico importante en la Comunidad Valenciana.

Introducidos en la región hace siglos, ambos cultivos se adaptaron perfectamente al clima mediterráneo y fueron valorados por sus propiedades nutritivas y sus múltiples usos. La algarroba, utilizada durante siglos como fuente de alimento y forraje en épocas de escasez, ha ganado en los últimos años un nuevo valor en la industria alimentaria gracias a sus semillas, empleadas en harinas y espesantes naturales, revitalizando su cultivo en la región. La granada, por su parte, es apreciada por su calidad y simbolismo; su cultivo y exportación contribuyen significativamente a la economía rural, especialmente en el sur de Valencia y Alicante, generando empleo y promoviendo la sostenibilidad agrícola. Así, la algarroba y la granada representan no solo cultivos históricos, sino también pilares de la economía rural valenciana, preservando tradiciones agrícolas y respondiendo a las nuevas demandas del mercado por lo que fueron seleccionadas para su estudio en la presente tesis doctoral.

1.1. Granada

El granado (*Punica granatum* L) es un árbol pequeño o arbusto, de 3 a 6 metros de altura. Es nativo de la zona de Irán y del norte de la India, pero se ha cultivado y naturalizado en la región mediterránea. Actualmente está presente en diversas zonas de todo el mundo como Argentina, Brasil, Chile, Sudáfrica y Australia (Stover & Mercure, 2007; Beghè et al., 2016).

En 2020, la producción mundial de granada alcanzó los 4,9 millones de toneladas (t), siendo India, China e Irán los tres mayores productores al concentrar el 80% del total (Ángeles Fernández-Zamudio & Bartual, 2020). En España, en el año 2022, la producción fue de 79.183 t, concentrándose ésta principalmente en la provincia de Alicante (50.091 t) (Ministerio de Agricultura, 2023).

El fruto, la granada, es muy apreciada desde la antigüedad con un gran simbolismo en diferentes culturas. Por ejemplo, en la mitología persa y en Babilonia se consideraba como un signo de invencibilidad. También se asociaba con la fertilidad en la mitología griega, en el cristianismo, en las tribus beduinas y en el arte cerámico chino (Stover & Mercure, 2007; Chandra et al., 2010).

Se cree que llegó a la Península Ibérica a través de marineros y comerciantes de la antigüedad que, inicialmente la introdujeron en Grecia (Chandra et al., 2010). En España se convirtió en símbolo y emblema para una serie de monarcas que la relacionaban con la unidad y la vinculaban con el deseado Reino de Granada (Garrido, 2004). Tras el descubrimiento de América, los españoles misioneros la introdujeron en América central y del sur (Chandra et al., 2010).

1.1.1. Composición

La granada (Figura 1) es un fruto seco del tipo balausta, aunque vulgarmente está considerada como una baya carnosa desarrollada a partir del ovario. Se compone de un pericarpio coriáceo que contiene entre 200 a 1400 semillas dependiendo de la variedad. Cada semilla proviene de un óvulo y se encuentran rodeadas de coberturas acuosas llamadas arilos. Se localizan dentro de lóculos (cámaras multióvulos) separados por paredes membranosas (endocarpio) y un mesocarpio esponjoso fibroso y seco (Stover & Mercure, 2007; Beghè et al., 2016).

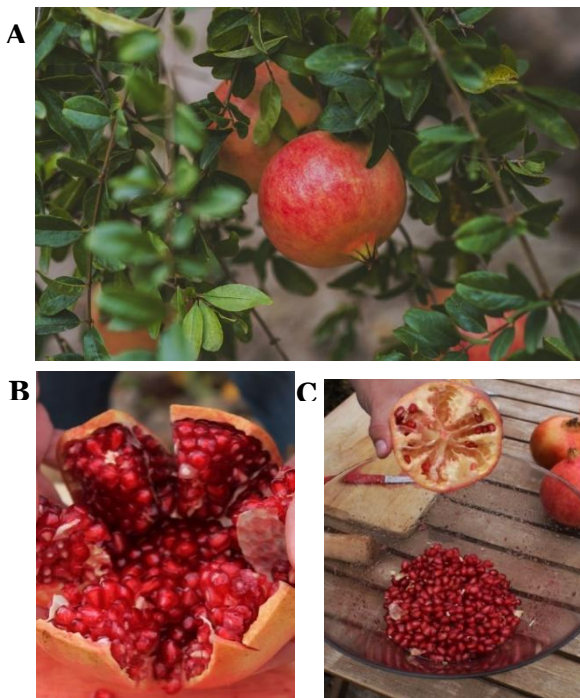


Figura 1. Granada var. Mollar de Elche. (A) Fruta entera. (B) Fruta partida por la mitad donde se puede observar que los arilos están separados por una membrana blanca. (C) Separación de los arilos, que contienen las semillas, de la corteza o pericarpio. Fuente www.granadasselche.com

El color del arilo y su jugo están vinculados al color del pericarpio (piel), de manera que las frutas rojas tienen arilos rojos, mientras que las frutas rosadas a blancas tienen arilos de color claro dependiendo de la cantidad de polifenoles (Beghè et al., 2016). Las partes comestibles de la granada (alrededor del 50% del peso) corresponden al zumo (80%) y a la semilla (20%).

En la presente tesis se trabajó con la variedad Mollar de Elche (ME). La granada Mollar de Elche es una variedad autóctona reconocida por su dulzor, semilla blanda y propiedades saludables. Destaca por su alto

contenido en antioxidantes, superando al vino tinto y al té verde, lo que protege las células del daño oxidativo y ralentiza el envejecimiento. Esta variedad cuenta con la Denominación de Origen Protegida (DOP), que abarca 40 municipios de las comarcas alicantinas del Baix Vinalopó, Vega Baja y Alacantí, garantizando su calidad y autenticidad.

El estudio de la biofuncionalidad de variedades vegetales autóctonas puede incentivar la investigación e innovación en la producción de estos alimentos, generando nuevas oportunidades de desarrollo en el sector agroalimentario local.

Zumo de granada (ZG)

El zumo se obtiene a partir de los arilos exprimiendo la fruta. Su composición es de aproximadamente un 85% de agua, 10% de azúcares totales, ácidos orgánicos, minerales y flavonoides polifenólicos (Figura 2) (Fernandes et al., 2017).

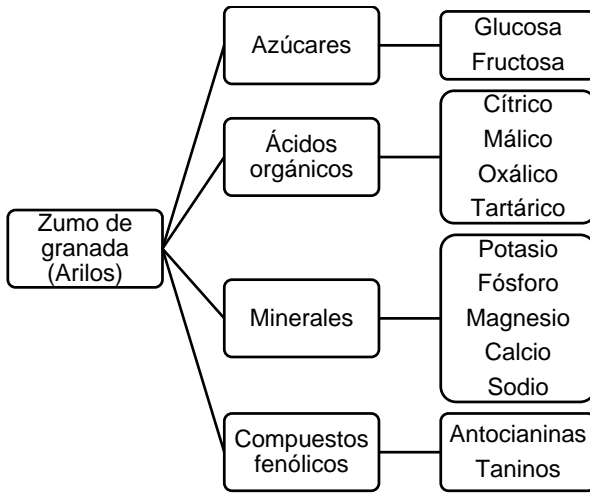


Figura 2. Esquema de la composición nutricional del zumo de granada extraído de los arilos sin semilla. Elaboración propia.

La glucosa y la fructosa son los principales azúcares que se encuentran en el ZG, cuyas concentraciones varían de 52,6 a 85,6 g/L y 66,1 a 91,8 g/L respectivamente, con un ratio glucosa/fructosa medio de 0,9 (Mena et al., 2011; N. Nuncio-Jáuregui et al., 2014; Vegara et al., 2014).

Las concentraciones de estos azúcares dependen principalmente de factores genéticos, ambientales y agronómicos. La variabilidad genética entre diferentes cultivares de granada afecta significativamente la concentración de azúcar, y algunos cultivares exhiben naturalmente niveles más altos de glucosa y fructosa que otros (Holland et al., 2009). Las condiciones ambientales, incluida la exposición a la luz solar, la temperatura y la disponibilidad de agua, también juegan un papel fundamental. La alta luz solar y el estrés hídrico moderado generalmente mejoran la acumulación de azúcar en la fruta al promover la actividad fotosintética y concentrar los azúcares a medida que disminuye el contenido de agua. Además, la

composición del suelo y la disponibilidad de nutrientes afectan el metabolismo del azúcar; los suelos ricos en potasio, por ejemplo, pueden aumentar el contenido de azúcar al influir en el transporte y el metabolismo de los carbohidratos dentro de la fruta. Las prácticas agronómicas, como el momento del riego, la poda y el momento de la cosecha, modulan aún más los niveles de azúcar. Las cosechas tempranas pueden producir granadas con un menor contenido de azúcar, mientras que la fruta cosechada en plena madurez ha tenido más tiempo para acumular azúcares (Tehranifar et al., 2010; Adiba et al., 2022). Dado que la glucosa y la fructosa son los principales azúcares solubles en el ZG, sus concentraciones influyen directamente en la dulzura, lo que hace que estos azúcares sean marcadores de calidad clave tanto en la fruta fresca como en los productos procesados.

La presencia de sacarosa, aunque en menor cantidad que las anteriores, es un indicador de calidad de la fruta recién exprimida, mientras que la presencia de sorbitol podría indicar el uso de granadas de baja calidad como resultado del deterioro microbiológico (Mena et al., 2011; Krueger, 2012) .

La acidez total expresada en g/L de ácido cítrico, varía dependiendo de la variedad de la granada. La variedad ME se considera dulce y contiene bajas cantidades (entre 1,9 a 2 g/L), mientras que, por ejemplo, el cultivar Wonderful tiene un sabor menos dulce, debido a que contiene mayores cantidades de ácido (5,2 a 29,7 g/L) (Mena et al., 2011). Los ácidos encontrados en el ZG de ME son principalmente el ácido cítrico, málico, oxálico y tartárico, además de trazas de láctico y fumárico (Melgarejo et al., 2000; Mena et al., 2011).

En el estudio realizado por Vegara y colaboradores se identificó el potasio como el mineral predominante en el zumo de ME con una concentración de 2400–2900 mg/L, seguido de fósforo (81-89 mg/L), magnesio (17,6-28,5

mg/L), calcio (5,8-7,5 mg/L) y sodio (4,3-5,3 mg/L). En menores cantidades se encontraron zinc, cobre, hierro y estaño (Vegara et al., 2014).

El ZG es considerado como una de las bebidas con mayor contenido de antioxidantes, a los cuales se le han atribuido propiedades medicinales y efectos beneficiosos para la salud (Carlsen et al., 2010; Kalaycioğlu & Erim, 2017). Los antioxidantes más estudiados en este zumo natural, tal y como se muestra en la Tabla 1, son las antocianinas y taninos hidrolizables, aunque se han encontrado también bajas concentraciones de otros compuestos fenólicos como la pro-antocianina.

Precisamente las antocianinas son responsables del color característico de la granada y juegan un papel clave en la detección de adulteraciones en el zumo. Las granadas contienen seis pigmentos del grupo de las antocianinas, compuestos por los monoglucósidos y diglucósidos de delfinidina, cianidina y pelargonidina. Estos incluyen: delfinidina 3-glucósido y 3,5-diglucósido; cianidina 3-glucósido y 3,5- diglucósido y; pelargonidina 3-glucósido y 3,5-diglucósido (Krueger, 2012). La cianidina 3-glucósido es la que se encuentra en mayor cantidad con respecto a las otras antocianinas habiéndose encontrado en concentraciones muy variables, desde 20,6 mg/L (Fernandes et al., 2017) hasta 800,4 mg/L (Díaz-Mula et al., 2019).

Los taninos hidrolizables encontrados más frecuentemente en el ZG incluyen punicalinas (α , β), punicalaginas (α , β) y derivados del ácido elágico (libre o glicosilado). De todos ellos, las punicalaginas son las que están presentes en mayor cantidad (Mena et al., 2011; Vegara et al., 2014; Nallely Nuncio-Jáuregui et al., 2015; Fernandes et al., 2017).

Tabla 1. Compuestos fenólicos del zumo de granada (var. Mollar de Elche). Elaboración propia.

Taninos hidrolizables	Elagitaninos	Ácido elágico libre Ácido elágico pentóxido Ácido elágico glicosidado Punicalinas (α, β) Punicalaginas (α, β)
	Galotaninos	
Derivados del ácido fenólico	Derivados del ácido hidroxibenzoico	Ácido gálico
Taninos condensados	Flavanol	Galocatequina Epigalocatequina Catequina Epigalocatequina galato Epicatequina Epicatequina galato
Antocianinas	Delfinidina	3-glucósido delfinidina 3,5-diglucósido delfinidina
	Cianidina	3-glucósido cianidina 3,5-diglucósido cianidina
	Pelargonidina	3-glucósido pelargonidina 3,5-diglucósido pelargonidina

Semillas

Las semillas de la granada, aunque desempeñan un papel importante para la reproducción de la planta, son consideradas como subproductos generados durante el procesamiento de zumo. No obstante, son ricas en lípidos, además de contener ácidos orgánicos, azúcares, vitaminas, polifenoles y minerales (Oliveira et al., 2019).

El aceite extraído de estas semillas es el componente más valorado y estudiado, ya que se le han atribuido propiedades nutricionales y medicinales (Verardo et al., 2014). Las semillas extraídas de la variedad ME contienen alrededor de un 10% de aceite y se componen de ácidos grasos

(AGs), tocoferoles, esteroides y fosfolípidos, tal y como se muestra en la Figura 3.

La clase principal de AGs pertenecen al grupo de los AGs poliinsaturados con un contenido de alrededor del 88%, donde el ácido púrico predomina con un 70%-80%, seguido de ácido linoleico y ácido oleico.

El contenido en tocoferoles fluctúa entre 1281,4 $\mu\text{g/g}$ y 1389,6 $\mu\text{g/g}$ de aceite, siendo el γ -tocoferol el que se encuentra en mayor cantidad. En el estudio de Fernandes et al. (2015) los tocotrienoles no fueron detectados, mientras que en otro estudio (Verardo et al., 2014) se determinaron α y β -tocotrienol, 12,7-16,5 $\mu\text{g/g}$ de aceite y 25,3 – 36,4 $\mu\text{g/g}$ de aceite, respectivamente.

Con respecto a los esteroides, se han identificado, de mayor a menor concentración: β -sistosterol, Δ^5 -avenasterol, campesterol, citrostadienol, estigmasterol y sitostanol. Pese a la escasez de estudios sobre los fosfolípidos en semillas, el trabajo de Verardo y colaboradores es la principal referencia, donde encontraron que los fosfolípidos predominantes eran fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilcolina (Verardo et al., 2014).

Al comparar la presencia de taninos hidrolizables con el zumo, se observa que la cantidad de elagitaninos totales es mayor en semillas aunque no contenga punicalinas, mientras que la cantidad de antocianinas es mayoritaria en el zumo, no encontrándose delphinidina en semillas (Díaz-Mula et al., 2019).

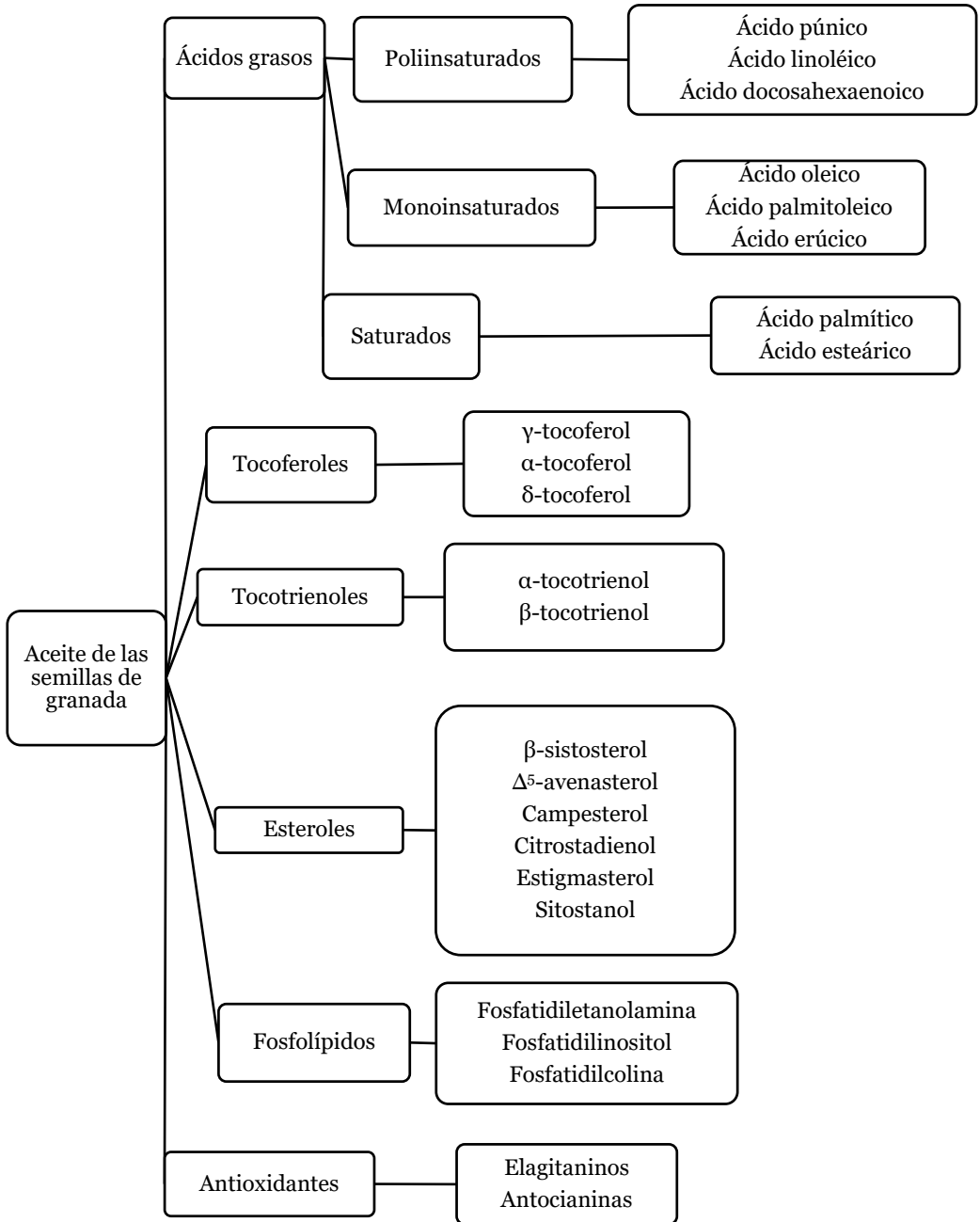


Figura 3. Esquema de la composición del aceite extraído de las semillas de granada. Elaboración propia.

1.1.2. Beneficios del zumo de granada en la salud

Como se ha mencionado anteriormente, el ZG contiene una gran variedad de compuestos, principalmente compuestos fenólicos, con múltiples actividades beneficiosas para la salud. La mayoría de estas propiedades son atribuidas a los elagitaninos, especialmente al ácido elálgico, las punicalinas y las punicalaginas, pero también a las antocianinas (Vučić et al., 2019). Sin embargo, la sinergia entre estos componentes del ZG conduce a unos notables efectos superiores a los de los citados productos por separado. Entre algunas de las actividades biofuncionales descritas se encuentran los efectos beneficiosos sobre la inflamación, enfermedades cardiovasculares y el cáncer.

Antiinflamación

Diferentes modelos animales han sido empleados para investigar patologías inflamatorias. Por ejemplo, en ratones sometidos a humo de cigarro a los cuales se les había suministrado ZG (80 $\mu\text{mol/kg}$), la expresión de interleuquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y del factor de necrosis tumoral (TNF- α) se vieron disminuidos (Husari et al., 2016). Por otro lado, el ZG (400 mg/kg al día durante 18 días) administrado a ratones a los que se les indujo colitis mediante ácido sulfónico dinitrobenzeno (DNBS), mostró efectos preventivos al disminuir TNF- α , IL-18, IL-1 β y NF-k β (Factor nuclear kappa B) (Shah et al., 2016). También, el ZG (1 mL/día) usado como tratamiento en ratones con diabetes tipo 2 (DM2) redujo los niveles de TNF- α , IL-6 y NF-k β (Rouhi et al., 2017).

Las investigaciones en humanos sobre el consumo de ZG y sus efectos sobre la inflamación son limitadas. Hasta ahora, según la revisión realizada por Danisa & Ferguson (2017), solo dos estudios han mostrado que cantidades

diarias de 100 a 500 mL de ZG durante un año pueden reducir el estrés oxidativo y la inflamación sistémica.

Enfermedades cardiovasculares (ECVs)

Tanto el ZG como los extractos de la granada, entre los cuales se encuentra el Pomanox® (obtenido a través de un proceso de extracción acuosa y estandarizado al 30% de punicalaginas), han demostrado un considerable potencial como coadyuvantes y suplementos preventivos en los tratamientos de las ECVs (Benedetti et al., 2023).

La evaluación del riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECVs) es crucial para prevenir eventos como infartos y accidentes cerebrovasculares. Una de las herramientas recomendadas en las guías médicas es la medición del grosor íntima-media carotídeo, que se obtiene a través de una ecografía de las arterias carótidas, de manera que un aumento de esta medida significaría un aumento del riesgo cardiovascular (Stein et al., 2008). La suplementación de 50 mL/día ZG durante 1 año en 15 pacientes con estenosis carotídea asintomática, produjo una reducción de la medida del grosor íntima-media carotídeo (Aviram et al., 2004). Otro estudio en el cual, durante 18 meses, 189 pacientes con factores de riesgo cardiovascular fueron suplementados con 240 mL/día de ZG obtuvo resultados similares (Davidson et al., 2009).

La hipertensión arterial aumenta el riesgo de ECVs al generar daño en los vasos sanguíneos, favorecer la aterosclerosis y sobrecargar el corazón, lo que puede derivar en infarto, ictus o insuficiencia cardíaca. En un estudio, en el cual personas sin patologías tomaron 330 mL/día de zumo durante 4 semanas, la presión sistólica y diastólica cayó significativamente en comparación con el grupo control (Lynn et al., 2012). En el mismo sentido,

el equipo de Sohrab y colaboradores (Sohrab et al., 2019) demostró el efecto del consumo durante 6 semanas de 200 mL/día de ZG sobre la reducción de la presión arterial en personas con DM2. Por otro lado, las investigaciones de Aviram y colaboradores sugirieron que la ingesta de 50 mL/día de ZG durante 1 año reducía solo la presión sistólica en personas con estenosis carotídea asintomática (Aviram et al., 2004).

Bahari y colaboradores (Bahari et al., 2023) llevaron a cabo un metaanálisis donde concluyeron que los productos y extractos de granada podrían considerarse como una estrategia terapéutica en personas con dislipemias al reducir los niveles de colesterol total (CT), colesterol LDL (LDL-C), y triglicéridos (TG) en sangre y aumentar las concentraciones de colesterol HDL (HDL-C).

Cáncer

Se ha demostrado que la granada y sus componentes pueden alterar una variedad de vías de señalización asociadas a la proliferación y transformación celular, inflamación, angiogénesis, tumorigénesis y metástasis, regulando mediadores proinflamatorios, moléculas de adhesión celular, proteínas antiapoptóticas y factores de crecimiento, dando como resultados efectos quimiopreventivos o quimioterapéuticos en neoplasias como cáncer de colon, mama y próstata, entre otros (Rahman et al., 2023).

En relación con el cáncer de colon, se han llevado a cabo ensayos *in vitro* en células colónicas cancerosas HT-29, cuyos resultados mostraron que el ZG ejercía efectos preventivos al reducir COX-2 (enzima relacionada con el crecimiento tumoral) e inhibir la actividad AKT (vía de señalización asociada al cáncer) (Adams et al., 2006). En ratas a las que se les provocó focos de criptas aberrantes (lesiones preneoplásicas tempranas de

adenocarcinoma) con azoxymetano, se observó que el pre-tratamiento con ZG reducía dichas criptas (Boateng et al., 2007; Banerjee et al., 2013).

También se han visto resultados esperanzadores en células de cáncer de mama y de próstata. Los resultados del estudio de Rocha y colaboradores (2012) indicaron que el ZG interfería en procesos involucrados en la metástasis de dos líneas celulares cancerosas de mama (MDA-MB-231 (triple negativo) y MCF7 (hormonodependiente)) al suprimir el crecimiento celular, inhibir la migración celular y la quimiotaxis de proteínas implicadas en la metástasis. En células neoplásicas de próstata, PC3 y DU145, se vio un efecto inhibitor del ZG sobre la proliferación celular al inhibirse la vía de señalización intracelular asociada al cáncer, PI3K/AKT/mTOR (Chaves et al., 2020). Además, la proteómica de células DU145 tratadas con granada mostró la expresión de genes asociados con la apoptosis, la vía de señalización NF- κ B, la invasión/metástasis, la angiogénesis y el citoesqueleto (Lee et al., 2012).

1.1.3. Procesamiento industrial del zumo

Los zumos de fruta representan un sector clave dentro de la industria agroalimentaria, ya que permiten aprovechar al máximo la producción frutícola. Su demanda ha crecido debido a su conveniencia y a la percepción de ser una fuente natural de vitaminas y antioxidantes. A nivel mundial, la producción de zumos se concentra en frutas como la naranja, la manzana y la granada, con países como Brasil, Estados Unidos y China liderando la exportación (Tetra Pak. "Índice de jugos de Tetra Pak: informe, datos, cifras y tendencias").

El proceso de fabricación del zumo de granada incluye diferentes operaciones, como la selección y lavado de la fruta, la extracción del zumo,

la filtración y su posterior envasado. Sin embargo, es un producto altamente perecedero, susceptible al crecimiento de microorganismos y a la degradación de sus compuestos bioactivos, lo que reduce su vida útil y calidad sensorial (Benjamin & Gamrasni, 2020). Es por ello que para garantizar la seguridad del producto y prolongar su conservación, se aplican operaciones de conservación.

En el caso del ZG, el método más utilizado para la inactivación de los patógenos vegetativos y de enzimas endógenas, es la pasteurización. Hay dos tipos, LTLT (por sus siglas en inglés, *Low-Temperature Long-Time*) y HTST (por sus siglas en inglés, *High temperature short time*). La primera implica un calentamiento de 63 °C durante no menos de 30 min, mientras que en la segunda se emplean temperaturas de 72 °C durante 15 s o más (Vegara et al., 2013; Putnik et al., 2019). Sin embargo, los tratamientos térmicos pueden impactar sobre la composición nutricional, así como en las cualidades sensoriales (color, sabor, aroma, textura) de los zumos de frutas. Esto ha dado lugar a procesos alternativos como la liofilización para preservar las cualidades del producto (Sarbatly et al., 2023). La liofilización, también llamada deshidrocongelación o criodesecación, es un método de deshidratación que consiste en la congelación del producto seguida de la sublimación del hielo a vacío (Prosapio & Lopez-Quiroga, 2020). No obstante, el contenido de polifenoles y las propiedades físicas de los zumos rehidratados después de un proceso de liofilización también pueden verse afectados (Martínez-Navarrete et al., 2019; Silvan et al., 2020; Uscanga et al., 2021).

1.2. Algarroba

El algarrobo (*Ceratonia siliqua* L.) es un árbol leñoso de hoja perenne perteneciente a la familia de las Leguminosas (Figura 4). Se le denomina también garrofero o garrofera y tolera las altas temperaturas (40-45 °C) aunque es sensible al frío (Malagon, 2020). Su cultivo se localiza, principalmente, en países de la cuenca mediterránea (España, Italia, Portugal, Chipre, Marruecos, Turquía, Grecia, Argelia y Túnez) con una producción anual de más de 135.000 t en 2019 (Tzatzani & Ouzounidou, 2023). En los últimos años se ha ido popularizando su cultivo en otras partes del mundo: América del norte y del sur, países del sur de África, Filipinas, Irán, India y Australia (Dahmani et al., 2023).

En el año 2022, según la estadística agraria anual del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, la producción de algarrobo en España fue de 47.286 t. El cultivo se distribuye entre Baleares, Comunidad Valenciana, Cataluña, Región de Murcia, Extremadura, Andalucía y Canarias, siendo las de mayor producción las tres primeras comunidades autónomas (Ministerio de Agricultura, 2023).

La algarroba, fruto del algarrobo, no es un alimento que haya surgido ahora. En la antigua Grecia y Roma se utilizaba para alimentar a humanos y animales. Los egipcios, además, utilizaban la pectina de la algarroba para momificar a los muertos e incluso le otorgaron un símbolo jeroglífico (*d3rt*) (Cardona Arenas, 2013; Tzatzani & Ouzounidou, 2023).



Figura 4. Algarrobo o garrofera localizado en Sierra Calderona, en la población de Olocau (Valencia). La foto fue tomada a principios de abril, primavera. Se pueden apreciar las vainas aún inmaduras de color verde. Fuente propia.

La biblia hace referencia a la algarroba en el Evangelio según Lucas 15:16: “Y deseaba llenar su vientre de las algarrobas que comían los cerdos, pero nadie le daba”. Esto da a entender que la algarroba era un alimento para animales que, en caso de necesidad, también era consumido por humanos. Otra referencia más controvertida se encuentra en el Evangelio según Mateo 3:4. Se dice que Juan Bautista se alimentaba de langostas y miel. Sin embargo, podría haberse confundido la forma de la vaina de algarroba con ese insecto (Cairati, 2013). Es por ello que, el árbol del algarrobo, en diferentes lenguas, es denominado “El árbol del pan de San Juan” (*St. John’s bread tree*, en inglés; *Johannisbrot*, en sueco; *Johannisbrotbaum*, en alemán) (Tzatzani & Ouzounidou, 2023).

La algarroba ha jugado un papel importante en tiempos de guerra y hambre. En la Segunda Guerra Mundial, fue utilizada de diversas maneras por los ciudadanos de Creta (Grecia) para su supervivencia (Tzatzani & Ouzounidou, 2023). En España, durante los años de la gran hambruna (1939-1952), la gente recurrió a la preparación de sucedáneos, por ejemplo el chocolate de algarroba, como estrategia de supervivencia (Román Ruiz, 2023).

1.2.1. Composición

El fruto del algarrobo es una legumbre indehiscente, comprimida, recta o curva (Figura 5). En su estado de madurez alcanza un color marrón con una textura similar al cuero. Mide entre 1 y 30 cm de longitud, 1,5-3,5 cm de anchura y 1 cm de grosor. La vaina está compuesta de pulpa (pericarpio) que representa el 80-90% del peso, y semillas, cuyo porcentaje varía dependiendo de la variedad. La pulpa (Figura 5C) consta del exocarpio, que es la capa externa dura, y mesocarpio y endocarpio, la capa interna blanda que envuelve las semillas (Figura 5D). Las semillas están dispuestas longitudinalmente y se componen de tres partes: cubierta o piel (30-33%), endospermo (42-46%) y germen o embrión (23-25%) (Malagon, 2020; Dahmani et al., 2023; Laaraj et al., 2023).

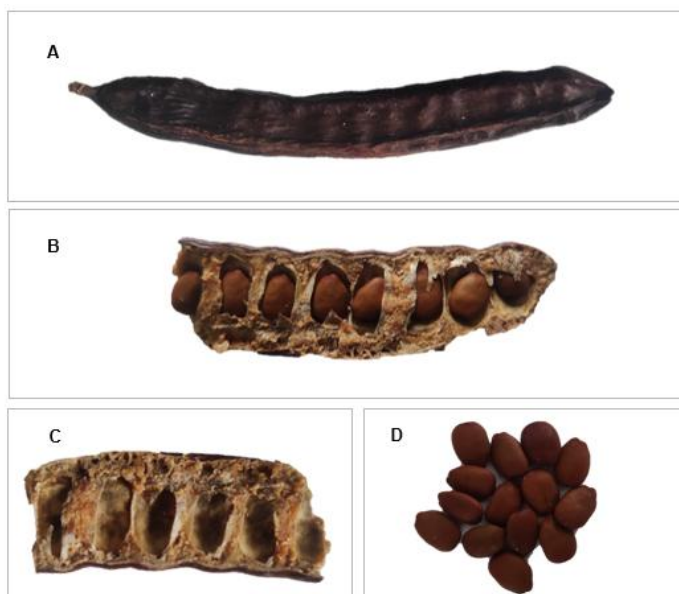


Figura 5. Morfología del fruto del algarrobo. A. Vaina de la algarroba madura. B. Interior de la vaina. C. Pulpa. D. Semillas. Elaboración propia.

Del endospermo de las semillas se extrae la goma garrofín, un aditivo (E410) utilizado por la industria alimentaria como emulgente, estabilizante, espesante y gelificante. Es considerado seguro por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) para su uso en muchos alimentos, incluidos las fórmulas infantiles, y para piensos de diferentes especies animales (Kawamura, 2016; Bampidis et al., 2022).

El proceso de extracción de la goma garrofín se realiza intentando descascarillar las semillas sin dañar el endospermo y el germen (Kawamura, 2016). Además se intenta garantizar que no se produzca contaminación que afecte a sus características (Laaraj et al., 2023). En la Figura 6 se esquematiza el procesado de obtención de la goma garrofín.

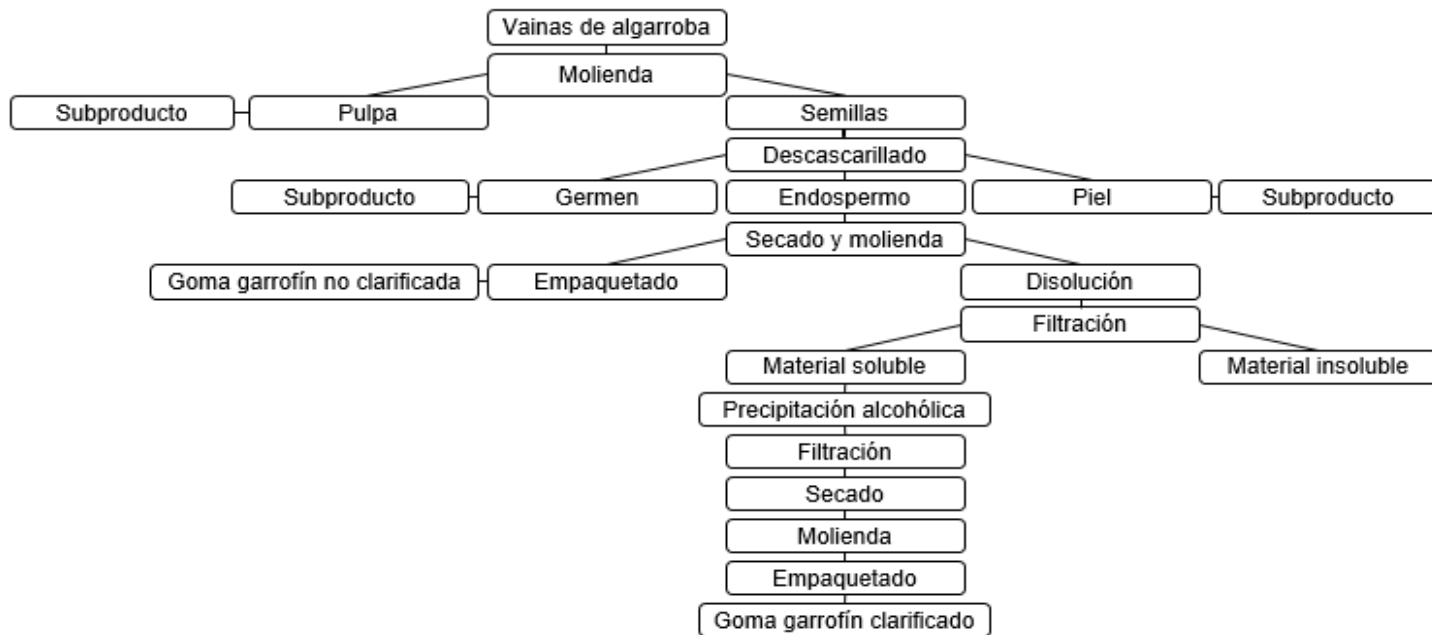


Figura 6. Diagrama del procesado de la goma garrofin. Elaboración propia.

Pulpa

Los componentes de la pulpa de la algarroba se recogen en la Figura 7.

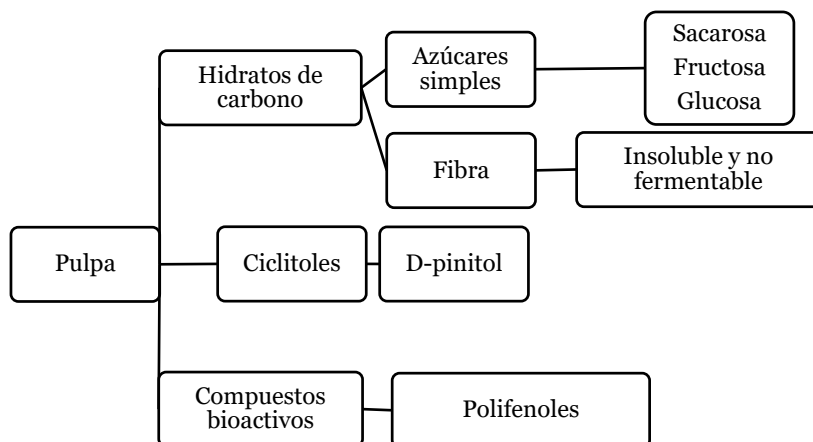


Figura 7. Principales componentes de la pulpa. Elaboración propia.

Los hidratos de carbono constituyen el componente más abundante de la pulpa (51,9–51,7%) siendo rico en azúcares simples con un porcentaje que oscila entre 48 y 65% (Özcan et al., 2007; Mahtout et al., 2018; Papaefstathiou et al., 2018). La sacarosa (32–50%) es el azúcar mayoritario, seguido de la fructosa (5–13%) y la glucosa (5–12%) (Mahtout et al., 2018; Gioxari et al., 2022).

La fibra dietética es considerada un carbohidrato con tres o más unidades monoméricas que no se digieren en el intestino delgado. Se clasifican según su solubilidad en agua (solubles e insolubles) y la capacidad de la microbiota de fermentarlas (fermentables y no fermentables) (Khorasaniha et al., 2023). El contenido total de fibra en la pulpa de algarroba no está claramente

definido. Algunos estudios señalan alrededor de un 10% (Özcan et al., 2007), otros indican alrededor de un 25% (Papaefstathiou et al., 2018), y otros lo sitúan aún más alto, entre 30 y 40% (Haber, 2002). En cualquier caso, los estudios coinciden en que la mayor parte de la fibra es insoluble y no fermentable (hemicelulosa, celulosa y lignina) (Zhu et al., 2019), alcanzando en torno a 70g frente a 6–10g de soluble (Haber, 2002; Owen et al., 2003). Los polifenoles de la pulpa de algarroba están unidos a la fibra por enlaces covalentes. Es por ello que la fibra, en comparación con otros productos de la algarroba como la harina, contiene mayores cantidades de polifenoles (Papagiannopoulos et al., 2004; Goulas et al., 2016). Se estima que la concentración de polifenoles en la pulpa ronda entre 1–2%, siendo el ácido gálico el mayoritario (Goulas et al., 2016; Nasar-Abbas et al., 2016; Rodríguez-Solana et al., 2021). En la Tabla 2, se recogen los diferentes componentes fenólicos que se encuentran en la pulpa.

Tabla 2. Polifenoles más comunes en la pulpa de algarroba.

	Polifenol
Ácidos Fenólicos	Ácido 4-hidroxibenzoico
	Ácido cafeico
	Ácido cinámico
	Ácido cumárico
	Ácido ferúlico
	Ácido gálico
	Ácido siríngico
Flavonoides	Apigenina
	Catequina
	Crisoeriol
	Eridictiol
	Genistéina
	Isorhamnetina
	Kaempferol
	Kaempferol-desoxihexósido y -dihexósido
	Luteolina
	Hexósido de miricetina
	Naringenina
Quercetina-desoxihexósido y -hexósido	
Ramnósido de quercetina	
Éter 3',5'dimetílico de tricetina	

Los ciclitoles son polialcoholes cíclicos que se encuentran tanto en el reino animal como vegetal. Uno de los más conocidos dentro de este grupo es el inositol, un anillo de seis carbonos con un hidroxilo en cada uno de ellos (Azab, 2022). En la pulpa de algarroba se han aislado y caracterizado seis: D-pinitol (3-O-metil-D-chiro-inositol), mio-inositol, D-(+)-chiro-inositol, ononitol (4-O-metil-mio-inositol), sequoyitol (5-O-metil-mio-inositol) y bornesitol (1-O-metil-mio-inositol) (Goulas et al., 2016 Azab, 2022). El D-pinitol se encuentra en concentraciones elevadas y, de hecho, la algarroba es la planta con mayor contenido de este compuesto (Azab, 2022). Debido a que la algarroba es rica en este ciclitol y otras fuentes vegetales lo contienen en cantidades mucho menores, su análisis permite identificar posibles adulteraciones o mezclas en alimentos y derivados. Turhan (2014) determinó las cantidades de este ciclitol en algarrobas cultivadas y salvajes, observando que las concentraciones de D-pinitol de los genotipos cultivados y silvestres de algarroba oscilaron entre 19,2 y 61,9 g/kg y entre 10,1 y 84,6 g/kg, respectivamente. Además, este autor halló que un incremento en glucosa va siempre asociado a mayores concentraciones de D-pinitol (Turhan, 2014)

La pulpa presenta bajo contenido en proteína (3–4,7%) (Özcan et al., 2007; Mahtout et al., 2018; Papaefstathiou et al., 2018). Mahtout y colaboradores analizaron el contenido de proteína en base a su solubilidad, obteniendo una mayor cantidad de glutenina insoluble (2,6%). Además, mostraron mayor valor de digestibilidad proteica en comparación con las proteínas de las semillas, la vaina y las hojas de algarrobo (Mahtout et al., 2018).

Otro nutriente que se encuentra en concentraciones bajas es la grasa, cuyo porcentaje oscila entre 0,2% y 1,5% (Özcan et al., 2007; Mahtout et al., 2018; Papaefstathiou et al., 2018).

Semillas

Como se ha comentado anteriormente, las semillas están compuestas por la piel, germen y endospermo (Figura 8).

La piel o cubierta seminal, cuya eliminación es el primer paso de la extracción de la goma garrofin, es similar a la pulpa en términos de composición nutricional. Tiene un alto contenido en hidratos de carbono (75,8% – 93,3%) (Albertos et al., 2015; Aubin Dakia et al., 2017; Rico et al., 2019), siendo los azúcares simples más abundantes la arabinosa (20,3%) y la xilosa (6%), seguido de la galactosa (1,6%), la glucosa (1,2%), la ramnosa (1,1%) y la manosa (0,7%) (Aubin Dakia et al., 2017). Posee más contenido en fibra insoluble (60,3-62%), donde la celulosa, hemicelulosa y lignina representan el 33%, 20% y 9% de la fibra, respectivamente (Albertos et al., 2015; Lakkab et al., 2019; Rico et al., 2019). Tiene un contenido elevado de compuestos fenólicos donde el grupo fenólico mayoritario son los flavonoles y el componente con mayor concentración el ramnósido de quercetina (Albertos et al., 2015; Lakkab et al., 2019; Rico et al., 2019). En la Tabla 3 se recogen los componentes fenólicos encontrados en la piel de la semilla de algarrobo.

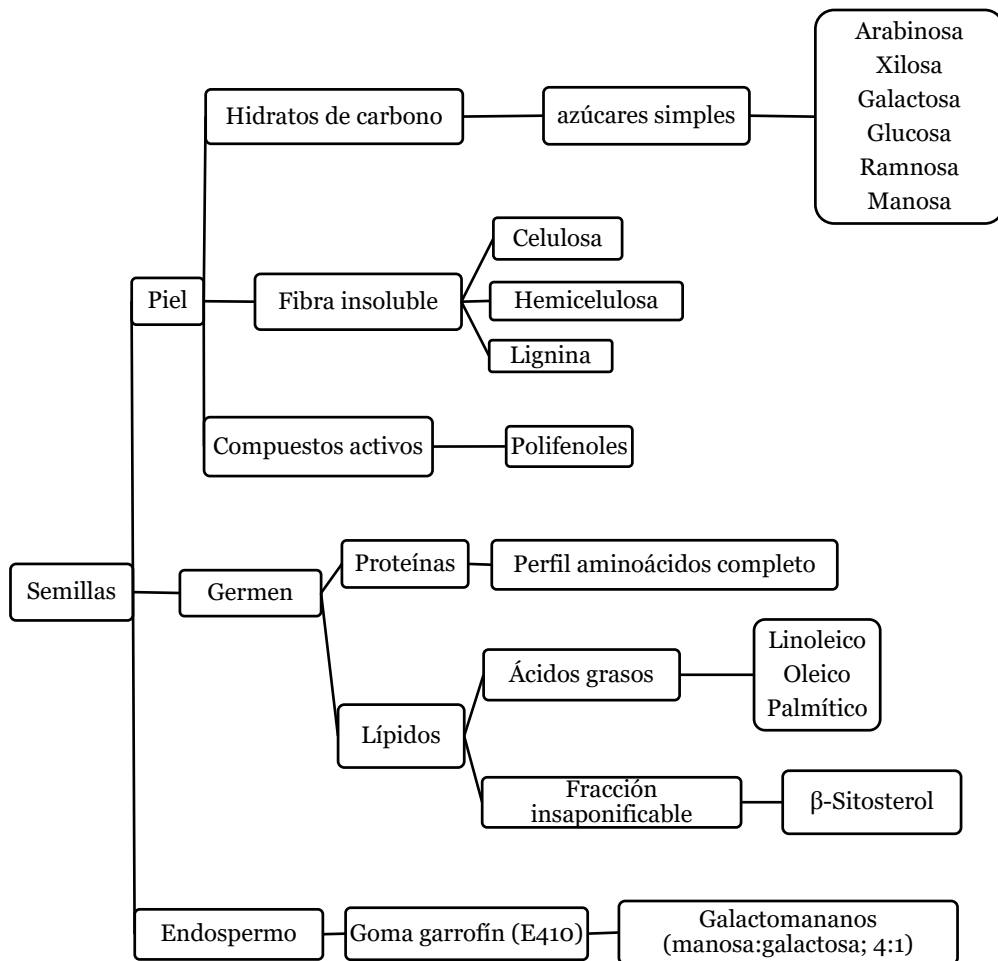


Figura 8. Principales componentes de las diferentes partes de la semilla del algarrobo. Elaboración propia.

Tabla 3. Componentes fenólicos de la piel de semilla de algarrobo.

Polifenoles	
Ácidos fenólicos	Ácido Gálico
	Digalato de glucosa
	Trigalato de glucosa
	Apigenina 6-C-hexosil-8-C-hexósido
	Apigenina 6-C-hexosil-8-C-pentósido
	Quercetina 3-O-glucósido
Flavonoides	Quercetina O-pentósido
	Apigenina C-hexósido-O-ramnosil-hexósido
	Quercetina O-ramnósido
	Isorramnetina 3-O-hexósido
	Isorramnetina O-pentósido
	Kaempferol O-ramnósido
	Isorramnetina O-ramnósido

El contenido de proteínas y grasas de la cubierta de la semilla, es bajo, con un porcentaje aproximado de 3,7–5,8% y 0,3–0,5% respectivamente, mientras que el germen tiene mayor contenido proteico y lipídico

Las proteínas del germen, consideradas como proteína completa por incluir los aminoácidos esenciales, varían entre un 24% y 67% (Dakia et al., 2007; Bengoechea et al., 2008; Durazzo et al., 2014) dependiendo del método de extracción. Las glutelinas son las más abundantes (78%) mientras que la fracción de albúmina/globulina comprende un 22% (Smith et al., 2010). Del germen destaca el caroubin, una proteína que posee similitudes en su propiedades reológicas con el gluten de trigo (Yulan Wang et al., 2001).

En la Tabla 4 se recoge la composición lipídica del germen, la cual tiene un perfil nutricionalmente interesante, con un porcentaje que varía según los estudios, entre 2,5% y 2,9% (Durazzo et al., 2014; Rico et al., 2019), o entre 7,1% y 8,2% (Dakia et al., 2007; Siano et al., 2018). El ácido graso predominante es el linoleico (43–45%) seguido del oleico (32–35,5%) y palmítico (14,1–15,7%) (Dakia et al., 2007; Siano et al., 2018). En

consideración a la fracción insaponificable, destaca el β -Sitosterol ($736,6 \pm 36,8$ mg/kg) (Siano et al., 2018).

Tabla 4. Componentes lipídicos encontrados en el germen.

Lípidos	
Ácidos grasos	Linoleico, C18:2, ω -6c
	Oleico, C18:1, ω -9c
	Palmítico, C16:0
	Esteárico, C18:0
	Linolénico, C18:3, ω -3
	Araquídico, C20:0
	cis-11-Eicosenoico, C20:1
	Behénico, C22:0
	Lignocérico, C24:0
	Palmitoleico, C16:1
	Heptadecanoico, C17:0
Gadoleico, C20:1	
Fracción Insaponificable	β -Sitosterol
	Estigmasterol
	Δ 5-Avenasterol
	Campesterol
	β + γ -Tocoferol
	α -Tocoferol
Escualeno	

En los distintos cultivos de algarrobo, el perfil fenólico de la cubierta muestra variaciones, con un rango que va desde el 3,2% hasta el 11,6%, confirmándose la presencia de ácido gálico en todas las muestras (Custódio et al., 2011).

Además de la cubierta y el germen, la semilla contiene el endospermo, del cual se obtiene la goma garrofín, un polvo blanco amarillento inodoro (Bampidis et al., 2022), cuyo compuesto principal es el galactomanano (66,5% – 85,2%) (Dakia et al., 2008; Aubin Dakia et al., 2017) un polisacárido de elevado peso molecular. Su estructura molecular, compuesta por una cadena principal de manosa con ramificaciones de galactosa, le confiere una gran capacidad para retener agua y formar soluciones viscosas, lo que la hace ideal para mejorar la textura y estabilidad de productos como helados, salsas, productos lácteos y

panificados. Además, su origen natural y su compatibilidad con otros hidrocoloides la convierten en una alternativa en la industria alimentaria.

A parte de galactomanano, el endospermo contiene trazas de glucosa, xilosa, arabinosa y ramnosa, y un contenido lipídico bajo (0,8% – 1,5%) (Dakia et al., 2008; Durazzo et al., 2014).

El contenido en proteína oscila entre un 5,2% y 7,2%. Son proteínas estructurales y enzimáticas presentes en el endospermo, pero este contenido puede incluir una potencial contaminación por fragmentos de germen (Dakia et al., 2008; Durazzo et al., 2014; Dakia et al., 2017). En relación a la cantidad de compuestos fenólicos, es la estructura seminal con menor cantidad (Durazzo et al., 2014).

1.2.2. Propiedades funcionales

El algarrobo ha sido objeto de numerosas investigaciones que han mostrado sus beneficios para la salud. Se han analizado tanto extractos de las diferentes partes del fruto como productos derivados de este, e incluso de las hojas del árbol. A continuación, se analizarán algunas de las propiedades biológicas atribuidas a los subproductos derivados de la algarroba englobando a los componentes extraídos de ellos.

Antioxidante

Como se ha comentado anteriormente, la algarroba es rica en flavonoides y ácidos fenólicos, especialmente los subproductos generados en la extracción de la goma garroffín, la pulpa de la vaina y la piel de las semillas. Se sabe que estos polifenoles tienen capacidad de reducir las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el óxido de nitrógeno (NO) proporcionando protección frente al daño celular (Kumar & Goel, 2019; Shen et al., 2022). Es por ello que la algarroba

ha sido objeto de varios estudios en los que se ha examinado su potencial antioxidante basándose fundamentalmente en el método de la determinación del radical libre 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH). Los resultados han mostrado una respuesta dosis-dependiente de los diferentes extractos obtenidos de los subproductos de algarroba observándose que la acción antioxidante varió dependiendo del método de extracción empleado (Roseiro et al., 2013; Mansouri et al., 2022; Kavvoura et al., 2023).

Respecto a estudios *in vitro*, se ha analizado el efecto de los antioxidantes presentes en extractos de semillas de algarroba sobre las ROS en algunos tipos celulares. Por ejemplo, en fibroblastos, los compuestos fenólicos, suprimieron los niveles de ROS provocados por el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Kavvoura et al., 2023). En animales se han confirmado las propiedades antioxidantes al elevar los niveles de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx), y reducir la concentración del malondialdehído (MDA) (marcador de estrés oxidativos) (Lakkab et al., 2022).

Anticancerígeno

Se ha descrito la actividad antiproliferativa y apoptótica de derivados de algarroba contra células cancerígenas. En varios estudios del equipo de Klenow y colaboradores se ha examinado el efecto del extracto de fibra de algarroba en células de adenocarcinoma colorrectal. Los resultados mostraron una potente inhibición en la proliferación celular atribuida a la supresión de la síntesis de ADN (Klenow et al., 2008, 2009; Klenow & Gleib, 2009).

Por otro lado, Custodio y colaboradores, concluyeron que la pulpa de algarroba afecta a la viabilidad de células cancerosas de cérvix y de mama, reduciéndola vía apoptosis (Custodio et al., 2011). Como curiosidad, los resultados indicaron que ese efecto estaba influenciado por el género y tipo de

cultivo del algarrobo ya que los cultivares hermafroditas presentaron mayor actividad que los árboles femeninos. También se ha demostrado que los extractos de la pulpa de algarroba tienen actividad antiproliferativa frente a células de cérvix y de mama, además de en células de neuroblastoma de ratas (Roseiro et al., 2013).

Antidiabético

La DM2 está caracterizada por una resistencia a la insulina e hiperglucemia causada por una disfunción en las células β del páncreas. La obesidad y el sobrepeso, así como el seguimiento de dietas con bajo consumo de vegetales, se consideran un factor de riesgo (Elsayed et al., 2023).

Estudios *in vivo* han utilizado productos de la algarroba como terapia para regular el control de la glucemia. En ratas sanas, la administración de fibra insoluble de algarroba disminuía la glucemia postprandial (Macho-González et al., 2017). Además, al añadirla a una matriz alimentaria como la carne, la fibra reducía la hiperglicemia y mejoraba los niveles de insulina en ratas diabéticas (Macho-González et al., 2020).

Como se ha comentado anteriormente, uno de los componentes mayoritarios de la pulpa es el D-pinitol, el cual ha demostrado tener múltiples propiedades, entre ellas la regulación de la insulina (Azab, 2022). La reducción de la glucosa en ayunas y la mejora en el peso corporal, así como la tolerancia a la glucosa y a la insulina en ratas con DM2, fueron respuestas dosis-dependiente observadas con la ingesta de D-pinitol (Geethan & Prince, 2008; Gao et al., 2015).

Hipolipemiente

La dislipidemia se caracteriza por niveles anormales de CT, TGs y algunas especies de lipoproteínas (LDL, HDL y lipoproteína (a)) y está asociada con el

aumento de riesgo de ECV aterosclerótica (Berberich & Hegele, 2022). Entre las recomendaciones de las guías europeas para el manejo de las dislipidemias, se encuentra la modificación de los hábitos dietéticos para la mejora del perfil lipídico. Una de las indicaciones es el aumento de alimentos ricos en fibra (Mach et al., 2020).

Debido al alto contenido de fibra de la algarroba, especialmente de la pulpa, se pensó que podría tener efectos sobre los niveles de lípidos plasmáticos y es por ello que se han llevado a cabo estudios en humanos y animales, como se recoge en la revisión de Nemet y colaboradores (Nemet et al., 2022).

Al añadir preparados de fibra insolubles de algarroba con polifenoles en dietas altas en grasas, los niveles de TGs, CT y LDL se atenuaron en ratones (Valero-Muñoz et al., 2014, 2019) y conejos (De La Fuente-Fernández et al., 2020).

La algarroba, también, ha tenido efecto sobre la hipertrigliceridemia postprandial ligada a la resistencia de la insulina y la DM2. En ratas que seguían una dieta normal, los TGs y LDL disminuían de forma dosis-dependiente, es decir, a mayor cantidad de algarroba y durante más tiempo, los niveles de hipertrigliceridemia postprandial se reducían (Macho-González et al., 2018). Asimismo, se ha sugerido el uso del extracto de fibra de la pulpa de algarroba como un ingrediente funcional destinado a pacientes con pre-diabetes para corregir las alteraciones lipídicas. Esta sugerencia nace del resultado obtenido en ratas con DM2, cuyo perfil lipídico mejoraba al añadir a la dieta el extracto de algarroba (Macho-González et al., 2019).

En humanos también se han llevado a cabo intervenciones cuyos resultados están en consonancia con los obtenidos en animales. Por ejemplo, Ruiz-Roso y colaboradores (Ruiz-Roso et al., 2010) reclutaron a 97 pacientes con riesgo cardiovascular y a la mitad les administraron Exxenterol®, un preparado de fibra insoluble rica en polifenoles de la algarroba. En comparación con el

grupo que recibía placebo, los niveles de CT, TGs y LDL disminuyeron, mientras que el HDL mejoró tras las cuatro semanas del tratamiento. Otros preparados de fibra de algarroba han sido añadidos a alimentos como leches, panes, cereales o barritas (Zunft et al., 2001, 2003; Martínez-Rodríguez et al., 2013). A la hora de comprobar sus efectos en voluntarios con riesgo cardiovascular, se vio que los niveles de CT, TGs y LDL disminuían, aunque los resultados no eran significativos (Zunft et al., 2001; Martínez-Rodríguez et al., 2013). Cuando se comparaba con un grupo placebo, el resultado de los análisis de CT y LDL sí fueron significativos (Zunft et al., 2003).

Antimicrobiano

Actualmente hay una problemática con la resistencia a antimicrobianos que atenta sobre la salud humana y animal. Son múltiples los microorganismos que desarrollan resistencia, por lo que ha aumentado la búsqueda e investigación de nuevas alternativas, focalizándose en las especies vegetales (World Health Organization, 2016; Gonelimali et al., 2018). Las plantas contienen gran cantidad de compuestos con actividad antimicrobiana (Gonelimali et al., 2018) siendo el fruto del algarrobo también estudiado con esta finalidad. En la Tabla 5 se recogen los tipos de extractos de algarroba empleados y las bacterias y hongos sobre los que ejercen su actividad inhibitoria. Tal y como se puede ver, esta propiedad antimicrobiana se ha asociado a los compuestos fenólicos, en el caso de extractos etanólicos (Tassou et al., 1997; Meziani et al., 2015), e hidrocarburos y monoterpenos, en el caso de los aceites esenciales (Hsouna et al., 2011). Además, se podría considerar a la algarroba coadyuvante de los antibióticos dado que potencian su acción (Ibrahim et al., 2013; Abdul-Hussein, 2018).

Tabla 5. Bacterias y hongos afectados por diferentes extractos de los subproductos de la algarroba.

Extracto	Bacteria
Metanólico	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6536
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 1880
	<i>Staphylococcus epidermis</i> ATCC 12228
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031
	<i>Listeria monocytogenes</i> (aislado de comida)
Acuoso	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
Etanólico	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i> S-6
	<i>Staphylococcus aureus</i> 722
Aceites esenciales	<i>Pseudomonas fragi</i>
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
	<i>Staphylococcus epidermis</i> ATCC 12228
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739
	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	
Hongo	
Acuoso	<i>Candida albicans</i>
	<i>Fusarium graminearum</i>
	<i>Fusarium culmorum</i>
Aceites esenciales	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Aspergillus flavus</i>
	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	<i>Aspergillus nidulans</i>

1.3. Vesículas extracelulares (VEs)

1.3.1. Definición

Las vesículas extracelulares (VEs) son nano- o micropartículas delimitadas por una bicapa lipídica y liberadas por todo tipo de células incluyendo animales, plantas, bacterias y hongos (Welsh et al., 2024). En los años 60 fueron descritas como un mecanismo de eliminación al medio extracelular de desechos intracelulares (Wolf, 1967). Sin embargo, en la actualidad diversas investigaciones han sugerido que desempeñan un papel importante en la comunicación celular transportando proteínas, lípidos, ácidos nucleicos (ARN, microRNAs, DNA) y otros metabolitos (Van Niel et al., 2018).

1.3.2. Biogénesis y tipología

De manera general se recomienda el uso del término VEs debido a la heterogeneidad de los subgrupos que se han descrito (Welsh et al., 2024).

Los principales grupos descritos son los ectosomas y los exosomas clasificados de acuerdo a su tamaño y biogénesis. En la Figura 9 se representan de manera esquemática las vías de biogénesis y secreción de ambos tipos. Los ectosomas son un grupo de VEs de medio (200 – 800 nm) y gran tamaño (≥ 1000 nm) producidas por la evaginación o gemación de la membrana plasmática (Buzas, 2023). Sin embargo, los exosomas son de origen endosomal, liberados al fusionarse los cuerpos multivesiculares (CMVs) con la membrana plasmática. Son considerados como VEs pequeñas al tener un tamaño de 50 y 150 nm (Buzas, 2023).

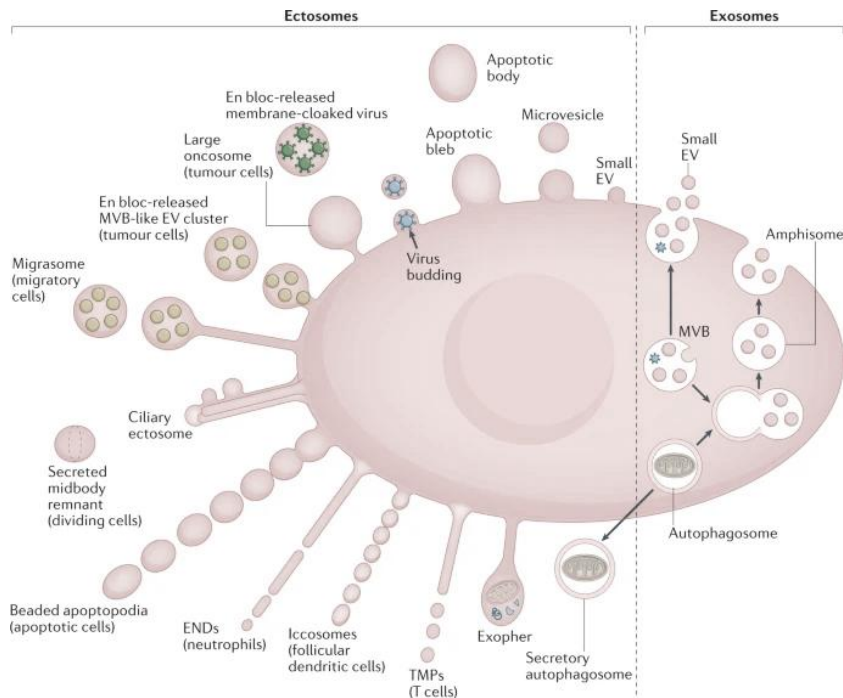


Figura 9. Representación de la biogénesis de los dos grupos principales de VEs: ectosomas y exosomas. Fuente: Buzas, 2023.

La formación de exosomas y el transporte de los CMVs están regulados por los Complejos de Clasificación Endosomal Requeridos para el Transporte (ESCRT, por sus siglas en inglés). Es por ello que se espera que también sus proteínas accesorias (Alix, TSG101, HSC70 y HSP90 β) se encuentren en los exosomas sin importar el origen celular. Además, existe otra vía de formación independiente de ESCRT, regulada por tetraspaninas (CD63, CD9 y CD81). Aunque estas proteínas se consideraban como marcadores específicos de exosomas, se han encontrado también en subgrupos de ectosomas como

cuerpos apoptóticos (CA) y microvesículas (MVs) (Van Niel et al., 2018; Doyle & Wang, 2019).

1.3.3. Aislamiento de VEs

Actualmente el aislamiento de VEs es un desafío dado que no hay una metodología estandarizada y existe una variedad de poblaciones con características diferentes, a lo que también se suma la complejidad de los fluidos de donde son extraídas (Doyle & Wang, 2019; Sidhom et al., 2020). Independientemente de la nomenclatura, las VEs han sido aisladas por varias técnicas siendo las principales: precipitación, ultracentrifugación diferencial (UCD), ultrafiltración, gradiente por densidad, cromatografía por exclusión molecular (SEC) y técnicas de flujo (Figura 10) (Welsh et al., 2024).

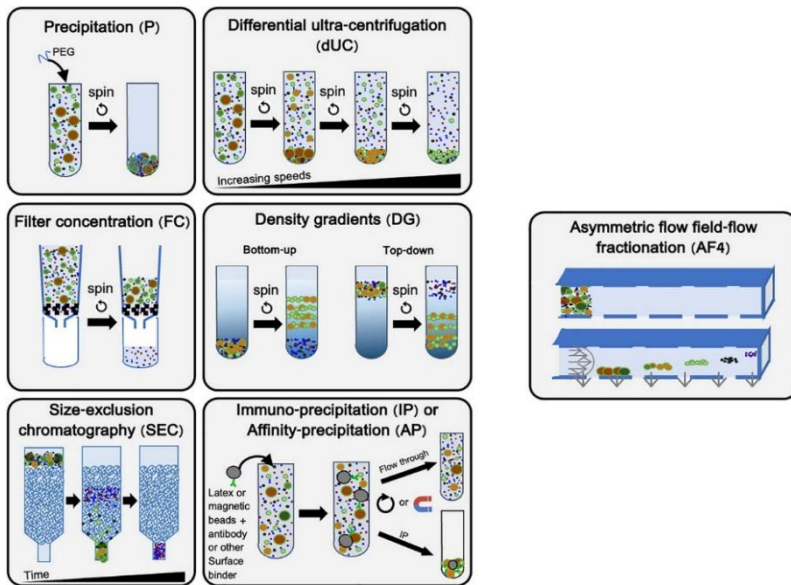


Figura 10. Técnicas de aislamiento más utilizadas para el aislamiento de VEs. Fuente: Welsh et al., 2024.

El primer método empleado para el aislamiento de VEs fue la UCD y, a día de hoy, es considerada la técnica “*gold standar*” (Doyle & Wang, 2019). Se basa en la separación secuencial de partículas por sedimentación dependiendo de la densidad y tamaño. El proceso comienza con una serie de centrifugaciones crecientes cuyo objetivo es obtener una concentración elevada de exosomas, aunque también puede haber una elevada cantidad de MVs, CA, lipoproteínas y agregados proteicos. El último paso es una ultracentrifugación de 100.000 – 200.000×g durante mínimo 70 minutos (Sidhom et al., 2020). No obstante, el uso de este método viene asociado a problemas. Por un lado, sucesivas repeticiones de ultracentrifugación pueden afectar la integridad estructural y biológica de los exosomas, originar agregaciones, co-sedimentar partículas y generar un rendimiento subóptimo (Visan et al., 2022). Además, es un procedimiento que requiere tiempo (Doyle & Wang, 2019; Sidhom et al., 2020). Es por ello que su popularidad está cayendo y nuevas metodologías están surgiendo, como la cromatografía por exclusión molecular o SEC.

La SEC se basa en el peso y en el tamaño de las partículas. La muestra se coloca en la parte superior de una columna cargada con una matriz formada por polímeros como agarosa o dextranos con un tamaño de poro definido. Las partículas de mayor tamaño atraviesan más rápidamente la matriz, recolectándose en fracciones tempranas, mientras que las más pequeñas se retienen por más tiempo y eluyen en fracciones posteriores. Existen variables que afectan a la separación por SEC como la composición y el tamaño de la matriz, el método de empaque de la columna, la velocidad de flujo, y la concentración y volumen de la muestra inicial (Welsh et al., 2024).

La SEC ha evidenciado múltiples ventajas frente a otras técnicas de aislamiento: alta pureza de las VEs, preservación de la integridad física y molecular de las VEs, gran eficiencia con un tiempo de procesamiento de aproximadamente 20 minutos por muestra, facilidad de aplicación y

escalabilidad, bajo coste y mínima necesidad de personal capacitado (Monguió-Tortajada et al., 2019; Sidhom et al., 2020). En la Tabla 6 está representada una comparativa entre la UCD y la SEC.

La SEC se utiliza frecuentemente asociada a otras técnicas como la UCD y la ultrafiltración. Se ha observado que una combinación de SEC con la técnica de filtración tangencial por flujo (TFF, por sus siglas en inglés) resulta en un aislamiento con elevado rendimiento cualitativo y cuantitativo de exosomas (Visan et al., 2022).

Tabla 6. Comparación entre las técnicas de aislamiento por Ultracentrifugación Diferencial (UCD) y Exclusión por Peso Molecular (SEC). La puntuación se clasifica como elevado (+++), intermedio (++) y bajo (+). Fuente: Sidhom et al., 2020.

	UCD	SEC
Mecanismo de separación	Tamaño, densidad	Tamaño, forma, peso molecular
Especificidad	++	++
Recuperación	++	+++
Pureza	+++	+++
Volumen de la muestra inicial	+++	+
Tiempo	+++	+
Coste	+	+
Equipamiento especializado	++	+
Complejidad	++	+
Eficiencia	++	+++
Funcionalidad de las VEs	++	+++
Escalabilidad	++	+++

1.4. VEs en plantas

1.4.1. Historia y nomenclatura

A mitad de la década de los 60, cuando aún se consideraba que las VEs de animales sólo eran mecanismos de eliminación de desechos, se realizó la primera observación de VEs en plantas. Mediante microscopía electrónica, se obtuvieron imágenes en las que los CMVs de células de zanahoria se fusionaban con la membrana plasmática y liberaban vesículas al espacio intersticial (Halperin & Jensen, 1967).

Cuarenta años después, en 2007, el equipo de An y colaboradores señaló una posible secreción de vesículas vegetales, biológica y morfológicamente similares a exosomas de mamíferos, al espacio extracelular mediante la fusión de CMVs con la membrana plasmática (An et al., 2006).

En el año 2009, se aislaron por primera vez vesículas a partir de los fluidos extracelulares de las semillas de girasol (Regente et al., 2009). Ese fluido extracelular correspondía al apoplasto (fluido apoplástico, FA), el espacio externo periférico a la membrana plasmática de las células vegetales que abarca las paredes celulares y los espacios libres intercelulares de los tejidos vegetales. El apoplasto está involucrado en una amplia gama de procesos fisiológicos: transporte de agua y nutrientes vía xilema, mecanismos de defensa de la planta, interacciones celulares, mantenimiento de las paredes celulares y transmisión de señales ambientales y de desarrollo (Rodríguez-Celma et al., 2016).

Más recientemente, otros investigadores han aislado VEs del FA de diversas plantas: *Arabidopsis thaliana* (Rutter & Innes, 2017; Cai et al., 2018; He et al.,

2021), *Sorghum bicolor* (Chaya et al., 2023) y cultivares de plantas de cáñamo (Ipinmoroti et al., 2023).

En todos estos estudios se ha utilizado la técnica de la infiltración al vacío seguida de centrifugación para recolectar el FA. El tejido se somete a infiltración de un tampón salino bajo vacío, y, a continuación, el fluido resultante se extrae del apoplasto de los tejidos mediante centrifugación.

Por otro lado, en 2023, se aislaron por primera vez VEs de la savia del floema de plantas de melón (Garzo et al., 2023). El floema, junto con la xilema, forma parte del sistema de transporte vascular de las plantas. Su función principal es el transporte de fotosintatos desde una fuente, principalmente un órgano fotosintético activo, hasta los sumideros, órganos y tejidos de destino.

Aunque se sabe que las células y tejidos de animales liberan diferentes tipos de VEs al medio extracelular, en el mundo vegetal es más complicado definirlos con exactitud. Las nanovesículas que se han aislado tanto en el FA como en el floema, podrían ser consideradas como verdaderas VEs ya que en su aislamiento no se emplean métodos que puedan producir destrucción celular. Sin embargo, no está tan claro que esa nomenclatura sea apropiada cuando las vesículas se aíslan de zumos de frutas, ya que en estos casos pueden formarse vesículas microsomaes a partir de diferentes membranas celulares rotas durante el proceso (Pinedo et al., 2021; Welsh et al., 2024). Es por ello que en muchos artículos se les consideran como nanovesículas similares a exosomas o a VEs. No obstante, se recomienda el uso genérico de VEs, en lugar de exosomas, hasta que se conozca con mayor exactitud el origen subcelular. Asimismo, se sugiere (Pinedo et al., 2021) el término nanovesículas (NVs) para las fracciones vesiculares de tejidos vegetales obtenidas con procesos destructivos donde no se puede establecer una liberación natural en el espacio extracelular (Figura 11).

Para mayor comprensión de dicha tesis, a partir de aquí se empleará el término nanovesículas de manera general.

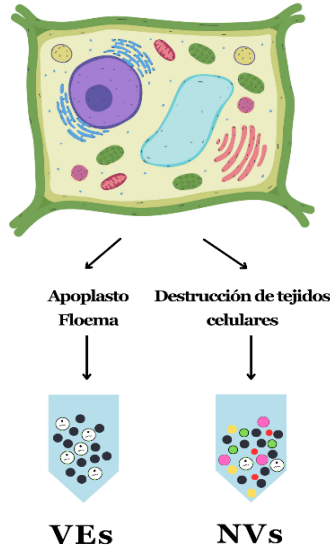


Figura 11. Representación ilustrativa del aislamiento de las vesículas extracelulares (VEs) de plantas extraídas de fluidos y nanovesículas (NVs) resultantes de la ruptura de tejidos y células vegetales. Tras aplicar métodos de aislamiento (UCD, SEC, ultrafiltración, gradiente por densidad) se obtienen contenidos diferentes. Por un lado, cuando se parte de apoplasto o floema, se consiguen VEs naturales; mientras que después de utilizar métodos disruptivos, se adquiere una mezcla de VEs con desechos de orgánulos intracelulares como mitocondrias, retículo endoplasmático o cloroplastos entre otros. Adaptación de Pinedo et al., 2021.

1.4.2. Biogénesis

Aunque la biogénesis de las VEs de plantas no está bien definida, los estudios muestran tres vías diferentes (representadas en la Figura 12): (i) asociadas a Tetraspanina 8/Tetraspanina 9 (TET8/TET9) secretadas a través de CMVs, (ii) asociadas a PEN1, (iii) derivadas de organelos positivos para el exocisto (EXPO). Además, podría haber otras subpoblaciones derivadas de vacuolas y/o autofagosomas (Lian et al., 2022).

La TET8 es un homólogo de CD63, un marcador clásico de exosomas en sistemas animales. Las VEs asociadas a TET8 probablemente deriven de

CMVs y podrían ser consideradas como auténticos exosomas de plantas (Cai et al., 2019).

Los organelos EXPO son específicos de plantas, diferentes a los CMVs pero dependientes de exocitosis. Las NVs derivadas de EXPO están marcadas por componentes del complejo Exocisto Exo70E2 y podrían desempeñar un papel de relocalización de moléculas relacionadas con la defensa durante la invasión de patógenos (Cai et al., 2019).

La proteína PEN1 se identificó por primera vez como una Sintaxina específica de plantas asociadas a la membrana plasmática (MP). Sin embargo, la vía de biogénesis de las NVs derivadas de PEN1 es aún desconocida (Cai et al., 2019). Algunos autores como Chaya y colaboradores (Chaya et al., 2023) la consideran como un marcador universal de VEs de plantas al participar en la entrega de compuestos de defensa y no como una proteína de carga funcional.

Además de estas proteínas, se consideran posibles marcadores de VEs de plantas las siguientes proteínas citosólicas: Anexina, *Heat shock proteins* (HSP70, HSP90), Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), Patelinas (PATL-1 y PATL-2) (Pinedo et al., 2021).

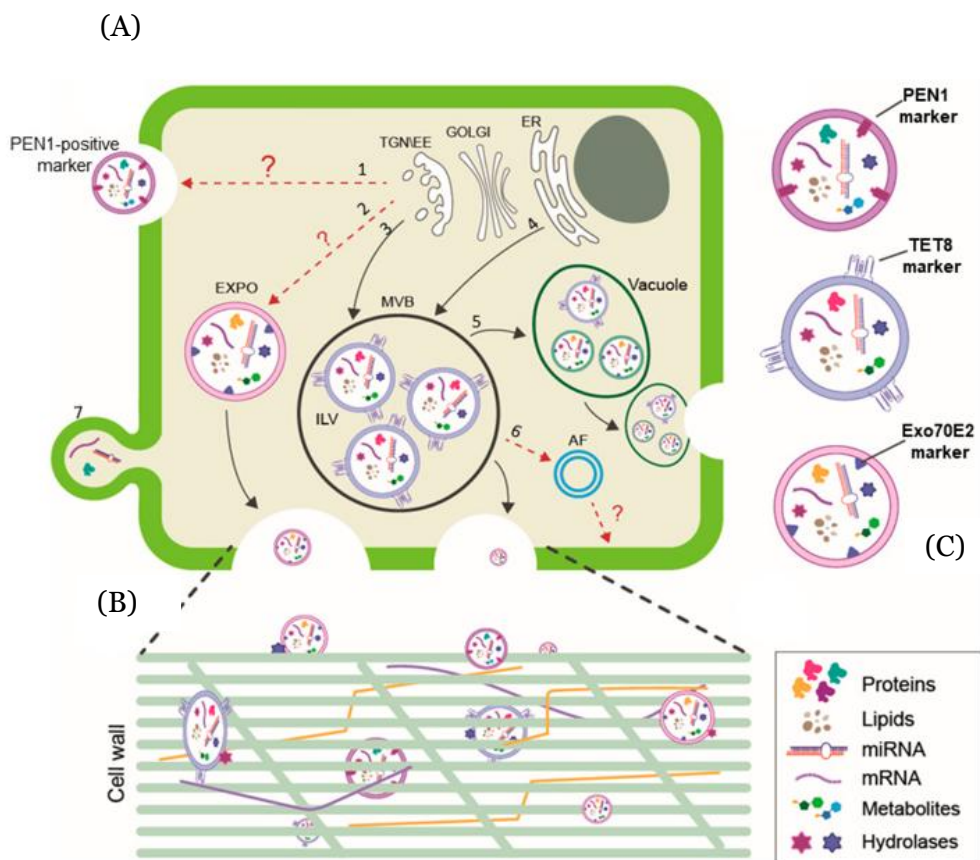


Figura 12. Vías de biogenesis de NVs de plantas. (A) Por un lado se encuentran las NVs asociadas a TET8/TET9, secretadas por CMVs y con un tamaño similar a los exosomas de animales (6 – 150nm). La formación de NVs asociadas a PEN1 no ha sido determinada en el momento de la escritura de la tesis. Las NVs derivadas de los organelos positivos para el exocisto (EXPO) tienen un tamaño en torno a 200 – 500nm. Podrían existir otras subpoblaciones derivadas de vacuolas y/o autofagosomas. (B) Representación gráfica del paso de las NVs a través de la pared celular donde las hidrolasas podrían estar implicadas. (C) Composición de las NVs. GN/EE: red trans-Golgi/endosoma temprano; RE: retículo endoplásmico; MVB: cuerpos multivesiculares (CMVs); ILV: vesícula intraluminal; AF: autofagosoma. El símbolo de interrogación (?) significa ruta hipotética. Fuente: Ambrosone et al., 2023.

1.4.3. Propiedades funcionales

En los últimos años, el interés de la comunidad científica por las NVs derivadas de plantas ha crecido significativamente. Como se ha comentado, desempeñan un papel clave en la comunicación intercelular, pero también se ha demostrado que poseen diversas propiedades funcionales, ya que pueden transportar moléculas bioactivas (Figura 13), modular la respuesta inmunológica o actuar como vehículos de fármacos.

Las NVs de plantas han sido aisladas de numerosas especies y de diferentes órganos o tejidos como hojas, raíces, semillas y frutos. De todos ellos, los frutos son los órganos vegetales más estudiados por su contribución a la dieta humana (Lo et al., 2024).

El papel fisiológico de las NVs derivadas de plantas puede estar determinado por la diversidad de biomoléculas que contienen como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y metabolitos (Figura 13). Dichas biomoléculas pueden participar en procesos tales como la comunicación célula-célula, la respuesta inmune de la planta, la simbiosis planta – microbio e incluso interactuar con células animales (Sánchez-López et al., 2024).

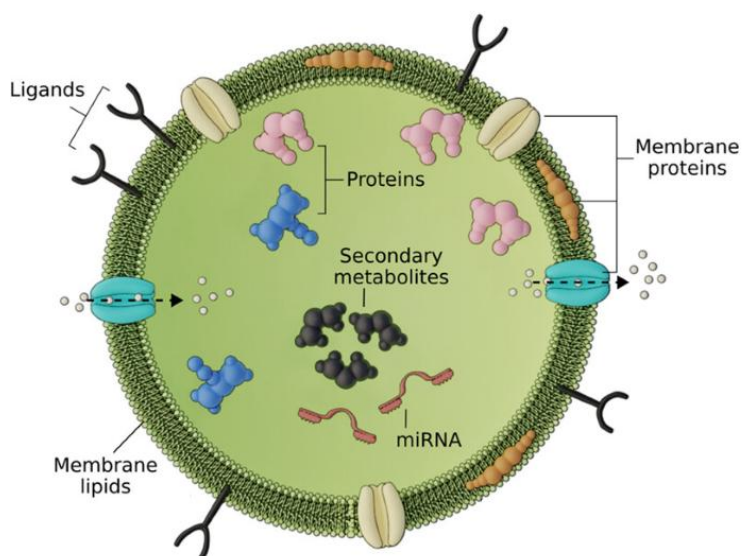


Figura 13. Representación esquemática del contenido de NVs de plantas. Fuente: Lian et al., 2022.

En las siguientes páginas se presentan y analizan las propiedades biológicas de las NVs de frutas (Tabla 7), verduras y especias (Tabla 8) y otras plantas comestibles (Tabla 9), destacando su efecto y el mecanismo de acción.

Tabla 7. Efectos descritos en NVs de frutas. Adaptada y actualizada a partir de Lo et al, 2024.

Fruta	Efecto	Mecanismo	Referencia
Limón	Antioxidante	- Disminución de los niveles de ROS en fibroblastos humanos (HDF) y embriones de pez cebra estimulados con H ₂ O ₂ y rayos ultravioleta (UV)	(Baldini et al., 2018; Urzi et al., 2023)
		- Activación de la vía AhR–Nrf2 en fibroblastos	
		- Mejora la supervivencia de células madre estromales (MSC) tratadas con H ₂ O ₂	
	Antiinflamatorio	- Disminución de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1β y TNF-α), inhibición de NF-κB mediante la reducción de la fosforilación de ERK1-2 en macrófagos murinos (RAW264.7) estimulados con LPS	(Raimondo et al., 2022)
- Reducción de IL-6 y TNF-α, y aumento de IL-10 en células THP-1 tratadas con LPS			
Anticancerígeno	- Alivio significativo de los síntomas y las características histológicas en la colitis inducida por ácido 2,4-dinitrobenzenosulfúrico (DNBS) en ratas, y modulación de NF-κB y Nrf2	(Raimondo et al., 2015; Yang et al., 2020; Takakura et al., 2022)	
	- Inactivación de las células intestinales cancerosas HCT-15 y SW480 a través de la supresión del p53		
	- Inhibición de la proliferación celular mediante la activación de la muerte celular apoptótica mediada por TRAIL, de las líneas tumorales A549, SW480, LAMA84 y en el modelo de xenoinjerto LAMA84 en ratones NOD/SCID		
		- Aumento de la expresión del gen GADD45A provocando la detención del ciclo celular en la fase S y la generación de ROS en células gástricas cancerosas (AGS, BGC-823 y SGC-7901)	

Tabla 7. Continuación.

Fruta	Efecto	Mecanismo	Referencia
	Cicatrizante	- Favorecimiento del cierre de heridas causadas por rayos UV en células HDF	(Urzi et al., 2023)
Limón	Modulación de la microbiota	- Modulación de la microbiota intestinal de ratas con colitis - Aumento de la supervivencia de bacterias probióticas (<i>Lactobacillus rhamno-sus GG</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>)	(Lei et al., 2020, 2021; Tinnirello et al., 2024)
	Anticancerígeno	- Bloqueo del ciclo celular en la línea celular de melanoma humano A375 en el punto de control G2/M - Aumento de los niveles ROS provocando un efecto antiproliferativo en células leucémicas (U937 y K562) y en cultivos de blastos primarios de leucemia mieloide aguda	(Stanly et al., 2020; Castelli et al., 2023)
Pomelo	Antiinflamatorio	- Mejora de la colitis inducida en ratones por sulfato de dextrano sódico (DSS) mediante la regulación de la expresión de HO-1, IL-1 β y TNF- α	(Wang et al., 2014)
	Antioxidante	- Reducción de la formación de ROS en HaCaT	(Savci et al., 2021)
	Cicatrizante	- Aumento de la migración y expresión de genes relacionados con la cicatrización de heridas (COL1A1, fibronectina, vimentina, laminina) en queratinocitos (HaCaT)	(Savci et al., 2021)

Tabla 7. Continuación.

Fruta	Efecto	Mecanismo	Referencia
Naranja	Regeneración	- Aumento del tamaño de las vellosidades, disminución del contenido de triglicéridos y modulación de los niveles de ARNm de genes implicados en la respuesta inmune (TNF- α , IL-1 β), permeabilidad de barrera (CLDN1, OCLN, ZO1), absorción de grasa y liberación de quilomicrones en ratones con obesidad	(Berger et al., 2020)
	Antiinflamatorio	- Regulación de la expresión de genes asociados con la inflamación (ICAM 1 y HMOX1) y las uniones estrechas (OCLN, CLDN1 y MLCK) de la línea Caco-2	(Bruno et al., 2021)
Mandarina	Antioxidante	- Reducción de la actividad enzimática relacionada con el estrés oxidativo causado por H ₂ O ₂ en macrófagos de ratón (RAW 264.7)	(Li et al., 2023)
	Antiinflamatorio	- Atenuación de los factores inflamatorios (IL-6, TNF α , IL-1 β e IL-10) inducidos por LPS en macrófagos de ratón (RAW 264.7)	(Li et al., 2023)
Manzana	Alteración genes transportadores	- Disminución de la expresión de ASBT, OATP2B1 y OCTN2 y aumento de BCRP	(Fujita et al., 2018)
	Antiinflamatorio	- Reducción de NF- κ B mediante la atenuación de las señales inducidas por TLR4 en fibroblastos de ratón (células L929)	(Trentini et al., 2022)
	Cicatrizante	- Prevención de la degradación de la matriz extracelular mediante el aumento de la síntesis de colágeno (COL3A1, COL1A2, COL8A1 y COL6A1) y la disminución de la producción de metaloproteinasas (MMP1, MMP8 y MMP9) en fibroblastos de ratón (células L929)	(Trentini et al., 2022)

Tabla 7. Continuación.

Fruta	Efecto	Mecanismo	Referencia
Uva	Regeneración	- Protección de la colitis inducida por DSS mediante la remodelación del tejido intestinal	(Ju et al., 2013)
	Antioxidante	- Neutralización de ROS inducidas por TNF- α en células endoteliales EA.hy926 - Disminución de ROS, aumento del potencial de la membrana mitocondrial y prevención de la apoptosis celular en células HepG2 tratadas con rotenona	(De Robertis et al., 2020; Zhao et al., 2022)
Arándano	Anti y pro-inflamatorio	- Disminución de IL-1 β e IL-8 y aumento de NF- κ B y TLR5 en células Caco-2	(Leng et al., 2023)
	Tratamiento de hígado graso no alcohólico	- Mejora de la resistencia a la insulina, de la disfunción de los hepatocitos y regulación de la expresión de genes desintoxicantes/antioxidantes en ratones alimentados con una dieta alta en grasas	(Zhao et al., 2022)
Fresa	Antioxidante	- Prevención de estrés oxidativo en células madre mesenquimatosas (MSCs)	(Perut et al., 2021)
Bayas de Goji	Antienvejecimiento	- Mejora de la calidad, la función del músculo esquelético y la expresión de la vía AMPK/SIRT1/PGC1 α	(Zhou et al., 2024)
		- Activación de la regeneración muscular	

Tabla 8. Efectos descritos en NVs de verduras y especias. Adaptada y actualizada a partir de la publicada por Lo et al, 2024

Verdura	Efecto	Mecanismo	Referencia
Melón amargo	Anticancerígeno	- Inducción de la detención del ciclo celular en la fase S y la apoptosis de células escamosas	(Yang et al., 2021)
	Antiinflamatorio	- Reducción de la expresión del inflamosoma NLRP3 en células escamosas	(Yang et al., 2021; Wang et al., 2023)
		- Inhibición de los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en ratones con colitis ulcerosa	
	Antioxidante	- Protección frente a radiación en cardiomiocitos de rata (H9C2) aliviando el daño del ADN	(Cui et al., 2022; Wang et al., 2023)
- Mitigación de la lesión miocárdica y fibrosis en un model de ratón con radiación torácica			
Zanahoria	Antioxidante	- Protección de la mucosa colónica regulando la oxidación al aumentar GSH, SOD, GSH-PX y CAT en ratones con colitis ulcerosa	
	Antiinflamatorio	- Inhibición de la disminución de la expresión de moléculas antioxidantes, tales como Nrf-2, HO-1 y NQO-1 en cardiomioblastos (H9C2) y neuroblastos (SH-SY5Y)	(Kim & Rhee, 2021)
Brócoli	Antiinflamatorio	- Translocación del NRF2 e inducción de la expresión de IL-10 en macrófagos de ratón, RAW264.7, inducidas por LPS	(Mu et al., 2014)
	Antioxidante	- Disminución significativa en la producción de ROS en células Caco-2 y NCI-H441 estimuladas con H ₂ O ₂ , y en células SHSY5Y tratadas con 6-hidroxi dopamina	(Hossain et al., 2022)
	Antiinflamatorio	- Activación de las vías antiinflamatorias AMPK mediante la regulación de la expresión de genes TNF- α , IL-17A, IFN- γ y IL-10 en ratones con colitis y en monocitos	(Deng et al., 2017)

Tabla 8. Continuación.

Verdura	Efecto	Mecanismo	Referencia
Jengibre	Antioxidante	- Activación de Nrf2 que condujo a la expresión de un grupo de genes desintoxicantes/antioxidantes hepáticos (HO-1, NQO1, GCLM, and GCLC) e inhibió la producción de ROS contribuyendo a la protección del hígado	(Zhuang et al., 2015)
	Antiinflamación	- Inhibición del inflamasoma NLRP3, supresión de la expresión de Casp1, IL-1, IL-18 y muerte celular piroptótica en macrófagos derivados de la médula ósea (BMDMs)	(Mu et al., 2014; Zhang et al., 2016; Chen et al., 2019; Yin et al., 2022)
		- Aumento de la supervivencia y proliferación de células epiteliales intestinales, reducción de TNF- α , IL-6 e IL-1 β y aumento de las IL-10 e IL-22 en modelos de ratones con colitis	
		- Incremento de la expresión de HO-1, IL-10 y la translocación nuclear de Nrf-2 en células RAW264.7	
		- Contrarresta la inflamación inducida por LPS al reducir la expresión de NF- κ B, IL-6, IL-8 y TNF- α en células intestinales Caco-2	
Antiesquistosómico	- Reduce las complicaciones de la esquistosomiasis crónica mejorando el estrés oxidativo creado y con un efecto hepatoprotector	(Abd El Wahab et al., 2021)	
Modulación de la microbiota	- Reducción de los mecanismos patogénicos de <i>Porphyromonas gingivalis</i> tras su interacción	(Teng et al., 2018;	
	- Regulación de la composición de la microbiota intestinal mejorando la función de barrera intestinal para aliviar la colitis	Sundaram et al., 2019;)	

Tabla 8. Continuación.

Verdura	Efecto	Mecanismo	Referencia
Ajo	Antiinflamatorio	- Disminución de los factores proinflamatorios (IFN- γ , IL-6) en células hepáticas (HepG2) tratadas con LPS	(Song et al., 2020)
	Anticancerígeno	- Muerte celular apoptótica las células A498 (carcinoma renal) y A549 (carcinoma pulmonar) al reducir y aumentar los niveles de expresión de BCL-2 y BAX, P53, CAS9, CAS3, respectivamente	(Özkan et al., 2021)
	Antiobesidad	- Inhibición de la inflamación cerebral mediante la regulación de la vía c-Myc mediada por c-GAS/STING, que a su vez regula la vía AHR mediada por IDO1 para revertir la resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en grasas	(Sundaram et al., 2022)
Cebollino	Antiinflamatorio	- Alivio de la inflamación mediada por el inflamasoma NLRP3 en lesiones hepáticas inducidas y en ratones con obesidad, suprimen la activación de dicho inflamasoma en ratones con obesidad	(Liu et al., 2021)
Cúrcuma	Antiinflamatorio	- Regulación de la expresión de TNF- α , IL-6 e IL-1 β , y HO-1 en macrófagos RAW264.7 tratados con LPS y en ratones con colitis inducida	(Gao et al., 2022; Liu et al., 2022)
		- Fomento de la conversión de macrófagos M1 (pro-inflamatorios) a M2 (antiinflamatorios)	
	Modulación de la microbiota	- Restauración de la barrera intestinal comprometida	
		- Aumento de <i>Akkermansia</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Clostridia_UCG-014</i> y <i>Bifidobacterium</i> ; y disminución de <i>bacteroide</i> , <i>Escherichia-Shigella</i> , <i>Helicobacter</i> y <i>Staphylococcus</i>	(Gao et al., 2022)

Tabla 8. Continuación.

Verdura	Efecto	Mecanismo	Referencia
Tomatillo dorado	Antiinflamatorio	- Disminución de la producción de NO en macrófagos RAW264.7 tratados con LPS	(Vanessa et al., 2024)
		- Promueve la polarización de macrófagos M2	
Salvia	Anticancerígeno	- Apoptosis celular en las células MIA, PaCa-2 y MCF-7 mediante la activación de procaspasa-3 y la escisión de la poli (ADP-ribosa) polimerasa-1	(Boccia et al., 2022)

Tabla 9. Efectos descritos en NVs de otros vegetales comestibles. Adaptada y actualizada a partir de la publicada por Lo et al, 2024.

Planta	Efecto	Mecanismo	Referencia
Flores y hojas de té	Antiinflamatorio	- Reducción significativa de TNF- α , IL-6 y IL-12, y aumento de IL-10 en RAW264.7 tratados con LPS	(Zu et al., 2021)
		- En ratones con colitis, moderación de la expresión de TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-10), mantenimiento de la microbiota intestinal y restauración de las barreras colónicas alteradas al modular ZO-1 y MUC2	
	Antioxidante	- Aumento de la expresión del gen HO-1 y eliminación de las especies reactivas producidas en RAW264.7 tratados con LPS	(Zu et al., 2021)
	Anticancerígeno	- Promoción de la apoptosis al aumentar las especies reactivas en células cancerosas de mamá (MCF-7, 4T1, A549 y HeLa) - Inhibición del crecimiento y la metástasis del cáncer de mama, supresión de la metástasis pulmonar y modulación de la microbiota intestinal en ratones	(Chen et al., 2022)

Tabla 9. Continuación.

Planta	Efecto	Mecanismo	Referencia
Trigo	Cicatrizante	- Proliferación y migración celular de células HaCaT, HUVEC y fibroblastos dérmicos humanos	(Şahin et al., 2019)
		- Estimulación de la angiogénesis y la expresión de colagenasa tipo I en células HUVEC	
Salvado de arroz	Pro-inflamatorio	- Aumento TNF- α en RAW264.7	(Sasaki et al., 2024)
	Anticancerígeno	- Inducción de apoptosis en células cancerosas colon26	(Sasaki et al., 2024)
Aloe Vera	Antioxidante	- Activación de los mecanismos antioxidantes a través de la modulación de los genes NRF2, HO-1, CAT y SOD en queratinocitos humanos expuestos a H ₂ O ₂	(Kim et al., 2021)
	Antiinflamatorio	- Reducción de la expresión de los genes de IL-6 e IL-1 β en macrófagos RAW264.7 tratados con LPS	(Kim & Park, 2022)
	Cicatrizante	- Promoción de la migración en queratinocitos y fibroblastos - Estimulación de angiogénesis en células endoteliales de la vena umbilical humana	(Kim et al., 2021; Kim & Park, 2022)
Petasita	Inmunomodulación	- Maduración de las células dendríticas mediante un aumento en la expresión de CD80, CD86, MHC-I y MHC-II, producción de citocinas polarizadoras Th1 (TNF- α e IL-12p70) y capacidad de presentación de antígenos - Activación y fosforilación de las vías de señalización MAPK y NF- κ β - Proliferación y diferenciación de células T naïve hacia células T tipo Th1 y células T citotóxicas CD8+ junto con una secreción de IFN- γ e IL-2	(Han et al., 2021)

Tabla 9. Continuación.

Planta	Efecto	Mecanismo	Referencia
Ginseng	Cicatrización	- Mejora de la proliferación de las líneas celulares de la piel HaCaT, Huvec y BJ aumentando la secreción de MMP-1, fibronectina-1, elastina-1 y COL1A1 y a través de la regulación de las vías ERK y AKT/mTOR	(Yang et al., 2023)
	Antiinflamatorio	- Reducción de la expresión de NF- κ B , COX-2 e iNOS en un modelo murino de herida cutánea	(Kim, Zhang, et al., 2023; Yang et al., 2023)
		- Disminución significativa de IL-6 y TNF- α , y aumento de IL-10 en RAW264.7 tratadas con LPS	
	Anticancerígeno	- Inhibición de TNF- α , IL-17A e IL-6, mientras que el ligando de muerte programada 1 (PD-L1) e IL-10 fueron regulados al alza en ratones con colitis	(Cao et al., 2019; Yang et al., 2022; Kim et al., 2023; Lv et al., 2023;)
		- Regularización de la señalización mediada por TLR-4 y MyD88, lo que provoca la polarización de macrófagos M2 a M1, el aumento de macrófagos M1 en el tejido tumoral y la producción de ROS, incrementando la apoptosis de células de melanoma en ratones	
		- Inhibición del crecimiento del glioma mediante la proliferación de macrófagos M1 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	
	Modulación de la microbiota	- Inhibición del crecimiento, capacidades migratorias, de infiltración y de formación de clones de las células derivadas de cáncer de pulmón A549 y H1299	
	- Polarización de macrófagos M2 a M1 con activación de células T e inhibición del crecimiento del cáncer colorrectal en ratones		
	- Aumento de <i>Lactobacillus</i> y <i>Alistipes</i> y disminución de <i>Helicobacter</i> y <i>Odoribacter</i> en ratones con colitis	(Kim, et al., 2023)	
Antienvejecimiento	- Mejora de los fenotipos asociados con la pigmentación de fibroblastos y melanocitos humanos tratados con radiación UB al regular a la baja moléculas asociadas a la senescencia y proteínas relacionadas con la melanogénesis	(Cho et al., 2021)	

Tabla 9. Continuación.

Planta	Efecto	Mecanismo	Referencia
Kuzu	Antiinflamatorio	- Reducción significativa de los niveles de genes pro-inflamatorios (IL-6, IL-1 β , TNF- α , MCP-1 y CD11c) y aumento de IL-10, YM1 y CD206, lo que promovió la polarización de macrófagos M1 a M2	(Wu et al., 2022)
	Antiosteoporosis	- Diferenciación y mineralización de células madre mesenquimales óseas humanas (hBMSCs) tanto <i>in vitro</i> como en ratas osteoporóticas	(Zhan et al., 2023)
	Modulación de la microbiota	- Aumento de cepas beneficiosas como <i>Bifidobacterium</i> y menor abundancia de dañinas como <i>Clostridium</i> en el intestino del modelo de rata con osteoporosis a través de la regulación de trimetilamina-N-óxido (TMAO)	(Zhan et al., 2023)

1.5. Nanovesículas (NVs) s en zumo de granada y en subproductos

En el momento de comenzar a realizar esta tesis doctoral no se encontraron trabajos sobre NVs aisladas de zumo de granada o de algarroba.

A raíz de la publicación de los resultados de las investigaciones de nuestro equipo (Sánchez-López et al., 2022), se han publicado dos artículos de NVs en granada, ambos en 2023. En el primero de ellos, el grupo de Sreekumar (Sreekumar et al., 2023) consideraba que las NVs de zumo de granada son una posible estrategia terapéutica novedosa, barata y escalable para tratar la hiperplasia prostática benigna. En el otro estudio (López de las Hazas et al., 2023) las valoraban como *nanocarriers* de miARN funcionales que podrían utilizarse en terapias basadas en ARN.

Por otro lado, comienza a haber un interés en investigar el uso de desechos agrícolas, ya que subproductos, como cáscaras, pulpas, semillas y residuos derivados del procesado de alimentos, representan una fuente rica en biomoléculas con potencial bioactivo. La obtención de NVs a partir de estos materiales no solo permite reducir el desperdicio y promover una economía circular, sino que también abre nuevas oportunidades (Latella et al., 2024).

Ekanayake y colaboradores (Ekanayake et al., 2024) analizaron las VEs de piel de patata, las cuales fueron aisladas del apoplasto, y las compararon con las NVs del exudado de las raíces, observando similitudes entre ellas. También, se ha observado que el salvado de arroz, un subproducto de la molienda de arroz, contiene NVs con una potencial actividad anticancerígena (Sasaki et al., 2024).

También se han realizado estudios con subproductos de origen animal. En la industria láctea, se emplearon los desechos generados por alimentos

fermentados como fuente de NVs seguras ya que no mostraron citotoxicidad cuando fueron administradas a células intestinales (Lorca et al., 2022).

Por lo expuesto, esta tesis estudia el contenido de NVs en zumo de granada y sus propiedades biológicas, así como el efecto que puedan tener sobre las nanopartículas los tratamientos industriales empleados en la obtención de los zumos. Por otra parte, se investigará el contenido de NVs en los subproductos generados de la extracción de la goma garrofin, concretamente en las vainas de las algarrobas, y sus posibles propiedades funcionales. Todo esto con el valor añadido de ser dos productos con interés industrial y económico en la Comunidad Valenciana.

2. Objetivos

Esta tesis doctoral persigue tres objetivos principales con sus correspondientes tareas y objetivos específicos.

- I. Identificar y caracterizar nanovesículas aisladas del apoplasto de la vaina de algarroba y del zumo de granada (var. Mollar de Elche).**
 - a. Aislar, purificar e identificar nanovesículas en diferentes variedades de algarroba.
 - b. Aislar, purificar e identificar nanovesículas en zumo de granada.
 - c. Caracterizar las nanovesículas a través de técnicas de proteómica.
 - d. Identificar marcadores de nanovesículas de plantas.

- II. Estudiar las propiedades funcionales de las nanovesículas del apoplasto de la vaina de algarroba y del zumo de granada.**
 - a. Evaluar la citotoxicidad de las nanovesículas en diferentes líneas celulares.
 - b. Evaluar el efecto inmunomodulador de las nanovesículas en cultivos celulares de monocitos/macrófagos.
 - c. Estudiar el efecto cicatrizante de nanovesículas en cultivos celulares *in vitro*.

- III. Analizar el impacto de tratamientos industriales sobre las nanovesículas de zumo de granada.**
 - a. Aislar y caracterizar nanovesículas a partir de zumo pasteurizado o liofilizado.
 - b. Estudiar los efectos de los diferentes tratamientos en las nanovesículas.

- c. Comparar los efectos en cultivos *in vitro* de las nanovesículas aisladas de zumos tratados o de zumo natural.

3. Materiales y Metodología

Los materiales vegetales empleados en esta tesis proceden de cultivos de la Comunidad Valenciana. En el caso de la algarroba, la empresa *Pedro Pérez Martínez, S.L.U.*, ubicada en Bugarra (Valencia), suministró muestras de la variedad SDC. Tras su recolección, los frutos fueron desecados antes de extraer las semillas para su procesamiento. Una vez extraídas, las vainas (pericarpio y mesocarpio) se trocearon en fragmentos de un tamaño medio de 8 mm. Estos fragmentos de la vaina desecada constituyen el material vegetal de partida de nuestros experimentos.

Los frutos de granada empleados en esta tesis se compraron directamente a un agricultor de Elche (Alicante) perteneciente a la DOP "Granada Mollar de Elche".

Los experimentos, cuya metodología se describe a continuación, incluyen tanto las NVs de algarrobo como de granada.

3.1. Preparación de las muestras

3.1.1. Algarroba

Los fragmentos de la vaina de algarroba (100g) se embebieron durante 10 min en un matraz Kitasato con 120 mL de solución salina tamponada con fosfato PBS 1x (137 mmol/L NaCl, 1,8 mmol/L KH_2PO_4 , 10 mmol/L Na_2HPO_4 , 2,7 mmol/L KCl; pH 8). Para favorecer la imbibición de los tejidos, las muestras se sometieron a vacío (3 periodos de 15s cada uno con intervalos de reposo de 30s entre ellos). La solución salina se eliminó empleando un tamiz de acero inoxidable (1 mm de malla) y los fragmentos de algarroba embebidos se colocaron en el cuerpo de una jeringa de 10 ml. Para recoger el fluido

apoplástico (FA), la jeringa se introdujo en un tubo cónico de 50 mL y a continuación, se sometió a centrifugación a $2.000 \times g$ durante 30 min a 4°C .

3.1.2. Granada

Las granadas se lavaron superficialmente con agua destilada (x 3) y el zumo fue extraído de los arilos usando un exprimidor manual. Los residuos sólidos fueron eliminados con un tamiz de acero inoxidable (1 mm de malla). Después se añadieron inhibidores de proteasas (completeTM, sin EDTA. Roche) al zumo de granada (ZG). Para determinar el efecto de tratamientos industriales, el ZG se sometió a una pasteurización baja a 63°C durante 30 min, o a un proceso de liofilización, la cual se realizó a -60°C y a una presión de 30 Pa utilizando un liofilizador (Scient-10N, GEDILAB. S.L). Las muestras secas se molieron hasta obtener un polvo fino y se rehidrataron con agua destilada para preparar zumo de granada reconstituido.

3.2. Aislamiento de las NVs

El FA de algarroba y el ZG se sometieron al mismo proceso para la extracción de NVs. Primero se realizaron tres centrifugaciones secuenciales ($700 \times g$ durante 10 minutos, $3.000 \times g$ durante 15 minutos, y finalmente a $20.000 \times g$ durante 20 minutos), todas ellas a 4°C , para eliminar los posibles contaminantes y las NVs más grandes.

El sobrenadante final, se concentró mediante filtración por flujo tangencial utilizando un sistema manual (TFF-Easy de 20 nm de poros, HansaBioMed) o un sistema automático compuesto por una membrana VivaflowTM 50R (Sartorius) y una bomba peristáltica Masterflex® L/S (Cole-Parmer).

Los extractos finales de este proceso, reducidos hasta un volumen final de 4-5 mL, se denominan como extracto concentrado total, y se representan como

AlgET, en el caso de FA de algarroba, y como *GraET* el procedente de zumo de granada.

El aislamiento de las vesículas se realizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés). Para preparar la columna se depositaron 10 mL de Sepharose-CL2B (Sigma-Aldrich) en una jeringa de 12 mL (Sigma-Aldrich), y se procedió a su lavado con PBS filtrado (0,22 μm). Se cargó 1 mL de muestra concentrada (ET) en la columna y, utilizando PBS filtrado (0,22 μm) como tampón de elución, se recogieron un total de 20 fracciones de 0,5 mL cada una. Las fracciones enriquecidas en NVs (fracciones 610) fueron agrupadas y concentradas aún más utilizando un dispositivo de filtración centrífuga Amicon™ Ultra-4 centrifugando a 3.000 x g durante 15 min a 4 °C. El método descrito fue utilizado para el aislamiento de las NVs de algarroba (*AlgNVs*) y de zumo de granada natural sin tratamiento (*Nat-GraNVs*), pasteurizado (*Pas-GraNVs*) y liofilizado (*Lio-GraNVs*).

3.3. Caracterización de las NVs

3.3.1. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el kit de ensayo de proteínas Micro BCA (Thermo Fisher Scientific) tras el lisado de las NVs en agua Milli-Q con 0,05% de Tritón-X-100 y 0,01% de SDS. La absorbancia se midió a 595 nm en un lector de absorbancia de microplacas iMark™ (Bio-Rad) y se estableció una curva lineal estándar utilizando albúmina sérica bovina (BSA) (Thermo Fisher Scientific).

3.3.2. Análisis de Rastreo de Nanopartículas (NTA)

La distribución de tamaños y concentración de las NVs fue valorada mediante NTA utilizando el sistema NanoSight LM10 (Malvern Instrument Ltd,

Malvern, Reino Unido) con láser de 405 nm y una cámara científica de semiconductor de óxido metálico complementario (sCMOS). El análisis de los datos se realizó con el software NTA versión 3.3 (Dev Build 3.3.104) con los siguientes parámetros: nivel de cámara de 15, un umbral de detección de 5 y tres lecturas de 30 s. Las imágenes se capturaron con un control manual de la temperatura. Las muestras se diluyeron en PBS filtrado (0,22 μm) para alcanzar la concentración recomendada por el fabricante (20 – 120 partículas por fotograma) y se inyectaron en la cámara de muestras utilizando una jeringa estéril de 1 mL.

3.3.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

La morfología de las NVs se determinó utilizando un microscopio electrónico de transmisión HITACHI HT7800 (Servicio Central de Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de València) operando a 100 kV. Las muestras se prepararon de la siguiente manera: 6 μL de NVs fueron fijadas 1:1 con paraformaldehído al 2% (PFA) durante 30 min; las muestras fijadas se cargaron en rejillas EM recubiertas de Formvar-carbono durante 15 min. A continuación, las muestras se sometieron a un enjuague con PBS seguido de una post-fijación de 5 min en glutaraldehído al 1%. Por último, se lavaron con agua destilada y se sometieron a una tinción de contraste con una mezcla de acetato de uranilo (1%) y metilcelulosa (0,5%).

Las imágenes fueron registradas con una cámara digital CMOS EMSIS XAROSA. El tamaño de las NVs fue determinado utilizando el software de análisis de imágenes de Olympus.

3.3.4. Análisis proteómico

Para profundizar en el análisis de las NVs, se llevó a cabo un análisis del proteoma de todas ellas, para ello se utilizó una línea automatizada de

proteómica de bajo coste, basada en el método de preparación de muestras en fase sólida (SP3, por sus siglas en inglés). Antes del procesamiento de la muestra y para eliminar los contaminantes, se lavó con una combinación 1:1 de dos tipos diferentes de partículas magnéticas modificadas con carboxilato (Thermo Scientific Sera-Mag SpeedBeads™). Las muestras se secaron y se disolvieron en 30 μL de bicarbonato de amonio (ABC) a 50 mM, mezclándose luego con 4 μL de partículas por muestra. A continuación, se añadió acetonitrilo (ACN) para alcanzar una concentración final del 70%, y la mezcla se agitó brevemente en vórtex, se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y se colocó en una gradilla magnética, desechando el sobrenadante.

Posteriormente, las partículas se lavaron dos veces con 200 μL de etanol (70%) y una vez con 180 μL de ACN, y dejándose secar para asegurar la eliminación completa del ACN. Para la elución, las partículas se resuspendieron en 45 μL de tampón ABC (50 mM) y se digirieron con 500 ng de tripsina (Promega) a 37 °C durante toda la noche. La digestión se detuvo con 60 μL de ácido trifluoroacético (TFA) al 10%. Los sobrenadantes que contenían los péptidos, se recogieron y concentraron a 10 μL utilizando un concentrador de vacío rápido.

Las mezclas de péptidos se analizaron mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Para cada muestra ensayada, se suministraron 5 μL a una columna *trap desalted* y, a continuación, se cargaron en una columna analítica, cuya elución se realizó utilizando un gradiente lineal de 15 a 40% de ACN durante 60 minutos. Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI qQTOF (660oplus TripleTOF, ABSCIEX) mediante adquisición dependiente de datos, con barridos MS₁ de 350-1400 m/z durante 250 ms y experimentos MS₂ de 100-1500 m/z durante 25 ms en modo de alta sensibilidad.

La identificación de proteínas se llevó a cabo utilizando el motor de búsqueda *ProteinPilotv5.0* y el algoritmo Paragon para buscar en la base de datos *Uniprot_Punica granatum*, *Uniprot_Fabaceae* y *NCBI_Ceratoniasiliqua*. Para la proteómica cuantitativa sin marcadores (*label-free*), los datos de los péptidos fueron procesados en *Marker View 1.3* (Sciex). Inicialmente, las áreas fueron normalizadas mediante la suma total de áreas, y posteriormente se realizaron análisis de componentes principales (PCA), análisis discriminante (DA) y pruebas *t* de Student. Las identificaciones que permanecieron sin caracterizar se buscaron adicionalmente en las bases de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando la herramienta de alineación básica local (*BlastP*). Se construyeron redes de interacción proteína-proteína para las proteínas identificadas utilizando la base de datos STRING, con parámetros predeterminados y empleando un nivel de confianza "alto" (0.150) (Szklarczyk et al., 2023). El análisis de *Gene Ontology* (GO) se realizó utilizando el sistema *Panther-GO* (versión en línea 19.0, <http://www.pantherdb.org/>).

El análisis de proteínas se realizó en las instalaciones de proteómica de SCSIE-Universitat de València.

3.4. Identificación de marcadores de VEs de plantas

3.4.1. Inmunomarcaje con oro

El inmunomarcaje con oro permite la identificación de marcadores de vesículas mediante MET, donde son visualizadas las partículas de oro conjugadas a anticuerpo.

Las muestras que contenían NVs se fijaron en paraformaldehído (2%) en PBS durante 30 min, y se utilizaron rejillas de níquel recubiertas de carbono. Las

rejillas con las NVs se lavaron en PBS y se bloquearon con una solución de PBS/0.1M glicina/0.3% BSA durante 10 min. Luego, las rejillas se incubaron durante 1 h con anticuerpos anti-*Arabidopsis thaliana* TET8 (PhytoAB, PHY1490A) (dilución 1:50). Después de realizar un lavado de 20 min con solución de bloqueo, las rejillas se expusieron a anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo (Abcam) conjugados con partículas de oro de 12 nm (dilución 1:20) durante 1h. Como control se utilizaron muestras incubadas únicamente con los anticuerpos secundarios. Las rejillas se lavaron en una solución de PBS/0,1M glicina, se tiñeron negativamente y se observaron utilizando el microscopio electrónico de transmisión Hitachi HT7800, tal como se especifica en la sección 3.3.3.

El proceso de inmunomarcaje de las NVs se realizó en el Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia.

3.4.2. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

El ensayo ELISA se ha empezado a utilizar en el campo de las VEs con el objetivo de detectarlas a través de marcadores específicos.

En el presente trabajo se utilizaron placas de 96 pocillos específicos para inmunoensayos (Microtiter™; Thermo Fisher Scientific), las cuales fueron tapizadas, durante toda la noche a 4°C con 5 µg de muestra de NVs en tampón de carbonato 50 mM (pH 9,6). Las placas recubiertas se lavaron tres veces con PBS que contenía 0,05% de Tween20 (PBS-T, BioRad) y los sitios no recubiertos se bloquearon con 5% BSA en PBST durante 1 h a 37 °C. Las muestras se incubaron durante 90 min a 37 °C con anticuerpos anti-*Arabidopsis thaliana* TET8 (PhytoAB, PHY1490A) (dilución 1:50). Las placas se lavaron tres veces con PBS-T y se incubaron con 100 µL de conjugado de peroxidasa de rábano anti-conejo de cabra. Las segundas incubaciones se

realizaron durante 1 h a 37 °C, seguidas de tres lavados con PBS-T. Posteriormente, las placas se incubaron en oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente, con 50 µL de solución de sustrato (0,012% peróxido de hidrógeno, 0,4 mg/ml orto-fenilendiamina) (Sigma) en un buffer fosfato-citrato 0,05 M, pH 5. La reacción se detuvo añadiendo 50 µL de HCl (3M). La absorbancia se midió a 490 nm utilizando el lector de absorbancia de microplacas iMark™ (Bio-Rad).

3.5. Cultivos celulares

3.5.1. Condiciones de las diferentes líneas celulares

La línea celular humana THP-1-XBlue™-CD14 (InvivoGen) se cultivó en medio RPMI 1640 con L-glutamina (Gibco). Las líneas celulares de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT), hepatoma humano (HepG2) y de epitelio de colon humano (Caco-2) se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con alto contenido en glucosa y L-glutamina (Gibco). El medio de cultivo se suplementó con estreptomicina (100 µg/mL), penicilina (100 U/mL) (ambos de Sigma-Aldrich) y suero fetal bovino al 10% (SFB) (Gibco). Las células se mantuvieron en frascos de 75 cm² en una atmósfera con un 5% CO₂ y un 100% humedad a 37 °C.

Las células THP-1-XBlue™-CD14 fueron diferenciadas a macrófagos por estimulación durante 72 h con 100 ng/mL de PMA (por sus siglas en inglés *phorbol 12-myristate 13-acetate*; Sigma-Aldrich) . Tras la diferenciación, el medio de cultivo se reemplazó con medio fresco y las células fueron incubadas otras 72 h antes de la aplicación del tratamiento.

3.5.2. Estudios *in vitro* sobre la actividad de las NVs

Ensayo MTT o viabilidad celular.

El ensayo colorimétrico de bromuro de 3(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) se utiliza como herramienta para medir la viabilidad celular y/o la citotoxicidad de un tratamiento. En esta tesis se empleó para evaluar la citotoxicidad de NVs de algarroba y de zumo de granada en diferentes líneas celulares.

Para ello, las células Caco-2, HepG2, HaCaT y THP-1-XBlue™- CD14 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 3×10^5 células por mL, y se incubaron a 37 °C. Las células se expusieron durante 24h y 48h a una dosis creciente (5, 10 y 20 µg/mL; calculado mediante el kit de ensayo de proteínas Micro BCA) de: a) NVs, b) la fracción proteica (F20) derivada de la SEC, o c) extracto total (ET). Como controles se utilizaron 20µl de PBS (positivo) o de DMSO (20%, dimetilsulfóxido) como control negativo.

Tras la primera incubación, las células se refrescaron en un medio sin SFB, se les añadieron 10 µL MTT y se mantuvieron en una nueva incubación durante 4 h. A continuación se añadieron 180 µL DMSO antes de proceder a las mediciones espectrofotométricas a 570 nm (señal) y 695 nm (fondo), en un lector de absorbancia de microplacas iMark™ (Bio-Rad). Los valores finales se obtuvieron restando a los valores de absorbancia de la señal la absorbancia de fondo.

Los resultados se muestran como porcentaje de ΔA en relación con las células control no tratadas (100% de MTT transformado o viabilidad).

Ensayo QUANTI-Blue™.

La línea celular THP-1-XBlue™-CD14 se obtuvo a partir de la línea monocítica THP-1 mediante la transfección de un constructo genético que codifica el gen de la fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP). Este gen está controlado por un promotor que se activa por los factores de transcripción NF- κ B y AP1. Para medir la expresión de NF- κ B, se utilizó el reactivo colorimétrico Quanti-blue™ (InvivoGen), el cual permite monitorear la producción de SEAP según las indicaciones del fabricante.

Los monocitos THP-1-XBlue™-CD14 fueron diferenciados a macrófagos usando PMA como se describe en la sección 3.5.1. Los macrófagos fueron tratados con PBS, *AlgNVs* o *GraNVs* (a concentraciones de 2.5, 5, 10 y 20 μ g/mL) o con 300 ng/mL de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* K12 (InvivoGen) como control positivo proinflamatorio. De manera paralela, para valorar los efectos potencialmente antiinflamatorios de estos tratamientos, los macrófagos fueron preestimulados con 300 ng/mL de LPS 1h antes de aplicar el tratamiento, en un medio de cultivo sin SFB. Tras 24 h de incubación a 37°C, 5% CO₂ y 100% humedad, se recogieron 20 μ L del sobrenadante del cultivo celular y se mezcló con 180 μ L del reactivo Quanti-blue™ durante 5 h a 37 °C. La densidad óptica a 655 nm se midió con un lector de absorbancia de microplacas iMark™ (Bio-Rad).

En el tratamiento con Nat-*GraNVs* se determinó la producción de TNF- α utilizando 80 μ L de sobrenadante de cultivo, mediante el kit ELISA humano de TNF- α (Thermo Fisher Scientific). La absorbancia desarrollada en la placa se midió a 450 nm en un lector de absorbancia de microplacas iMark™ (Bio-Rad).

Ensayo de cicatrización.

La cicatrización es un proceso crucial que, de manera positiva, permite la reparación de tejidos tras una herida o cirugía, pero, de manera negativa, puede llevar a infecciones persistentes, aumentando el riesgo de complicaciones graves. Por ello se quiso valorar el poder de cicatrización de las *AlgNVs* y *GraNVs* en queratinocitos (HaCaT) y células intestinales (Caco-2) respectivamente.

Las células se sembraron en una placa de 24 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/mL bajo las condiciones descritas en la sección 3.5.1. Las células confluentes se rascaron con una punta de pipeta de 500 μ L, tras haber retirado el medio, para estimular la herida. A continuación, se lavaron con PBS y se incubaron con medio fresco suplementado con 10% SFB.

Las células fueron tratadas con PBS, 5 μ g/mL *Nat-GraNVs*, *Lio-GraNVs* o *Pas-GraNVs*, 20 μ g/mL de *AlgNVs*, 10 μ M dexametasona (Sigma-Aldrich) como control negativo de cierre de la herida o 10 μ M de oleuropeína como control de cierre de la herida. Además, para comparar con el potencial efecto de las NVs, las células Caco-2 se trataron con 5 μ g/mL de *GraET* o 5 μ g/mL de la fracción proteica F20 de la SEC de granada, y las células HaCaT con 32 μ M D-pinitol.

El cierre de la herida (confluencia) se fotografió a 40 aumentos con un microscopio invertido Eclipse TE2000-S (Nikon) acoplado a una cámara Nikon F-601. Los resultados se evaluaron entre 0 y 12 días. Utilizando el software ImageJ, se calculó el área de tasa de migración con la siguiente fórmula:

$$\text{Área de migración \%} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100\%.$$

A_0 representa el área inicial de la herida en el día 0, A_t es el área restante de la herida al día siguiente.

Actividad antioxidante.

Para evaluar la actividad oxidante las células THP-1-XBlue™-CD14, Caco-2 y HepG2 se sembraron en placas de 96 a una densidad de 3×10^5 células por pocillo para evaluar el efecto protector de las *GraNVs* contra el estrés oxidativo. Las células fueron pretratadas con *GraNVs* (5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o PBS, y, después de 24 h, se indujo el estrés oxidativo mediante la adición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 ; de 25 a 1000 μM , diluido con PBS filtrado). A continuación, las células se incubaron durante 24 h a 37 °C, 5% CO_2 y 100% humedad. Finalmente, las células se lavaron con medio fresco y, para determinar la viabilidad, se realizó el ensayo MTT. Se utilizaron células no tratadas como control negativo, y las células expuestas solo al H_2O_2 se utilizaron como control positivo. La viabilidad celular se expresó como un porcentaje relativo a las células no tratadas.

3.5.3. Marcaje de *GraNVs* y tratamiento con proteinasa K

La eficiencia y tasa de internalización de las NVs de los diferentes zumos de granada fueron evaluadas por microscopía confocal y citometría de flujo, siguiendo protocolos ya establecidos por nuestro grupo (Sánchez-López et al., 2024).

Como control interno de etiquetado y captación se utilizaron liposomas sintéticos, que fueron proporcionados por el Dr. Antonio José Guillot y la Dra. Ana Melero de la Universitat de València (Guillot et al., 2021). Antes del marcaje, y con el fin de eliminar otros contaminantes, los liposomas se pasaron por SEC. Se empleó el NTA para determinar la concentración de partículas de las muestras de *GraNVs* y liposomas. Se cuantificaron 3×10^{11} partículas/mL, y se incubaron con el colorante FM4-64 (Thermo Fisher Scientific) a una concentración final de 2,5 μM durante 45 min a 37 °C. Para

eliminar el exceso de FM4-64, las *GraNVs* y liposomas se volvieron a aislar mediante SEC utilizando columnas de 1 mL de sefarosa CL-2B (Sigma-Aldrich) apilada. Las fracciones enriquecidas en NVs se agruparon y concentraron usando un Amicon® Ultra-4 (10000 MW) centrifugando a $3.200 \times g$, 15 min a 4 °C para eliminar cualquier resto de colorante.

Por otro lado, varias preparaciones de *GraNVs* fueron tratadas con Proteinasa K (PK) (Invitrogen) antes de la marcación con FM4-64. Para ello, las *GraNVs* se diluyeron a una concentración de 6×10^{11} partículas en PBS filtrado y se incubaron con 10 µg/mL de PK durante 1 hora a 37 °C con agitación suave. Después del tratamiento, la PK se eliminó mediante SEC utilizando una columna de 1 mL. Posteriormente, se realizó un NTA tras el re-aislamiento por SEC para cuantificar la concentración de partículas antes del marcaje con FM4-64, asegurando la coherencia con las condiciones de marcación previas.

3.5.4. Evaluación de la internalización de *GraNVs* por macrófagos humanos

Las células THP-1 fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo y diferenciadas a macrófagos como se ha mencionado en la sección 3.5.1. Las células, en un medio libre de SFB, fueron incubadas con PBS, liposomas marcados con FM4-64 o *GraNVs* marcadas, también, con FM4-64, a una concentración de 5.000 partículas por célula. La incubación se llevó a cabo durante 1, 2, o 4 horas a 4°C o 37°C. Una vez finalizada la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar alguna partícula lipídica que no hubiera sido internalizada. La fluorescencia correspondiente a FM4-64 se midió utilizando un citómetro de flujo BD LSR-Fortessa™ (BD Biosciences). Las células se clasificaron en función de la

dispersión lateral (SSC-A) frente al área de dispersión frontal (FSC-A), y las células agrupadas y los residuos se excluyeron mediante la altura de dispersión frontal (FSC-H) frente a FSC-A. Las células positivas para la captación de *Gr*ANVs se clasificaron en función de sus niveles de intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) en relación con los controles no tratados. Los datos de citometría de flujo se analizaron con el software FlowJo™ (versión v10, BD Biosciences).

Para la microscopía confocal láser, las células se tiñeron con el colorante CellTracker™ Violet BMCQ (Thermo Fisher Scientific) a una concentración final de 1 μ M y se incubaron durante 30 min a 37°C. La visualización de las células se hizo con el microscopio confocal Olympus FV1000 y las imágenes se analizaron con el programa Olympus FV10-ASW 4.2 (Olympus Corporation). La excitación óptica se realizó con rayos láser de argón de 405, 488 y 559 nm para los canales 1, 2 y 3, respectivamente. Las células, *Gr*ANVs y liposomas sin marcar, sirvieron como controles internos. Las muestras de controles sin marcar fueron incluidas en ambos experimentos, de fluorescencia y microscopía confocal, para confirmar especificidad.

3.5.5. Análisis estadístico de los datos

Los datos son presentados como media \pm desviación estándar (SD, por sus siglas en inglés) o, en algunos casos, media \pm error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés). La significancia estadística se evaluó utilizando un ANOVA de una vía. Para los parámetros que no seguían una distribución normal, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$. Todos los análisis y las representaciones gráficas fueron generadas usando GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, USA).

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización y bioactividad de NVs aisladas de zumo de granada

Estos resultados fueron publicados en la revista *Food and Function* en octubre de 2022 (Ver Anexo 1).

4.1.1. El zumo de granada contiene NVs con características y proteómica típicas de VEs

El aislamiento de las Nat-*Gra*NVs se realizó mediante filtración tangencial (TFF) y cromatografía por exclusión de tamaño (SEC). Previamente al aislamiento fueron eliminados fibras y otros posibles contaminantes de gran peso molecular mediante centrifugaciones.

El análisis por rastreo de nanopartículas (NTA) determinó el tamaño y distribución de las Nat-*Gra*NVs, mientras que la visualización al microscopio electrónico de transmisión (MET) confirmó la presencia de estas y sus características morfológicas (Figura 14). En el gráfico del NTA se observan varios picos indicando grupos de partículas que compartían tamaños similares con una moda de $148,7 \pm 9,2$ nm, y una concentración de $7,2 \pm 0,3 \times 10^{10}$ partículas/mL de zumo. La relación del número de partículas por μg de proteína se determinó como cuantificación de la pureza de las preparaciones de Nat-*Gra*NVs (Figura 14A). La media de 5 extracciones medidas fue de $4,72 \pm 0,71 \times 10^9$ partículas/ μg de proteína siendo superior a los criterios expuestos por Webber y Clayton (2013) (2×10^9 partículas/ μg de proteína) e indicando, por lo tanto, unas muestras de NVs puras.

La concentración de partículas es variable dependiendo del método de aislamiento y purificación. En el reciente trabajo de López de las Hazas et al. (2023), se aislaron NVs de granada por UC y UC+SEC obteniendo en ambos casos unas concentraciones ($8,9 \times 10^{11} \pm 4,56 \times 10^{10}$ y $1,25 \times 10^{11} \pm 4,28 \times 10^{10}$ partículas/mL, respectivamente) superiores a las que nosotros obtuvimos en nuestra investigación con este fruto. Sin embargo, en el estudio de Sreekumar et al. (2023), la concentración de NVs aisladas a partir de granadas por UC combinada con ultrafiltración, fue bastante menor ($1,6 \times 10^9$ partículas/mL).

Es importante destacar que la densidad de NVs aisladas también depende, en gran medida, del material vegetal estudiado. Por ejemplo, Yang y colaboradores (Yang et al., 2020) mostraron una concentración de $1,2 \times 10^8$ partículas/mL aisladas de zumo de limón utilizando una técnica de electroforesis combinada con diálisis. Sin embargo, con técnicas de UC y dUC se han logrado elevadas concentraciones tanto en zumo de manzana (1×10^{12} partículas por mL) (Fujita et al., 2018) como en pomelo ($5,7 \times 10^{13}$ partículas por mL) (Garaeva et al., 2021).

El análisis por MET de las fracciones 6-10 obtenidas por SEC, permitió corroborar que dichas fracciones estaban enriquecidas en NVs de formas esféricas. Sus medidas con *ImageJ* establecieron un rango de tamaño de 20 – 400 nm (media de 122,6 nm) (Figura 14B).

Estos resultados concuerdan con estudios previos y confirman que los zumos de frutas son un buen material de partida para aislar NVs (Mu et al., 2014; Pérez-Bermúdez et al., 2017).

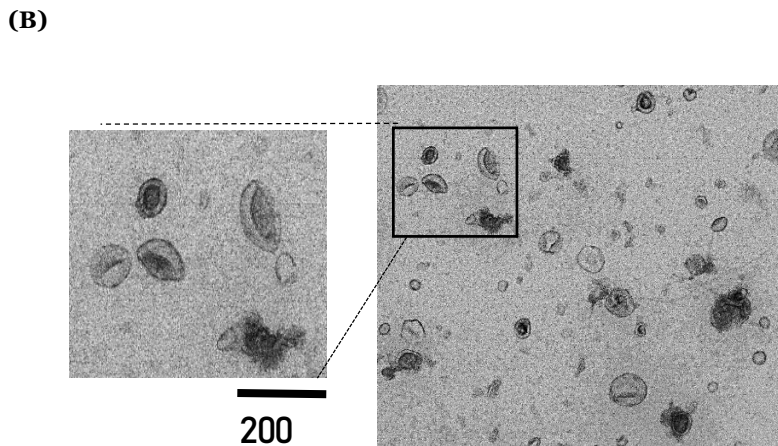
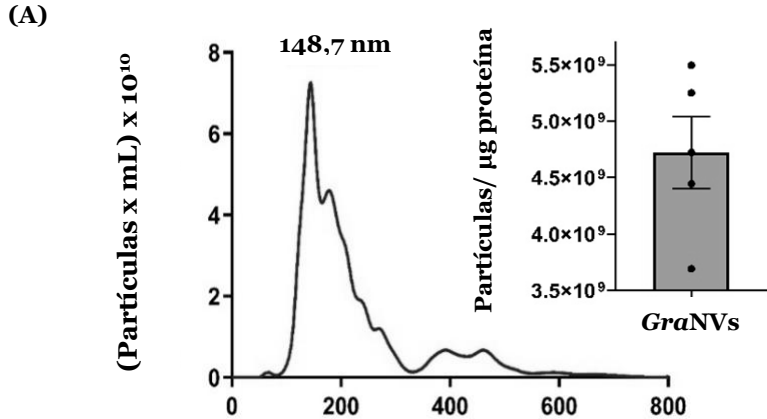


Figura 14. Aislamiento y caracterización de Nat-GraNVs. (A) Análisis de la distribución de tamaño de Nat-Gra NVs por NTA. El ratio número de partículas/µg de proteínas es indicativo del enriquecimiento de cada aislamiento de NVs por SEC. (B) Imágenes del MET.

Una vez optimizado el proceso de aislamiento de las Nat-*Gra*NVs, se estudiaron las proteínas mediante la técnica de cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). El análisis se llevó a cabo mediante el mapeo de los datos de *Punica granatum* desde la base de datos UniProt/SwissProt, que es la base de datos de secuencias proteicas más ampliamente utilizada. De esta manera, se obtuvo una lista de 628 proteínas con la mayoría de ellas exhibiendo un conteo de péptidos único inferior a 7. La lista de proteínas se redujo a 145 ya que solo se consideraron aquellas cuyos valores tenían una probabilidad mayor al 95,0% y contenían al menos 2 péptidos. Las que permanecieron como “proteínas no caracterizadas” fueron sometidas a una búsqueda en la herramienta NCBI BlastP. La lista final consta de 131 proteínas, recogidas en la tabla suplementaria S1 (ver Anexo 2).

Las veinte proteínas con al menos 7 péptidos identificados, parecen tener funciones múltiples, tales como su participación en el metabolismo celular o, su capacidad de defensa contra diversos tipos de estrés entre otras actividades. Además, se identificaron proteínas comúnmente relacionadas con VEs, entre ellas Sintaxinas, proteínas Heat Shock, Rab y Vsp, algunas proteínas propuestas como posibles marcadores de VEs vegetales (Patelinas, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y Tetraspanina 8 (TET8), así como otras directamente involucradas en la biogénesis y transporte de vesículas (Tabla 10).

El zumo de granada ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades antioxidantes y su actividad biológica (Capriotti et al., 2013; Fahmy et al., 2020) y pudimos comprobar que las Nat-*Gra*NVs contienen proteínas relacionadas con dichos efectos, ya que los datos GO (*Gene Ontology*) mostraron enzimas clave en procesos antioxidantes (superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa L-ascorbato, glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión S-transferasa DHAR2 (GST)), junto a proteínas involucradas en procesos de

señalización y con potenciales propiedades funcionales, tales como Calmodulina, Tiorredoxina y Fosfolipasa D.

Para obtener una visión global del contenido proteico de las Nat-*GraNVs* se clasificaron en dos categorías utilizando el sistema PANTHER-GO: la función molecular y el proceso biológico (Figura 15). Entre los términos más abundantes dentro de la función molecular se encontraron: “*binding*”, seguido de “*hydrolase activity*”, “*transferase activity*”, “*oxidoreductase activity*”, “*other catalytic activity*”, “*transmembrane transporter activity*”, “*antioxidant activity*”, “*enzyme regulator activity*” y “*transcription elongation activity*”. Para el proceso biológico los términos más abundantes fueron: “*metabolic process*”, “*localization*”, “*response to stress*”, “*vesicle-mediated transport*”, “*regulation of the biological process*”, “*transmembrane transport*”, “*signal transduction*”, “*vacuolar transport*”, “*protein folding*”, “*response to other organisms*” e “*interspecies interaction between organisms*”.

Tabla 10. Lista de proteínas involucradas en la biogénesis y el tráfico de VEs identificadas en *Nat-GrNVs*.

Accession number	Péptidos (95%)	Nombre	NCBI BlastP	Proceso biológico	Función molecular
AoA2IoJPV2	8	Uncharacterized protein	Patellin-1	Regulation of the biological process	Binding
AoA2IoL9U8	6	Syntaxin-52-like	-	Localization	-
AoA2IoKLK6		BRO1 domain-containing protein	Vacuolar-sorting protein BRO1	-	-
AoA2IoKRU1	5	Ras-related protein Rab7-like	-	-	GTPase activity; binding
AoA2IoISS2		Vesicle-associated membrane protein 714	-	Localization; vesicle-mediated transport	-
AoA2IoL2Po	4	Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor		Localization; signal transduction	Rab GDP-dissociation inhibitor activity
AoA2IoJD79		t-SNARE coiled-coil homology domain-containing protein	Syntaxin-22-like	Localization; vesicle-mediated transport	-
AoA218VVR2		Tobamovirus multiplication protein 2A-like	-	-	-
AoA2IoLEM9		Uncharacterized protein	Ras-related protein RABB1b isoform X1	-	GTPase activity; binding

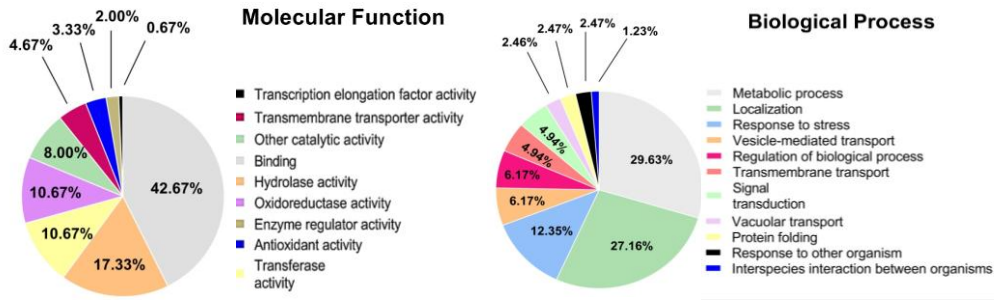
Tabla 10. Continuación.

Accession number	Péptidos (95%)	Nombre	NCBI BlastP	Proceso biológico	Función molecular
AoA2IoL7K4	4	ADP-ribosylation factor (ARF)	-	-	GTPase activity; binding
AoA2IoL1W9	3	Uncharacterized protein	Ras-related protein Rab-8A	-	GTPase activity; binding
AoA2IoKSK1		Uncharacterized protein	Ras-related protein Rab-2A like	-	GTPase activity; binding
AoA2IoKPL9		Vacuolar protein sorting-associated protein 32-like protein 2	Vacuolar protein sorting-associated protein 32-like protein 2	Localization; vacuolar transport	-
AoA2IoK404		Patellin-3	Patellin-3	Regulation of biological process	Binding
AoA2IoIF97		-	-	-	GTPase activity; binding
AoA2IoHK32		Extensin	Extensin	-	-
AoA2IoKS56		ADP-ribosylation factor-like protein 8a	ADP-ribosylation factor-like protein 8a	Localization	GTPase activity; binding
AoA2IoK3T5		-	-	-	GTPase activity; binding
AoA2IoI6Y3		-	-	-	GTPase activity; binding

Tabla 10. Continuación.

Accession number	Péptidos (95%)	Nombre	NCBI BlastP	Proceso biológico	Función molecular
AoA2IoJMZ1		Vacuolar protein-sorting-associated protein 37 homolog 1-like	Vacuolar protein-sorting-associated protein 37 homolog 1-like	Localization	-
AoA2IoINRo		Protein FREE1 isoform X2	Protein FREE1 isoform X2	-	Binding
AoA2IoIEC7	2	-	-	-	-
AoA2IoJo81		-	-	Localization; vesicle-mediated transport; protein/ion transport	SNAP receptor activity

(A)



(B)

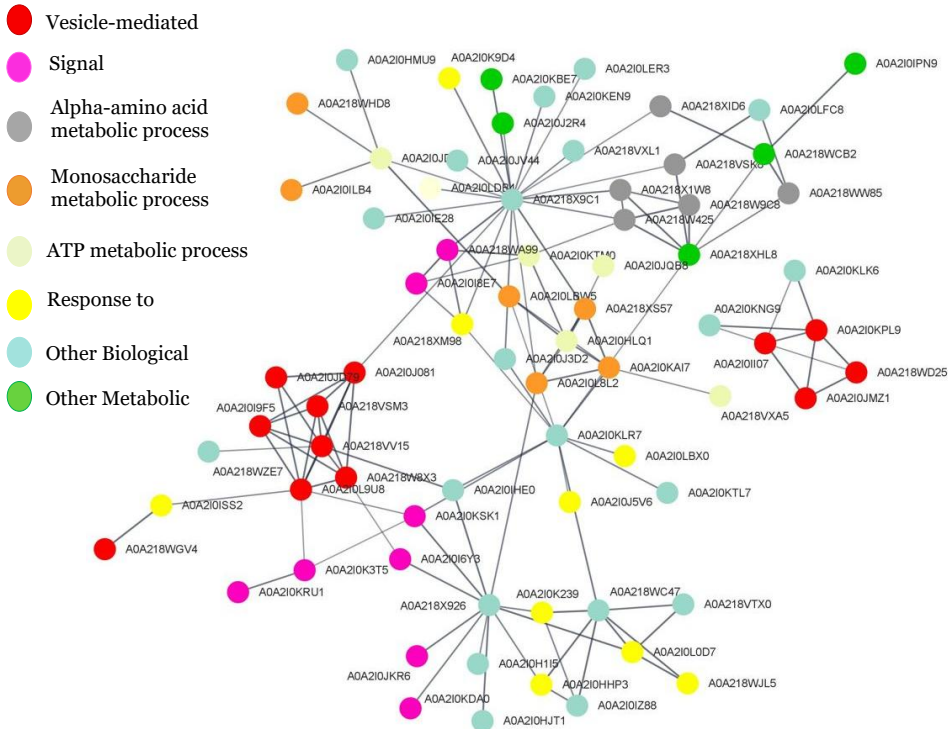


Figura 15. Caracterización proteómica de Nat-GrNVs. El contenido fue analizado mediante LC-MS/MS. (A) Los gráficos de Gene Ontology (GO) fueron clasificados según la función molecular o el proceso biológico para las proteínas de Nat-GrNVs comparadas con la base de datos Uniprot de *Punica granatum*. (B) Red de interacción proteína-proteína generada por la base de datos STRING y el software Cytoscape utilizando una “alta confianza” (0.700) como puntuación mínima de interacción requerida. Las proteínas fueron clasificadas según el término GO “proceso biológico”.

4.1.2. Las Nat-GraNVs tienen propiedades biológicas *in vitro*

Las Nat-GraNVs no son citotóxicas

A la hora de determinar la seguridad alimentaria de un nuevo alimento es necesario realizar ensayos de citotoxicidad. En este caso, se probaron las Nat-GraNVs sobre dos líneas celulares: Caco-2 y THP-1. La línea celular Caco-2 es comúnmente utilizada en estudios de nutrición para evaluar la acción de extractos de alimentos ya que reproducen las características morfológicas y funcionales de las células intestinales (Iftikhar et al., 2020). Respecto a las THP-1, se trata de la línea celular empleada habitualmente como sistema modelo *in vitro* para evaluar tanto la actividad antiinflamatoria como la seguridad de componentes naturales (Zhao et al., 2019).

Se evaluó la viabilidad celular exponiendo a las células a concentraciones crecientes de Nat-GraNVs (2,5, 5, 10 y 20 µg/mL) durante 24h y 48h. Como se muestra en la Figura 16, las NVs no mostraron citotoxicidad ni para THP1 (Figura 16A) ni para Caco-2 (Figura 16B). También se probó el ET de zumo de granada y la fracción proteica derivada de la SEC. Aunque no mostraron toxicidad, en ningún caso se vio una proliferación celular tan elevada como en los cultivos tratados con las Nat-GraNVs.

En estudios previos se ha confirmado la baja toxicidad de las NVs procedentes de plantas dado que están constituidos por componentes de origen natural (You et al., 2021). Por ejemplo, se examinó la viabilidad celular de células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo después de su tratamiento con NVs de fresas, a concentraciones crecientes (de 2 a 9 µg/mL), durante 48h y 120h, confirmando que no ejercieron ningún efecto tóxico significativo (Perut et al., 2021). Tampoco se observaron efectos negativos en células

humanas y de ratón (HaCaT, HDF y RAW264.7) al ser tratadas con NVs de repollo después de 72 h (You et al., 2021).

Por otro lado, las NVs aisladas de granada han mostrado disminuir la viabilidad de células de cáncer de próstata (BPH1) e inducir su apoptosis (Sreekumar et al., 2023).

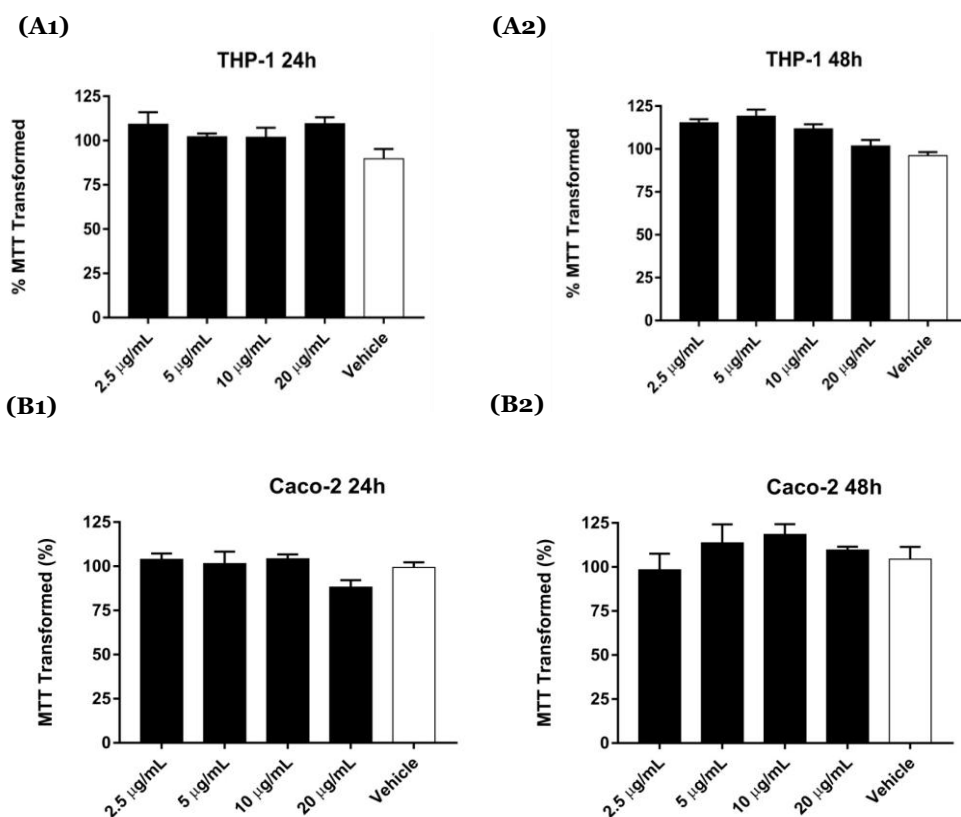


Figura 16. Evaluación de la citotoxicidad inducida por las Nat-GrNVs. La citotoxicidad de las Nat-GrNVs fue determinada por el porcentaje de MTT transformado detectado en las células THP-1 (A1, A2) y Caco-2 (B1, B2) expuestas a varias concentraciones de NVs durante 24 horas (A1, B1) o 48 horas (A2, B2). No se detectó citotoxicidad a ninguna de las concentraciones probadas en comparación con las células tratadas con PBS (vehículo). Los datos se expresan como media \pm SEM ($n=3$).

Las Nat-GraNVs muestran un efecto citoprotector frente al estrés inducido por el peróxido de hidrógeno

Se evaluó la actividad antioxidante de las Nat-GraNVs midiendo su efecto citoprotector y regenerador celular contra el estrés oxidativo. Las condiciones de oxidación se indujeron con H₂O₂ en enterocitos humanos Caco-2. Con el fin de optimizar el ensayo, se evaluó el efecto del H₂O₂ sobre la viabilidad celular (mediante la prueba del MTT) en relación con su concentración y el tiempo de estimulación. Como se evidencia en la Figura 17, los tratamientos con 100 y 200 µM de H₂O₂ durante 24 horas redujeron la viabilidad celular de forma dependiente de la concentración en un 16,3% y un 25,7%, respectivamente. Estas concentraciones de H₂O₂ fueron las empleadas para inducir el estrés oxidativo.

Las células se pretrataron (24 h) con concentraciones de 5 µg/mL y 10 µg/mL de Nat-GraNVs y tras añadir el H₂O₂, se observó que la supervivencia celular mejoraba de manera significativa con 5 µg/mL, aunque el efecto de las NVs no fue significativo a concentraciones de 10 µg/mL (Figura 17).

Nuestros resultados corroboran los de estudios anteriores. Por ejemplo, Kim y Rhee (Kim & Rhee, 2021) examinaron los efectos antioxidantes y apoptóticos de las VEs derivadas de zanahoria (Carex) en cardiomioblastos y células de neuroblastoma tratadas con H₂O₂. Concluyeron que Carex podría suprimir la generación de ROS e inhibir la apoptosis inducida por estrés oxidativo. Asimismo, se ha demostrado que las NVs derivadas de fresa y limón contienen ARN, vitamina C y polifenoles, componentes que podrían prevenir el estrés oxidativo inducido por la exposición a H₂O₂ en células humanas (Baldini et al., 2018; Perut et al., 2021).

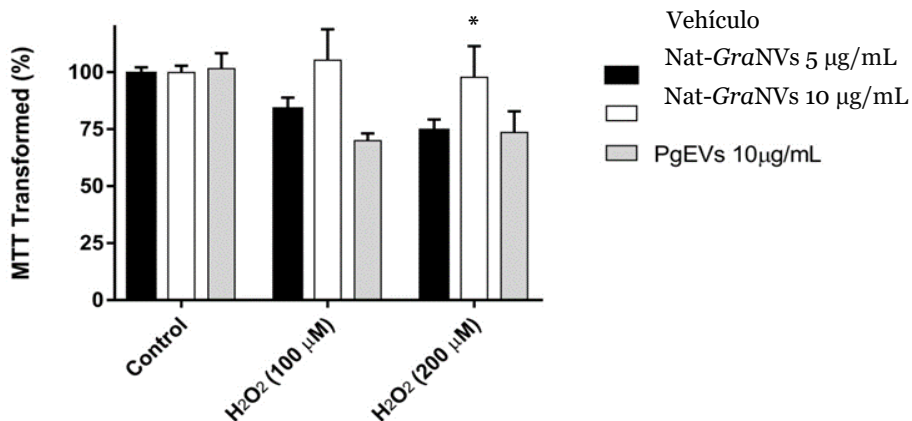


Figura 17. Efecto citoprotector de las Nat-GraNVs sobre la viabilidad de las Caco-2 a las que se les ha inducido estrés con H₂O₂. Las células fueron pretratadas durante 24 h con las Nat-GraNVs antes de añadir H₂O₂. A dosis de 5 µg/mL se ve una mejora de la viabilidad celular. Los datos están expresados como media ± SEM (n= 3-7 experimentos). Se realizó un One-way ANOVA con Graph Pad Prism7, *p< 0.05.

Las Nat-GraNVs muestran actividad antiinflamatoria en macrófagos humanos THP-1-XBlue™ CD14

La inflamación puede ser la principal causa de múltiples enfermedades como las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), obesidad, o desencadenar ambientes favorables para el desarrollo de células cancerosas (Liu et al., 2017; Sohrab et al., 2023). Es por ello que en la actualidad hay un creciente interés en el desarrollo de nanopartículas antiinflamatorias (Sohrab et al., 2023). En este sentido, diferentes estudios han demostrado que las NVs vegetales modulan las respuestas inflamatorias e inmunes (Di Gioia et al., 2020).

Para investigar el impacto de las Nat-GraNVs en la inflamación, se evaluó su efecto sobre los macrófagos humanos THP-1, involucrados en las respuestas de inmunidad innata (Chanput et al., 2014), y la expresión del factor de transcripción NF-κB, responsable de la inducción de citoquinas

proinflamatorias, quimiocinas y otros mediadores inflamatorios en diversas células inmunitarias (Liu et al., 2017).

Primero se examinó la actividad pro-inflamatoria de las NVs sin la estimulación de lipopolisacárido (LPS), revelándose que no inducían la expresión de NF- κ B *in vitro* (Figura 18A). Posteriormente las células tratadas con Nat-*Gra*NVs a 5 μ g/mL, fueron activadas con LPS. Los resultados obtenidos demostraron que las Nat-*Gra*NVs provocaron una inhibición significativa ($p < 0.001$) de la producción de NF- κ B dependiente de LPS (Figura 18 B). También se comparó la capacidad antiinflamatoria del ET de zumo verificando que las NVs ejercieron un efecto mayor a la misma concentración de proteína (Figura 18B).

A través de un ensayo ELISA se midieron los niveles de TNF- α , una citoquina proinflamatoria producida por macrófagos (Yu et al., 2020), para confirmar el efecto antiinflamatorio. Se realizaron los ensayos tanto en presencia como en ausencia de LPS. Las células fueron tratadas con PBS (control), F1 SEC (fracción 1 sin NVs) o Nat-*Gra*NVs. Los resultados indicaron que la actividad antiinflamatoria de las NVs no está directamente relacionada con la disminución en la producción de la citoquina TNF- α (Figura 18C).

Este resultado no es inesperado dado que en estudios *in vivo* realizados con zumo de granada se ha visto que los niveles de TNF- α no se ven afectados. Por ejemplo, Tapias et al. (2014) examinaron el papel del zumo de granada en el proceso inflamatorio en un modelo de roedor con enfermedad de Parkinson y concluyeron que el zumo no provocó una reducción en la expresión de TNF- α . En otro estudio clínico con zumo concentrado de granada, los pacientes con diabetes mellitus 2 (DM2) a quienes se les había suministrado el zumo de esta fruta mostraron una reducción de la IL-6 (otra citoquina pro-inflamatoria) pero no de TNF- α (Shishehbor et al., 2016).

Por lo tanto, estos hallazgos indican que las Nat-*Gr*NVs podrían resultar beneficiosas para disminuir la inflamación causada por elementos que dependen de este factor de transcripción, especialmente cuando se emplean como tratamiento en procesos en los que existe inflamación previa.

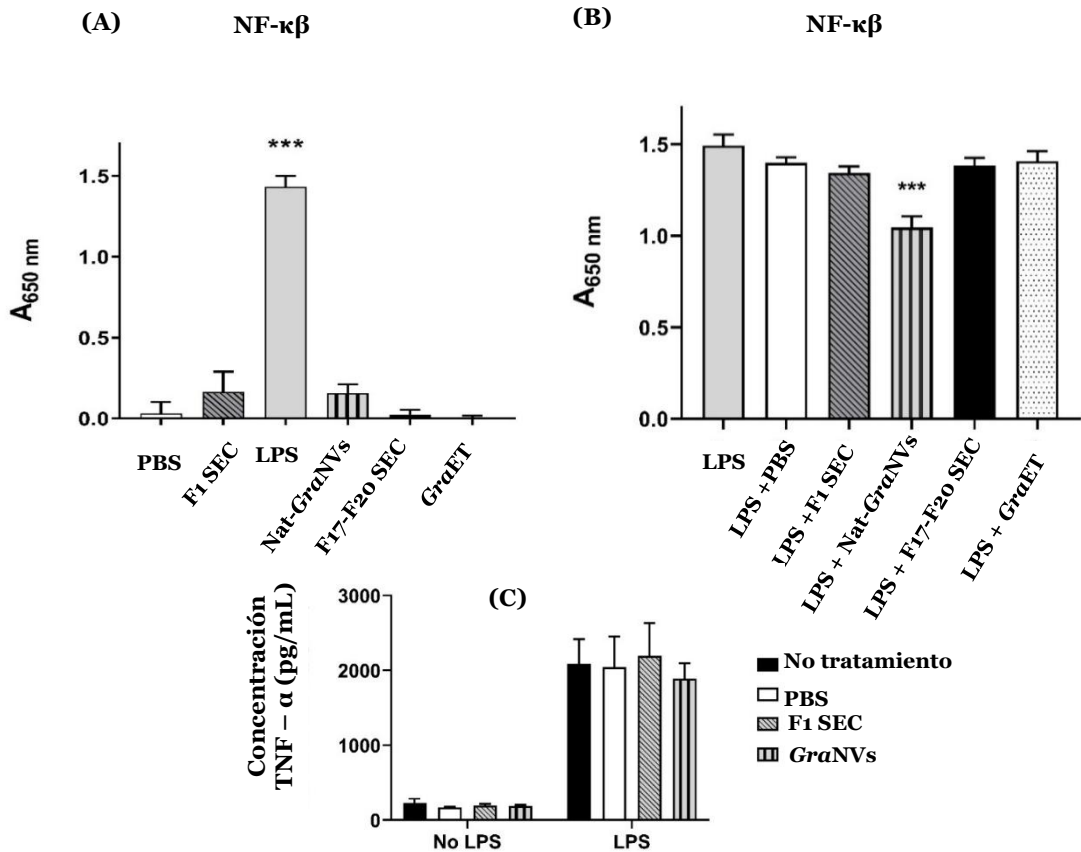


Figura 18. Las Nat-GrNVs muestran actividad antiinflamatoria en macrófagos humanos THP-1-XBlue™ CD14. Células tratadas con 5 µg/mL de Nat-GrNVs, F17-20 SEC o GraET sin estimular (A) o estimuladas con LPS durante 24 h (B). La expresión de NF-κβ fue medida en los sobrenadantes de las células usando el kit de QUANTI-Blue™. Los controles usados fueron PBS y la fracción 1 (F1) de la columna de SEC. El PBS fue utilizado como control para el análisis estadístico. Los datos se presentan como media ± SEM (n= 13). La concentración de TNF-α fue determinada utilizando 80 µL del sobrenadante de las células con el TNF alpha Human ELISA Kit (C). Los datos se presentan como media ± SEM (n= 8). Se llevó a cabo un One-way ANOVA como análisis estadístico con Graph Pad Prism7, *p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001.

Las Nat-GraNVs aceleran/facilitan la cicatrización de heridas in vitro

Las EII, como colitis ulcerosa o Enfermedad de Crohn, se caracterizan por desencadenar una respuesta inmunitaria anormal que desata una cascada de citoquinas proinflamatorias. Esta respuesta conduce a la activación de células inmunitarias, que amplifican así la inflamación causando daños en la integridad de la membrana intestinal. Entre los principales objetivos del tratamiento de las EII se encuentra la prevención de nuevas inflamaciones y la inducción de la cicatrización de las lesiones (Otte et al., 2023). Curiosamente uno de los enfoques emergentes más prometedores para la cicatrización de heridas implica las NVs de plantas. Diferentes estudios sobre las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de las NVs vegetales sugieren que también deberían mejorar la cicatrización de heridas, pero pocos han explorado específicamente el potencial cicatrizante de estas y más concretamente en células intestinales (Naruskaitė et al., 2021).

En la presente tesis se estudió el efecto de la cicatrización de las Nat-GraNVs en Caco-2. Se eligió esta línea celular por haber sido utilizada en múltiples estudios *in vitro* para investigar cómo determinadas acciones o factores mejoran la cicatrización de heridas intestinales (Boger et al., 2023). Tras 3, 6, 9 y 12 días de tratamiento, se calculó el porcentaje de cierre de las heridas (Figura 19). Los resultados demuestran que las Nat-GraNVs promovieron una mejora significativa ($p < 0.01$) en la cicatrización epitelial intestinal desde el tercer día (Figura 19A), mostrándose como una mejor alternativa que la oleuropeína. Esta mejora se mantuvo durante todos los días en los que se realizó la prueba (Figura 19 A-D), con un promedio del 89,6% de la herida cicatrizada en el día 12 (Figura 19D), evidenciando una mejora significativa en comparación con los efectos de los otros tratamientos utilizados (oleuropeína

64,5%, F1 SEC 37,3%, dexametasona 29,6%, F17-20 SEC 53,8% y *GraET* 58,5%). Notablemente el efecto cicatrizante de las *Nat-GraNVs* (89,6%) fue superior al inducido por el uso del *GraET* (58,5%).

No se han encontrado investigaciones sobre el efecto de NVs de plantas comestibles en la cicatrización de células intestinales, sin embargo, sí se ha visto en otras NVs derivadas de alimentos como la leche. Ahn et al. (2021) investigaron el potencial terapéutico de NVs de leche de vaca pasteurizada en la cicatrización de heridas, utilizando células intestinales IEC-18, observando que las NVs de leche inhibieron la migración celular y aumentaron la relación entre TGF- β 3 y TGF- β 1, lo que facilitó el proceso de cicatrización con ausencia de cicatrices.

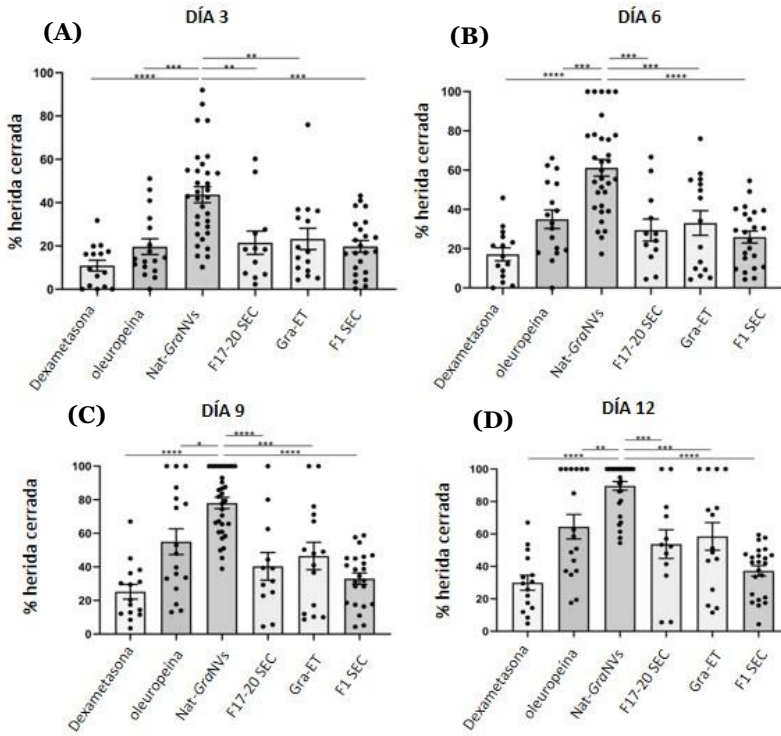


Figura 19. Las Nat-GraNVs aceleran la cicatrización en células Caco-2. Los efectos de la cicatrización fueron analizados mediante el ensayo de raspado. Cada tres días las células fueron tratadas con dexametasona, oleuropeína, Nat-GraNVs, F17-20 de la SEC, extracto de zumo o F1 de la SEC en un medio sin SFB. Las Nat-GraNVs mejoraron de manera significativa la cicatrización del epitelio intestinal desde el día 3 (A), manteniéndose en los días subsiguientes (B, C, D). Los datos se muestran como media \pm SEM ($n=11-33$ experimentos). Se realizó una One-way ANOVA con Graph Pad Prism7, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.2. Impacto de tratamientos industriales en NVs de zumo de granada

El tratamiento térmico sigue siendo el método convencional para la conservación de zumos de frutas y está ampliamente reconocido como una de las técnicas más rentables para garantizar la seguridad microbiana y prolongar la vida útil del producto (Ağçam et al., 2018). Sin embargo, este proceso puede afectar negativamente a las cualidades sensoriales y conducir a la degradación de nutrientes sensibles al calor, como las vitaminas y los compuestos bioactivos, lo que impulsa el desarrollo de técnicas de conservación no térmicas, incluida la liofilización (Sarbatly et al., 2023). Aunque estas técnicas alternativas ayudan a preservar los atributos nutricionales y sensoriales, también pueden alterar la integridad de la composición y las propiedades físicas del zumo y, por tanto, afectar la estabilidad del producto e incluso a la aceptación del consumidor (Martínez-Navarrete et al., 2019; Silvan et al., 2020; Uscanga et al., 2021).

Con estas premisas, se quiso indagar el efecto que podrían tener los tratamientos industriales ampliamente empleados, como son la pasteurización y la liofilización, sobre el zumo de granada y las nanovesículas de él obtenidas.

Estos resultados han sido enviados para su posible publicación en la revista *Food Chemistry* (Ver en el Anexo 3).

4.2.1. La pasteurización y la liofilización reducen el rendimiento y la pureza de las nanovesículas

Tras demostrar la presencia de NVs en zumo de granada natural (Nat-GraNVs), se analizó la morfología y funcionalidad de NVs aisladas del ZG

sometido a pasteurización (Pas-*GraNVs*) o liofilización (Lio-*GraNVs*). La metodología empleada para el aislamiento, una combinación de TFF seguida de SEC, fue similar a la descrita para obtener las Nat-*GraNVs*. No obstante, en este experimento se sustituyó el sistema tangencial manual por un sistema automático (Vivaflow™ 50R membrane (Sartorius)) con el fin de aumentar el rendimiento partiendo de un mayor volumen de zumo (Figura 20A). Los tres tipos de *GraNVs* fueron caracterizadas en términos de tamaño, morfología y concentración utilizando el NTA y MET.

Las medidas obtenidas mediante NTA mostraron que no hubo cambios significativos en el tamaño modal de las *GraNVs* tras los tratamientos, datos que fueron confirmados por el MET (Figura 20B). Cabe destacar que, mientras las Nat-*GraNVs* exhibieron un amplio rango de morfologías, Pas-*GraNVs* y Lio-*GraNVs* fueron predominantemente de forma redondeada (Figura 20B). Curiosamente, aunque no se encontraron diferencias significativas en la concentración proteica entre los tratamientos (Figura 20C), la concentración media de partículas en las muestras de Nat-*GraNVs* ($4,26 \pm 1,44 \times 10^{11}$ partículas/mL) fue cerca del doble de la concentración encontrada en Lio-*GraNVs* ($2,46 \pm 1,33 \times 10^{11}$ partículas/mL) y Pas-*GraNVs* ($2,89 \pm 1,14 \times 10^{11}$ partículas/mL) (Figura 20D). Además, como medida de la pureza de las *GraNVs* se analizó el ratio entre el número de partículas y la concentración proteica (Webber & Clayton, 2013). Todas las preparaciones mostraron una elevada relación partícula/ μ g de proteína, pero las Nat-*GraNVs* ($4,6 \pm 5,39 \times 10^{10}$ partículas/ μ g de proteína) presentaron una proporción significativamente mayor que las Lio-*GraNVs* ($0,7 \pm 0,87 \times 10^{10}$ partículas/ μ g de proteína) y las Pas-*GraNVs* ($0,65 \pm 0,87 \times 10^{10}$ partículas/ μ g de proteína) (Figura 20E).

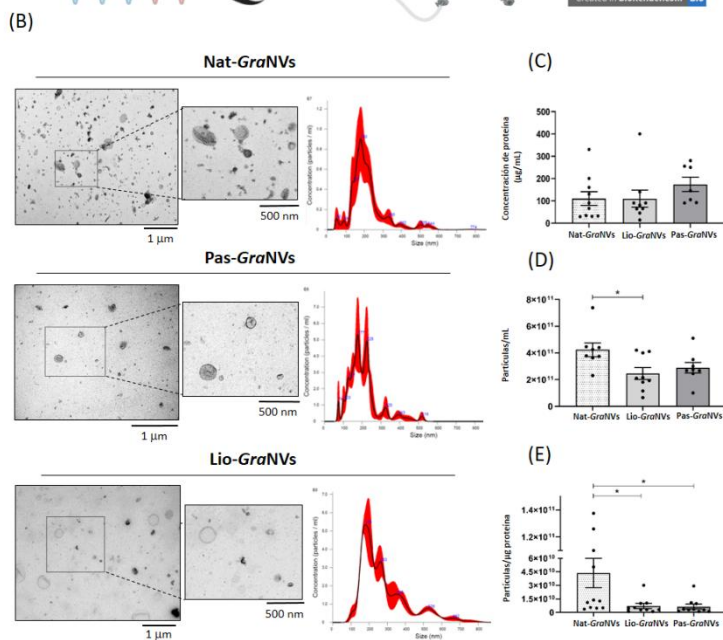
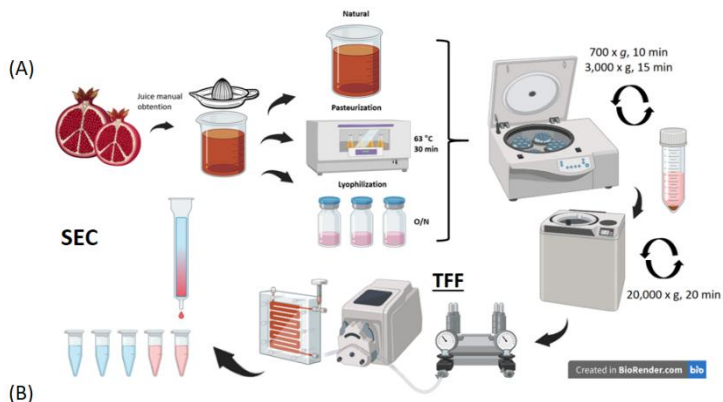


Figura 20. Caracterización de nanovesículas aisladas de zumo de granada natural, pasteurizado y liofilizado. (A) Representación del procesamiento del ZG y aislamiento de NVs por centrifugación diferencial, filtración tangencial (TFF) y cromatografía por exclusión de tamaño (SEC). (B) Imágenes obtenidas por microscopía electrónica (MET) y análisis de rastreo por partículas (NTA) de Nat-GraNVs, Pas-GraNVs y Lio-GraNVs. Las GraNVs fueron diluidas 1:200 en PBS filtrado. (C) Cuantificación de proteínas medidas con el Micro BCA Protein Assay Kit. (D) Estimación de la concentración de partículas/mL. (E) Relación entre el número total de partículas por µg de proteína.

Aunque ningún estudio ha examinado el impacto de los tratamientos industriales de los zumos de frutas sobre las NVs, se han realizado varias investigaciones sobre las VEs de la leche (Kleinjan et al., 2021; Turner et al., 2023; Colella et al., 2023). Dichas investigaciones indican que los tratamientos térmicos aplicados a la leche reducen significativamente las concentraciones de VEs (Kleinjan et al., 2021; Colella et al., 2023), y la exposición a condiciones de alta temperatura ($\geq 135^{\circ}\text{C}$ durante ≥ 1 s), puede conducir a la pérdida completa de VEs detectables (Kleinjan et al., 2021). Por otra parte, se demostró que la liofilización de la leche afecta a la concentración de VEs, reduciendo sus niveles en comparación con las VEs de muestras de leche fresca (Turner et al., 2023).

Leng y colaboradores (2023) observaron que los tratamientos térmicos LTLT (*Low-Temperature Long-Time*) y HTST (*High Temperature Short Time*), aplicados a muestras aisladas de NVs de arándano, alteraban su morfología y aumentaban su tamaño, siendo el HTST el que inducía cambios más pronunciados. Basándonos en estos hallazgos, seleccionamos el proceso de pasteurización LTLT para nuestros experimentos con ZG, ya que parecía preservar mejor la integridad de las NVs. Es posible que al aplicar el tratamiento térmico sobre el zumo, donde las NVs se encuentran dentro de su matriz nativa, son menos susceptibles a la degradación o agregación debido a los efectos protectores de las proteínas y lípidos circundantes (Gelibter et al., 2022).

Como se ha descrito anteriormente, en nuestros experimentos, las NVs aisladas de ZG sin tratar mostraron una amplia gama de morfologías, mientras que las aisladas del ZG pasteurizado o liofilizado mostraron principalmente formas cóncavas y redondas, aunque conservando un tamaño similar al observado en Nat-*Gra*NVs. Curiosamente, aunque tanto la pasteurización como la liofilización redujeron la concentración de NVs por mL

de ZG, la cantidad de proteína aumentó. Schulz et al. (2020) plantearon la hipótesis de que el tratamiento térmico podría alterar las VEs, provocando una reducción de la concentración de partículas y la liberación de proteínas encapsuladas, lo que a su vez podría aumentar la concentración de proteínas en la muestra. Sin embargo, en las VEs aisladas de leche pasteurizada, se observó que el contenido proteico era en realidad inferior en comparación con la leche no tratada (Colella et al., 2023). El factor común de estos autores fue que utilizaron la ultracentrifugación diferencial para aislar las VEs lácteas, una técnica que podría co-aislar otras proteínas solubles presentes en las muestras (Sidhom et al., 2020). Además, estas proteínas solubles externas también podrían verse afectadas por los tratamientos, alterando potencialmente los resultados. En cualquier caso, es importante resaltar que, las NVs derivadas de plantas difieren de las VEs de mamíferos en su composición, lo cual repercute en su función, biodisponibilidad y estabilidad (Wang et al., 2022; Alzahrani et al., 2023).

4.2.2. El procesamiento del zumo de granada induce cambios en el contenido proteómico de *GraNVs* afectando principalmente a las proteínas relacionadas con la membrana

Para investigar el impacto del procesamiento industrial sobre el contenido proteico de las NVs, se comparó la carga proteica de las Nat-*GraNVs* con Pas-*GraNVs* y Lio-*GraNVs* usando el método de cuantificación “*Label free*”. Las proteínas de interés fueron aquellas que alcanzaron un intervalo de confianza del 95%, una tasa de descubrimiento falso (FDR, por sus siglas en inglés) inferior al 1% y un umbral de significancia de $p < 0,05$ (Tabla 11 y Tabla suplementaria S2, ver en Anexo 4). Al comparar las muestras de Nat-*GraNVs* con Pas-*GraNVs*, se encontraron 14 proteínas en mayor abundancia y 2 en menor abundancia. En cambio, la comparación entre Nat-*GraNVs* y Lio-*GraNVs* presentó 5 proteínas en mayor cantidad y 11 en menor cantidad (Tabla 11).

Para obtener una visión más detallada de la carga proteica con diferencias significativas después de los tratamientos, estas proteínas fueron clasificadas mediante GO (*gene ontology*) en tres categorías: proceso biológico, función molecular y componente celular (Figura 21A y Tabla suplementaria S3, ver en Anexo 5). El análisis del proceso biológico de mostró que los tratamientos industriales afectaron principalmente a las proteínas involucradas en los procesos metabólicos (A0A218X752, A0A2I0K2Z7, G1UH28, A0A6P8CI80, A0A218VTX0) y en la respuesta a estímulos (A0A218X494, A0A218W5S4, A0A2I0K2C8, A0A2I0JGV8, A0A218W0I5, A0A218XM98), aunque también se observaron variaciones en las proteínas involucradas en los procesos de transporte o señalización (Figura 21A). Dentro de la categoría de función molecular, el término GO más prevalente fue “*binding*” englobando más del

45% de las proteínas, seguido de la "*hydrolase activity*", "*other catalytic activity*" y "*transmembrane transporter activity*" (Figura 21A). Cabe destacar que el análisis del componente celular de GO reveló que el 34% de las proteínas significativamente alteradas eran proteínas de membrana (A0A2I0I5P8, A0A218X494, A0A218XAV9, A0A218VV18, A0A2I0IF97, A0A218WXP3, A0A218WED1, A0A2I0JGV8, A0A218VZ43) (Figura 21A).

Los datos proteómicos también fueron analizados utilizando STRING para evaluar posibles interacciones proteína-proteína entre proteínas con niveles alterados (Szklarczyk et al., 2023) (Figura 21B). Aunque solo 14 de las 32 proteínas mostraron resultados en STRING, los análisis revelaron una red de interacciones entre la mayoría de estas proteínas. Hay que destacar que el único enriquecimiento funcional detectado dentro de la categoría GO de proceso biológico fue "*Response to temperature stimulus*", un proceso correlacionado con los tratamientos térmicos aplicados al ZG.

Es interesante remarcar que, tanto TET8 como PATL3, identificados como marcadores de VEs de plantas (Rutter & Innes, 2017; Ambrosone et al., 2023), se encontraban entre las proteínas de membrana y/o asociadas a membranas que mostraron diferencias significativas tras el procesamiento de ZG. Los niveles de PATL3 fueron 6,5 veces mayores en Nat-*GraNVs* en comparación con Pas-*GraNVs* y 2,4 veces mayores que en Lio-*GraNVs* (Tabla 11). De forma similar, los niveles de TET8 fueron 2,6 veces más elevados en Nat-*GraNVs* que en Pas-*GraNVs* y 3,3 veces mayores en Nat-*GraNVs* que en Lio-*GraNVs* (Tabla 11).

Tabla 11. Lista de proteínas significativamente diferentes en NVs aisladas de zumo natural de granada o de zumos sometidos a tratamientos industriales.

	Nombre	Accession number	p-valor	Fold change Nat- GraNVs/tratamiento
Nat-pas	Patellin-3-like	AoA6P8CP12	0,01397	6,52191436
	CASP-like protein	AoA2IoI5P8	0,03279	5,497554148
	Elongation factor 1-gamma-like	AoA218X494	0,01659	3,459526596
	ADP-ribosylation factor-like protein 8a	AoA6P8CMR2	0,03993	3,123123474
	Ubiquitin-NEDD8-like protein RUB2	AoA218X752	0,01803	2,964765248
	Prosaposin	AoA2IoK2Z7	0,04931	2,912286873
	H(+)-exporting diphosphatase (EC 7.1.3.1)	AoA218XAV9	0,00203	2,744113066
	Fasciclin-like arabinogalactan protein 9	AoA218VV18	0,01863	2,612232569
	Water stress and hypersensitive response domain-containing protein	AoA218W5S4	0,00507	2,491300797
	Annexin	AoA2IoK2C8	0,04085	2,364356916
	ADP-ribosylation factor	AoA2IoIF97	0,02403	2,221723632
	Copper transport protein	AoA218WXP3	0,01201	1,999553664

Tabla 11. Continuación.

	Nombre	Accession number	p-valor	Fold change Nat- GraNVs/tratamiento
Nat- pas	Monosaccharide-sensing protein 2-like	AoA218WED1	0,0075	1,973636412
	Phosphoprotein ECPP44	AoA2IoJGV8	0,03268	1,747704138
	Acidic endochitinase Pun g 14, amyloplastic (EC 3.2.1.14) (Chitinase III) (Pomegranate seed chitinase) (allergen Pun g 14)	G1UH28	0,02611	0,267392835
	chitinase (EC 3.2.1.14)	AoA6P8CI80	0,02636	0,266636772
Nat- Lio	CASP-like protein	AoA2IoI5P8	0,03601	3,827907311
	Tetraspanin-8-like	AoA218VZ43	0,04113	3,290673859
	Patellin-3-like	AoA6P8CP12	0,02461	2,433009807
	H(+)-exporting diphosphatase (EC 7.1.3.1)	AoA218XAV9	0,0005	2,172727091
	Fasciclin-like arabinogalactan protein 9	AoA218VV18	0,04897	1,880368668
	Water stress and hypersensitive response domain-containing protein	AoA218W5S4	0,04848	0,809201131
	Heat shock cognate protein 80	AoA218XM98	0,01283	0,702295373
Actin-7	AoA218Y286	0,00335	0,641351982	

Tabla 11. Continuación.

	Nombre	Accession number	p-valor	Fold change Nat- GraNVs/tratamiento
Nat- Lio	Annexin	AoA218W0I5	0,02883	0,638129579
	glutathione transferase (EC 2.5.1.18)	AoA218VTX0	0,00089	0,603369421
	Endo-1,31,4-beta-D-glucanase-like isoform X2	AoA6P8D4P9	0,04951	0,603281306
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	AoA218XGR1	0,01997	0,573468743
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	AoA218WUD0	0,0072	0,508122253
	Cinnamoyl-CoA reductase 1-like (Cinnamyl alcohol dehydrogenase)	K4JZ73	0,00723	0,482098685
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	AoA218WNT9	0,0468	0,441134564
	Thioredoxin	AoA218XV61	0,01714	0,106154585

Para confirmar la presencia y localizar la proteína TET8 en las NVs, se llevó a cabo un marcaje con inmunooro utilizando anticuerpos anti-TET8. Como se muestra en la Figura 21 C, la TET8 se detectó en la superficie de todos las *GraNVs*, aunque su presencia en *Pas-GraNVs* y *Lio-GraNVs* se redujo notablemente. Esto se reflejó en la proporción de partículas de oro por *GraNVs*, que difería significativamente entre *Nat-GraNVs* y las *GraNVs* de los zumos tratados. Para corroborar estos hallazgos, se realizaron ensayos ELISA, cuyos resultados confirmaron que los niveles de TET8 son más altos en *Nat-GraNVs* y se reducen en las NVs de las muestras tratadas (Figura 21E).

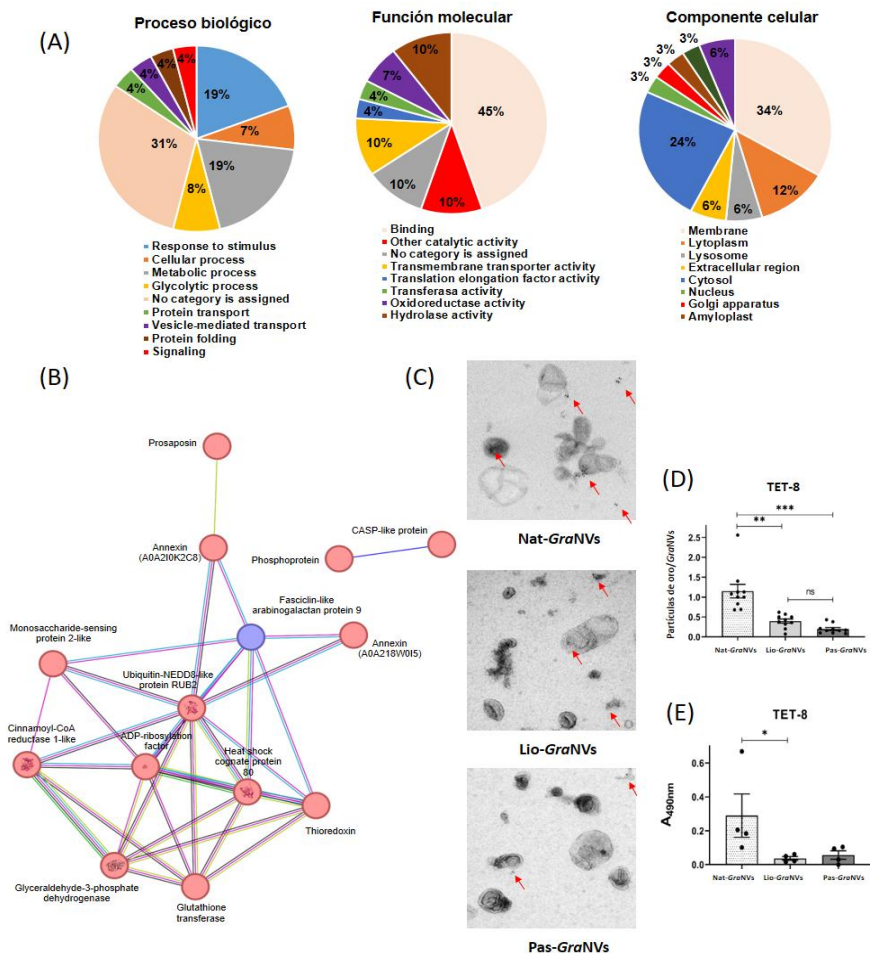


Figura 21. Las GrNVs presentan diferentes perfiles proteómicos en respuesta al tratamiento industrial. La carga proteica de Nat-GrNVs, Pas-GrNVs y Lio-GrNVs fue analizada por LC-MS/MS. (A) Clasificación de gene ontology (GO) de las proteínas de GrNVs con niveles significativamente alterados tras el procesamiento industrial, categorizadas por: proceso biológico, función molecular o componente celular. (B) Red de interacción proteína-proteína de las proteínas con expresión diferencial significativa, generada por la base de datos STRING, utilizando la puntuación mínima requerida de interacción (0.150). (C) Detección de tetraspanina-8 (TET8) en la superficie de las GrNVs observada mediante MET y marcaje inmunoro utilizando anticuerpos anti-TET8. Las flechas rojas indican las señales de TET8 en las NVs. (D) Cuantificación de las partículas de oro detectadas por GrNVs, promediada en imágenes TEM obtenidas a 40.000 aumentos y procesada con el software ImageJ. (E) Concentración de TET8 en las muestras de GrNVs determinada por ELISA usando anticuerpo anti-TET8. Los datos se presentan como media \pm SD ($n = 10$ para la cuantificación de partículas; $n = 4$ para ELISA). El análisis estadístico se realizó mediante One-way ANOVA con Graph Pad Prism8, * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La aplicación de tratamientos industriales puede alterar la composición de la matriz soluble del ZG, afectando tanto a la estabilidad del producto final como a la estructura de la membrana de las *GraNVs*. En particular, pueden dañar sus lípidos, azúcares o proteínas de membrana. Estas alteraciones pueden conducir a cambios en las interacciones de las *GraNVs* con otras moléculas solubles en el ZG, afectando a su adsorción a las *GraNVs* y modificando la composición de su corona (Galindo et al., 2007).

Hasta donde sabemos, la investigación sobre la corona de las VEs es limitada. Se ha demostrado que la corona, compuesta principalmente por proteínas, tiene un gran impacto en la funcionalidad de las VEs, aunque todavía no se han realizado estudios sobre la corona en NVs derivadas de plantas (Buzas, 2022; Wolf et al., 2022). La realización de una proteómica cuantitativa “*free label*” en este estudio, reveló que un porcentaje significativo de las proteínas con niveles alterados en las *GraNVs* tras la pasteurización o liofilización eran proteínas de membrana. Esto, junto con las visualizaciones extraídas del MET que muestran una morfología alterada en las *GraNVs* tras los tratamientos, apoya esta hipótesis.

Curiosamente, los biomarcadores de NVs derivadas de plantas TET8 y PATL3 (Rutter & Innes, 2017; Ambrosone et al., 2023) se encontraban entre las proteínas de membrana y asociadas a membrana que mostraron cambios notables tras el procesamiento del zumo de granada. PATL3 es una proteína de membrana plasmática crucial para el tráfico de vesículas y el intercambio de componentes de membrana ya que interactúa con moléculas hidrofóbicas, incluyendo fosfoinosítidos, facilitando su transferencia a través de distintos compartimentos celulares (Zhou et al., 2019). Respecto a su presencia en NVs derivadas de zumos de frutas, se ha demostrado que PATL3 está altamente expresada en NVs derivadas de zumos de cítricos (Pocsfalvi et al., 2018). Por otro lado, las Tetraspaninas son proteínas transmembrana que se asocian con

una variedad de receptores y moléculas de señalización en la membrana celular (Andreu & Yáñez-Mó, 2014). Concretamente, la TET8 puede desempeñar un papel clave en los mecanismos de captación de VEs en las plantas. Los microdominios enriquecidos con tetraspaninas, en los que se asocian a moléculas de adhesión y proteínas receptoras transmembrana organizadas dentro de estructuras similares a balsas en la membrana plasmática, participan en varios procesos, incluida la fusión vesicular y celular. Los estudios han demostrado que estos microdominios participan en la unión VE-célula (Andreu & Yáñez-Mó, 2014; Mulcahy et al., 2014).

En consonancia con nuestros resultados, Santangelo et al. (2024) demostraron que los niveles de TET8 en las NVs de almendras remojadas, remojadas-tostadas, tostadas y escaldadas se redujeron en comparación con los de las almendras crudas. Aunque los estudios sobre el impacto de los tratamientos industriales en los niveles de tetraspaninas en las VEs de mamíferos son limitados, se ha demostrado que diferentes tratamientos térmicos aplicados a la leche provocan una disminución de los niveles de CD9 (Kleinjan et al., 2021).

4.2.3. La internalización de NVs de zumos procesados es inferior a la de NVs de zumos sin tratar

Una prueba de la importancia de la TET8 en la comunicación intercelular proviene de estudios que muestran que los niveles de ARN pequeños del huésped transferidos a las células fúngicas se reducen en mutantes *tet8tet9*, lo que sugiere que TET8 y TET9 contribuyen a la inmunidad de las plantas facilitando la transferencia de ARN pequeños a las células fúngicas (Cai et al., 2018). En mamíferos, las investigaciones han demostrado que las variaciones en la expresión de tetraspaninas pueden regular cómo las VEs son dirigidas y captadas por las células receptoras, influyendo en las respuestas celulares a

través de interacciones específicas de adhesión y señalización. De hecho, CD9, CD63 y CD81, considerados marcadores de VEs en mamíferos, facilitan vías de captación específicas y permiten la orientación a células o tejidos específicos (Jankovičová et al., 2020).

Partiendo de dicha premisa, y tras los resultados de la disminución de TET8 en las *GraNVs* de zumos tratados, se consideró realizar experimentos sobre la internalización de NVs. Para ello se utilizaron las células inmunitarias THP-1, las cuales fueron tratadas con PBS, liposomas (partículas lipídicas sintéticas utilizadas como control interno), *Nat-GraNVs*, *Lio-GraNVs* o *Pas-GraNVs*.

Como marcador se empleó FM4-64 y se ensayó una concentración de 5000 partículas por célula con tiempos de incubación de 30 min, 1h y 2h.

La internalización se midió por citometría de flujo y microscopía confocal (Figura 22A, C) y se evaluó mediante el “*fold change*” en la intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés), en relación con las células tratadas con *Nat-GraNVs*, midiendo el porcentaje de células positivas para la fluorescencia FM4-64 (Figura 22A, B).

Los resultados muestran que las *Nat-GraNVs* fueron internalizadas más eficientemente por los macrófagos THP-1 en cada punto temporal, mientras que los tratamientos con *Lio-GraNVs* y *Pas-GraNVs* mostraron niveles de MFI reducidos y un porcentaje menor de células positivas marcadas. No obstante, todas las preparaciones de *GraNVs* mostraron niveles de captación superiores a los de los liposomas sintéticos (Figura 22A, B, C). Cuando los macrófagos THP-1 se incubaron con cada uno de los tratamientos a 4 °C, tanto la señal MFI como el porcentaje de células positivas disminuyeron drásticamente, lo que indica que la captación celular depende de la energía.

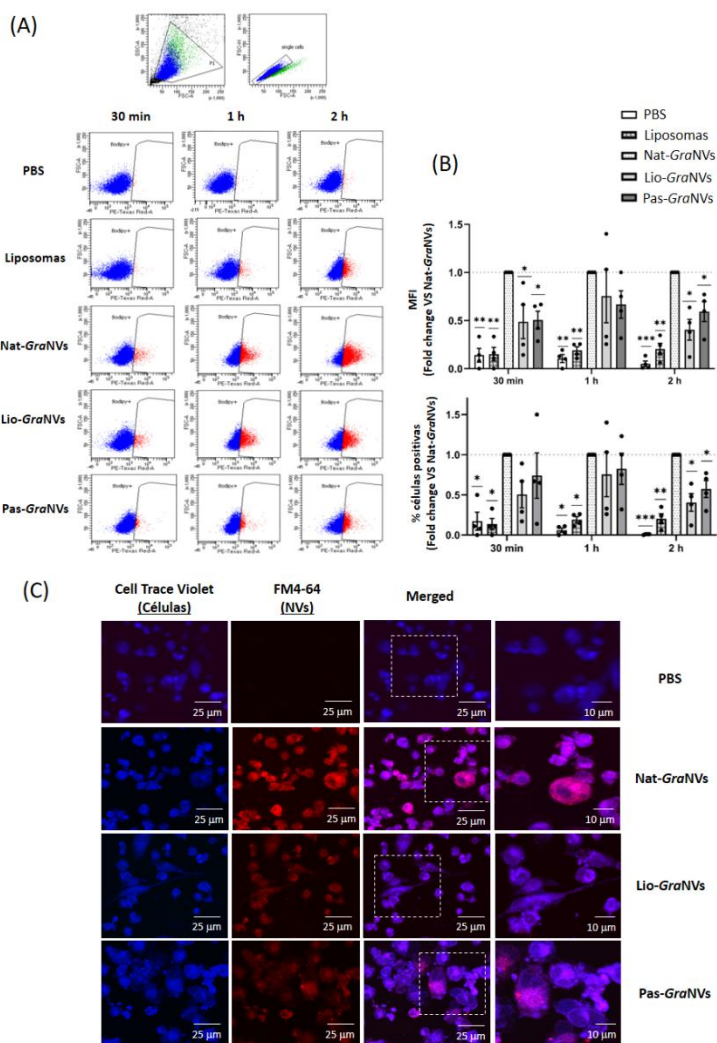


Figura 22. Captación de liposomas, Nat-GraNVs, Lio-GraNVs o Pas-GraNVs, marcados con FM4-64, por macrófagos humanos THP-1-XBlueTM-CD14. Las células fueron tratadas con PBS y, liposomas marcados (ambos usados como control), y con Nat-GraNVs, Lio-GraNVs o Pas-GraNVs marcadas a una concentración de 5.000 partículas por célula. (A) Estrategia de “gating” y gráficos “dot plots” obtenidos en un experimento representativo de internalización de NVs evaluado tras 30 min, 1 h o 2 h de incubación mediante citometría de flujo. (B) La captación se cuantificó midiendo intensidad media de fluorescencia (Mean Fluorescence Intensity, MFI) y el porcentaje de células con internalización de NVs positiva. (C) Imágenes representativas de microscopía confocal de barrido láser que muestran la captación de NVs en células THP-1-XBlueTM-CD14. Los datos son media \pm SD de 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante One way-ANOVA utilizando Graph Pad Prism 8, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Para evaluar si las proteínas de superficie estaban implicadas en las diferencias observadas en la captación de *GraNVs* por macrófagos THP-1, todas las muestras de *GraNVs* se trataron con proteinasa K (PK). Esta enzima digiere las proteínas localizadas en la superficie al tiempo que mantiene la integridad de la bicapa lipídica, lo que garantiza que la integridad estructural de las NVs no se vea comprometida (Cvjetkovic et al., 2016). Tras el tratamiento, las *GraNVs* se purificaron de nuevo mediante SEC, se marcaron con FM4-64 y se aplicaron a células THP-1 como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la Figura 23, la captación de Nat-*GraNVs* disminuye significativamente tras el tratamiento con PK, alcanzando niveles comparables a los observados con Lio-*GraNVs* o Pas-*GraNVs*. Por el contrario, el tratamiento con PK mostró un efecto mínimo sobre la captación de Pas-*GraNVs* y Lio-*GraNVs*, incluso produjo un mayor MFI, lo que implica una mejor internalización en las versiones tratadas en comparación con las no tratadas (Figura 23A, B).

Los mecanismos subyacentes al acoplamiento y captación de VEs por las células receptoras siguen siendo poco conocidos. En los mamíferos se han propuesto varias vías de captación, como la endocitosis mediada por clatrina, la fagocitosis, la macropinocitosis y la fusión con la membrana plasmática o endosomal. Además, se cree que las balsas lipídicas y las interacciones proteína-proteína específicas desempeñan un papel crucial en la captación de VEs (Mulcahy et al., 2014; Liu & Wang, 2023). En las plantas se han descrito mecanismos similares. Por ejemplo, las NVs derivadas del jengibre chino (*Boesenbergia rotunda*) son internalizadas por células de cáncer colorrectal (HT-29 y HCT116) mediante fagocitosis y endocitosis mediada por caveolas (Wongkaewkhiaw et al., 2022). Del mismo modo, las células Colon-26 y HT-29 absorben las nanopartículas derivadas del jengibre (*Zingiber officinale*) mediante fagocitosis (Zhang et al., 2016).

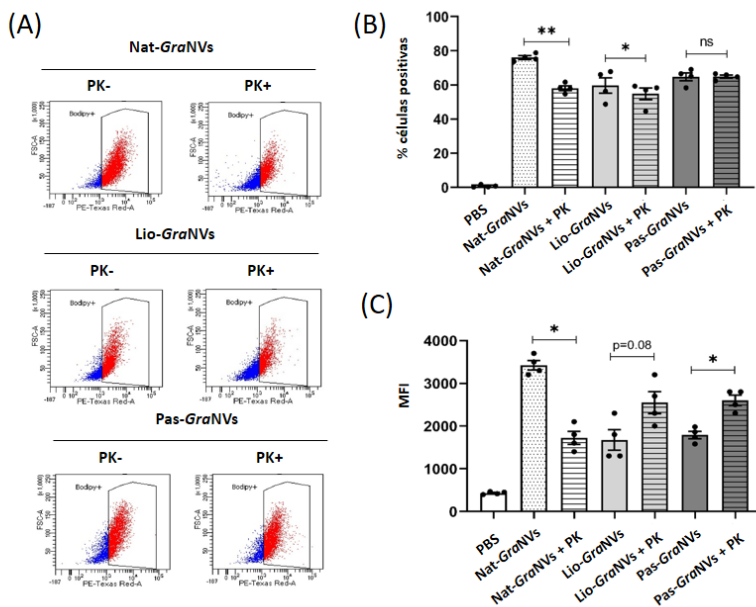


Figura 23. El tratamiento con proteinasa K reduce la captación por los macrófagos THP-1-XBlue™-CD14 de las Nat-GraNVs pero no de Lio-GraNVs o Pas-GraNVs. Las GraNVs fueron pretratadas con proteinasa (PK) antes del marcaje con FM4-64, y su captación por las THP-1 fue evaluado por citometría de flujo después de 2 h de incubación. (A) Gráficos “dot plots” obtenidos en un experimento representativo. (B) Cuantificación de la captación a partir de la intensidad media de fluorescencia (Mean Fluorescence Intensity, MFI). (C) Porcentaje de macrófagos que muestran una internalización de NVs positiva. Los datos se presentan como media \pm SEM de 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante One way-ANOVA utilizando Graph Pad Prism 8, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Song et al (2020), demostraron que las NVs derivadas del ajo eran internalizadas por las células HepG2 a través de la interacción de las glicoproteínas CD98 con proteínas similares a las lectinas. Como se ha comentado anteriormente, nuestros hallazgos demuestran que el tratamiento con PK reduce significativamente la captación de Nat-GraNVs pero no de Lio-GraNVs o Pas-GraNVs, apoyando la hipótesis de que las proteínas de membrana y/o corona fueron degradadas durante el procesamiento industrial previo a la adición de PK. Esta degradación puede contribuir a la menor

captación observada en las *GraNVs* procesadas. Resultados similares se obtuvieron con las *NVs* derivadas del ajo sometidas a digestión con tripsina, lo que redujo la captación, potencialmente debido a la degradación de las proteínas de superficie y a la reorganización de la estructura lipídica. Además, estas *NVs* de ajo tratados con tripsina mostraron una potencia antiinflamatoria inferior (Song et al., 2020).

4.2.4. Las *NVs* aisladas de zumos de granada pasteurizados y liofilizados no mantienen todas las propiedades biológicas

Anteriormente se ha descrito que las *Nat-GraNVs* tienen efectos antiinflamatorios, antioxidantes y cicatrizantes. Con el objetivo de profundizar en el conocimiento del efecto de los procesamientos industriales en las *GraNVs*, se han evaluado las propiedades de las *Lio-GraNVs* y *Pas-GraNVs*.

a) Actividad antiinflamatoria

Primero se analizó el efecto de las *Nat-GraNVs*, *Lio-GraNVs* y *Pas-GraNVs* sobre la expresión de $\text{NF-}\kappa\beta$ en macrófagos humanos. Teniendo en cuenta las distintas relaciones partícula/proteína entre los preparados de las muestras se probaron tres concentraciones de *GraNVs* (2,5, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$).

Como se ha visto en el apartado 4.1.2. las *Nat-GraNVs* no alteraron significativamente la expresión de $\text{NF-}\kappa\beta$, en contraste con el incremento sustancial inducido por el agente pro-inflamatorio LPS (Figura 24A). Sin embargo, las *Pas-GraNVs* aumentaron ligeramente los niveles de $\text{NF-}\kappa\beta$ a la concentración más alta ensayada (10 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 24A).

Para evaluar el potencial antiinflamatorio de las *GraNVs*, los macrófagos THP-1, pretratados con LPS durante 1 h, fueron sometidos a tratamientos con PBS, *Nat-GraNVs*, *Lio-GraNVs* o *Pas-GraNVs*. Los niveles de $\text{NF-}\kappa\beta$ se

determinaron 24 h después de la administración de las *GraNVs* (Figura 24B). Sólo las *Nat-GraNVs* inhibieron la expresión de $\text{NF-}\kappa\beta$, incluso a la concentración más baja (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Por el contrario, las *Lio-GraNVs* y las *Pas-GraNVs* no indujeron ningún efecto modulador significativo sobre la expresión de $\text{NF-}\kappa\beta$, lo que sugiere que ambos procesamientos industriales reducen la actividad antiinflamatoria de las *GraNVs* (Figura 24B).

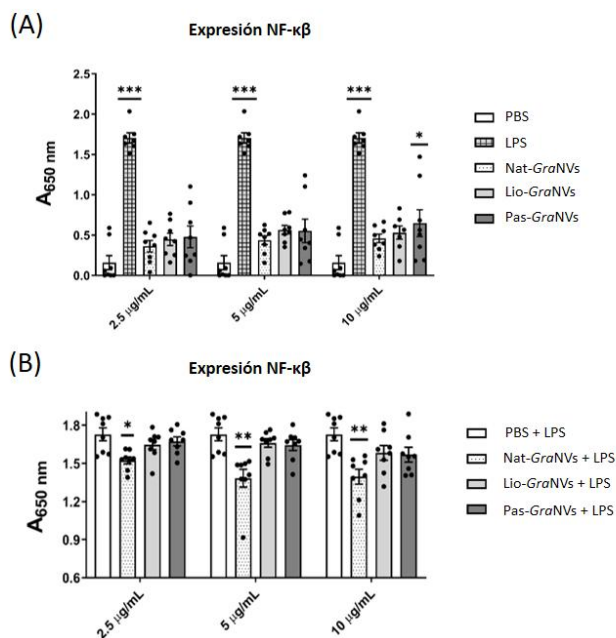


Figura 24. Los procesos industriales disminuyen el efecto antiinflamatorio de las *Nat-GraNVs* en macrófagos estimulados con LPS. Los macrófagos humanos *THP-1-XBlueTM CD14* fueron tratados con de 2,5, 5 o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *GraNVs*, y los niveles de $\text{NF-}\kappa\beta$ fueron evaluados usando el reactivo *QUANTI-BlueTM*. El PBS fue utilizado como control para el análisis estadístico. (A) Niveles de $\text{NF-}\kappa\beta$ en macrófagos no activados. LPS sirve como control positivo para la inflamación. (B) Niveles de $\text{NF-}\kappa\beta$ en macrófagos activados con LPS tras los tratamientos. Los datos se presentan como media \pm SEM ($n=8$). El análisis estadístico se realizó mediante One way-ANOVA utilizando Graph Pad Prism 8, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

b) Actividad antioxidante

Los tratamientos térmicos y la liofilización aplicados a las frutas y sus productos, incluidos los zumos, alteran su composición nutricional, afectando a menudo tanto a su contenido como a su capacidad antioxidante (Shofian et al., 2011; Petruzzi et al., 2017).

En el apartado 4.1.2 se demostró que las *Nat-GraNVs*, a una concentración de 5 µg/ml, proporcionan un efecto protector contra el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ en células Caco-2. Para evaluar con más detalle esta capacidad protectora, se llevaron a cabo ensayos MTT utilizando líneas celulares humanas HepG2, Caco-2 y THP-1 pretratadas con PBS, o con *Nat-*, *Pas-* y *Lio-GraNVs* (5 µg/ml) antes de exponerlas a concentraciones variables de H₂O₂ durante 24 h (Figura 25). En este ensayo se utilizó DMSO como control citotóxico interno. Los experimentos iniciales confirmaron que las concentraciones crecientes de *Nat-*, *Pas-* y *Lio-GraNVs* (entre 2,5 y 15 µg/ml) no inducían efectos citotóxicos en ninguna de las líneas celulares analizadas.

Las células HepG2 pretratadas con *GraNVs*, y con una exposición a 100 µM de H₂O₂ mostraron un aumento significativo de la viabilidad, expresada como porcentaje de MTT transformado (*Nat-GraNVs* 73,86 ± 20,80%, *Lio-GraNVs* 71,35 ± 25,58%, *Pas-GraNVs* 67,34 ± 24,57%), en comparación con las células pretratadas con PBS (42,11 ± 7,8%) (Figura 25A). En las células Caco-2, sólo las *Nat-GraNVs* mejoraron significativamente la viabilidad tras la exposición a 200 µM de H₂O₂. Sin embargo, a una concentración más baja de H₂O₂ (50 µM), todas las *GraNVs* mostraron efectos antioxidantes significativos, con un porcentaje de MTT de 93,02 ± 7,06%, 87,11 ± 18,37%, y 89,75 ± 17,52% para los tratamientos con *Nat-GraNVs*, *Lio-GraNVs*, y *Pas-GraNVs*, respectivamente, comparado con 67,87 ± 14,97% para el pretratamiento con

PBS (Figura 25B). Curiosamente, no se observó ningún efecto protector en las células THP-1, expuestas a altas concentraciones de H₂O₂ (Figura 25C).

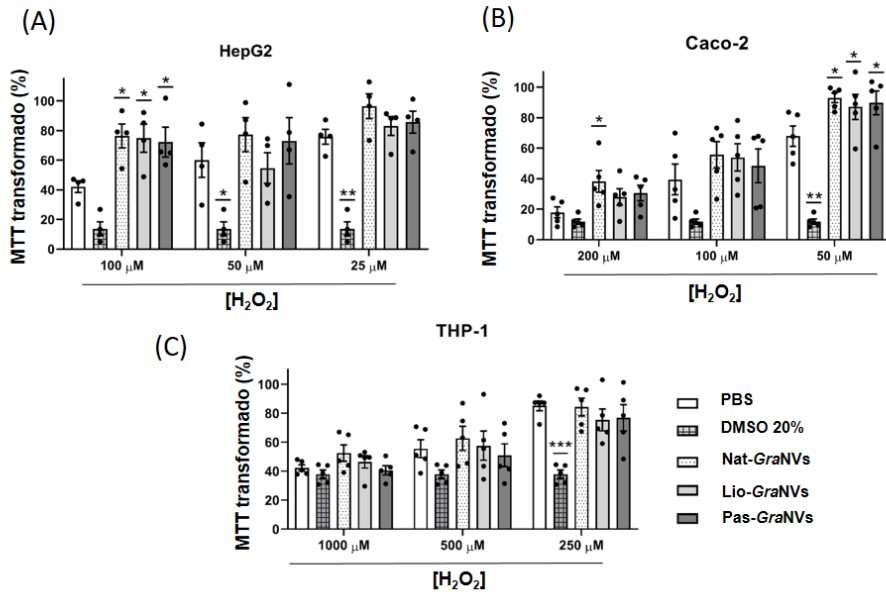


Figura 25. Las GraNVs actúan como citoprotectoras en respuesta al estrés inducido por peróxido de hidrógeno en células HepG2, Caco-2 y THP-1-*XBlue*TM-CD14. Las células fueron pretratadas durante 24 h con Nat-GraNVs, Lio-GraNVs y Pas-GraNVs (5 μg/mL) antes de incorporar diferentes concentraciones (25 – 1000 μM) de H₂O₂. Los datos se expresan como la media ± SEM (n= 3). Se realizó un análisis estadístico mediante One way-ANOVA utilizando Graph Pad Prism 8, *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001.

c) Actividad cicatrizante

Previamente, se ha mostrado que las Nat-GraNVs promueven significativamente el cierre de heridas en células epiteliales intestinales, sugiriendo su potencial como alternativa terapéutica. Sin embargo, dichos ensayos se realizaron en ausencia de SFB, lo cual puede influir en los resultados obtenidos. Para investigar los efectos del procesamiento industrial

en la capacidad de cicatrización de heridas de las *GraNVs*, llevamos a cabo un ensayo comparativo de raspado en células Caco-2 en medio que contenía un 10% de SFB. Las *GraNVs* se añadieron a una concentración final de 5 µg/ml, que fue la concentración óptima de las ensayadas anteriormente. La dexametasona se incluyó como control negativo.

Tras 24 h de tratamiento, se calcularon los porcentajes de cierre del raspado, observándose que las *Nat-GraNVs* (81,89 ± 18,04% de herida cicatrizada) favorecen significativamente el cierre de la herida en comparación con las *Lio-GraNVs* (52,49 ± 27,33%) y las *Pas-GraNVs* (55,19 ± 24,41%) (Figura 26). En realidad, sólo las *Nat-GraNVs* mejoraron la eficacia de cicatrización de la herida en comparación con las células control tratadas con PBS (60,13 ± 16,67% de la herida cicatrizada) (Figura 26).

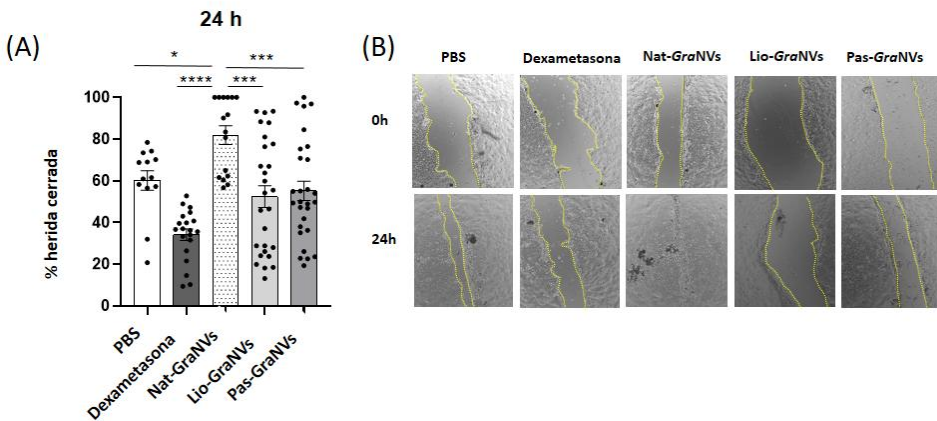


Figura 26. El tratamiento con *Nat-GraNVs* estimula una cicatrización más rápida en células epiteliales intestinales que las *Lio-GraNVs* o *Pas-GraNVs*. Las células Caco-2 crecieron hasta la confluencia y se realizaron ensayos de raspado con una punta de pipeta. Las células fueron tratadas con PBS, dexametasona, *Nat-GraNVs*, *Lio-GraNVs* o *Pas-GraNVs*. (A) Cuantificación del porcentaje de cicatrización 24 h después de la lesión. Las capacidades de cicatrización se analizaron mediante ensayos de raspado, tratando las células Caco-2 con PBS, Dexametasona, *Nat-GraNVs*, *Lio-GraNVs* o *Pas-GraNVs* (5 µg/mL). (B) Imágenes representativas del proceso de cicatrización. Los datos se presentan como media ± SEM de 16-28 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante One way-ANOVA utilizando Graph Pad Prism 8, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Probablemente, las diferencias observadas en el acoplamiento y la captación de las distintas nanovesículas contribuyen a las variaciones en las propiedades de las *GraNVs*. Las membranas de las VEs y de las NVs no son meros portadores pasivos de carga, sino que participan activamente en eventos de señalización. Al presentar moléculas de superficie específicas, las VEs pueden interactuar directamente con los receptores de las células diana, iniciando respuestas como vías de señalización intracelular incluso sin necesidad de internalización (Jahnke & Staufer, 2024). Todo ello podría explicar que las Lio-*GraNVs* y las Pas-*GraNVs* mostraran efectos antiinflamatorios y de cicatrización de heridas menores a los inducidos por las Nat-*GraNVs*. Curiosamente, no se observaron diferencias en sus propiedades antioxidantes. Este hallazgo podría atribuirse a la presencia en las *GraNVs* de enzimas antioxidantes, bien caracterizadas, que son capaces de desintoxicar y reducir el estrés oxidativo inducido por el H₂O₂ sin necesidad de interacción con las células receptoras.

En conjunto, estas diferencias de funcionalidad ponen de relieve consideraciones relativas al potencial terapéutico de los zumos de granada comerciales sometidos a tratamientos industriales. Sin embargo, se necesitan más estudios para evaluar si concentraciones más elevadas de Lio- o Pas-*GraNVs* podrían lograr efectos terapéuticos similares a los de las Nat-*GraNVs*. Además, todas las *GraNVs* contienen diversas moléculas bioactivas, más allá de las proteínas, como los microRNAs (López de las Hazas et al., 2023). Investigaciones anteriores han demostrado que la pasteurización provoca una pérdida de los ARN asociados a las VEs de leche (Kleinjan et al., 2021; Colella et al., 2023). Por lo tanto, se necesitan más estudios para evaluar si el procesamiento industrial afecta a otras moléculas bioactivas del zumo de granada, como los ARN, y cómo esto puede repercutir en las propiedades funcionales de las *GraNVs*.

4.3. Caracterización y bioactividad de NVs aisladas del fluido apoplástico de la vaina de la algarroba

4.3.1. El fluido apoplástico de la vaina de algarroba contiene NVs con morfología y carga proteica similar a VEs

El apoplasto, un espacio externo a la membrana plasmática de las células vegetales, abarca la pared celular de la planta y los espacios aéreos intercelulares dentro de los tejidos vegetales. Está involucrado en una amplia gama de procesos fisiológicos: transporte de agua y nutrientes, mecanismos de defensa de la planta, interacciones celulares, mantenimiento de las paredes celulares y la transmisión de señales ambientales y de desarrollo (Rodríguez-Celma et al., 2016).

La técnica más comúnmente utilizada para recolectar el fluido apoplástico (FA) es la infiltración al vacío-centrifugación. En ella, el tejido se somete, bajo vacío, a una infiltración con un tampón salino, y el fluido extracelular resultante se recoge posteriormente mediante centrifugación. Regente et al. (2009) fueron los primeros en extraer VEs del compartimento apoplástico empleando semillas de girasol (*Helianthus annuus L*). Basándose en este estudio, Rutter & Innes (2017) implementaron cambios en el tampón de infiltración que llevaron a una nueva formulación que ha sido ampliamente utilizada por otros (Cai et al 2018; Chaya et al., 2023; Ipinmoroti et al., 2023; Ekanayake et al., 2024) (Tabla 12). En nuestro estudio, se ha utilizado PBS (137 mmol/L NaCl, 1,8 mmol/L KH₂PO₄, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2,7 mmol/L KCl; pH 8) como tampón de infiltración debido a su capacidad para mitigar los efectos adversos sobre la integridad estructural de la membrana plasmática. Además, un trabajo exhaustivo sobre el impacto de la composición de la solución de infiltración en la adquisición de proteínas del apoplasto

mostró el mayor recuento de proteínas extracelulares, con el menor número de contaminantes de proteínas intracelulares, al emplear un tampón de fosfato de sodio 100 mM (Witzel et al., 2011).

El procedimiento de aislamiento de *AlgNVs* se llevó a cabo de la misma manera que las *GraNVs*, con una combinación de filtración tangencial (TFF) y cromatografía por exclusión de tamaño (SEC). La presencia de NVs en el FA de la vaina de algarroba se verificó mediante imágenes obtenidas a través del MET (Figura 27A), las cuales revelan estructuras con formas esféricas y ovaladas de tamaños menores a 500 nm. Mediante el análisis por rastreo de partículas (NTA) se halló que el tamaño que con más frecuencia se daba (moda) fue de 167,7 nm (Figura 27B), y en cuanto a la concentración de partículas, se obtuvieron $5,31 \pm 0,22 \times 10^8$ partículas por mL.

Tras conocer la media del contenido de proteína (84,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$), obtenida de tres muestras independientes, se calculó el ratio de partículas/ μg de proteína obteniendo una media de $6,25 \times 10^6$ partículas/ μg de proteína (Figura 27C). Este resultado, de acuerdo con Webber & Clayton (2013), consideraría la muestra de NVs como impura al exhibir una proporción menor de 2×10^9 partículas/ μg de proteína. No obstante, dicho estudio fue realizado en muestras animales aisladas a través de ultracentrifugación, por lo que habría que tomarlo con cautela cuando se trata de NVs vegetales.

Tabla 12. Comparación de la composición de los tampones utilizados y características del proceso de extracción de NVs del apoplasto de diferentes plantas.

Planta	Tampón de aislamiento de vesículas	pH	Vacío	Referencias
<i>Sorghum bicolor</i>	20 mM MES 2 mM CaCl ₂ 0,1 M NaCl	6	5 x 20 s 0,1 MPa	(Chaya et al., 2023)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	20 mM MES 2 mM CaCl ₂ 0,1 M NaCl	6	-	(Cai et al., 2018; He et al., 2021; Rutter & Innes, 2017)
<i>Helianthus annuus</i>	50 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 0,1% 2-mercaptoetanol	7,5	3 x 10 s separados por intervalos de 30 s	(Regente et al., 2009)
<i>Cannabis sativa</i>	30 mM MES 2 mM CaCl ₂ 0,1 M NaCl	-	-	(Ipinmoroti et al., 2023)
<i>Solanum tuberosum</i>	20 mM MES 2 mM CaCl ₂ 0,1 M NaCl	6	30 PA 10 min	(Ekanayake et al., 2024)

Al igual que sucede con las NVs aisladas de zumos de frutas, la concentración de NVs derivadas del FA dependerá del material vegetal de partida y de los métodos de aislamiento y purificación realizados. Ipinmoroti et al. (2023) describieron una concentración de $2,9 \times 10^7$ a $2,3 \times 10^8$ partículas/mL de NVs obtenidas del FA de hojas de distintos cultivares de plantas de cáñamo, aisladas mediante ultracentrifugación. En el caso de NVs derivadas del FA de hojas de sorgo, aisladas mediante gradiente de densidad de iodixanol, el

contenido de partículas/mL fue mayor ($1,20 \times 10^9 \pm 4,17 \times 10^7$ partículas/mL) (Chaya et al., 2023).

Si comparamos con las *GraNVs*, las *AlgNVs* muestran características similares en morfología y tamaño, aunque la concentración de partículas y el contenido proteico evaluados fueron menores.

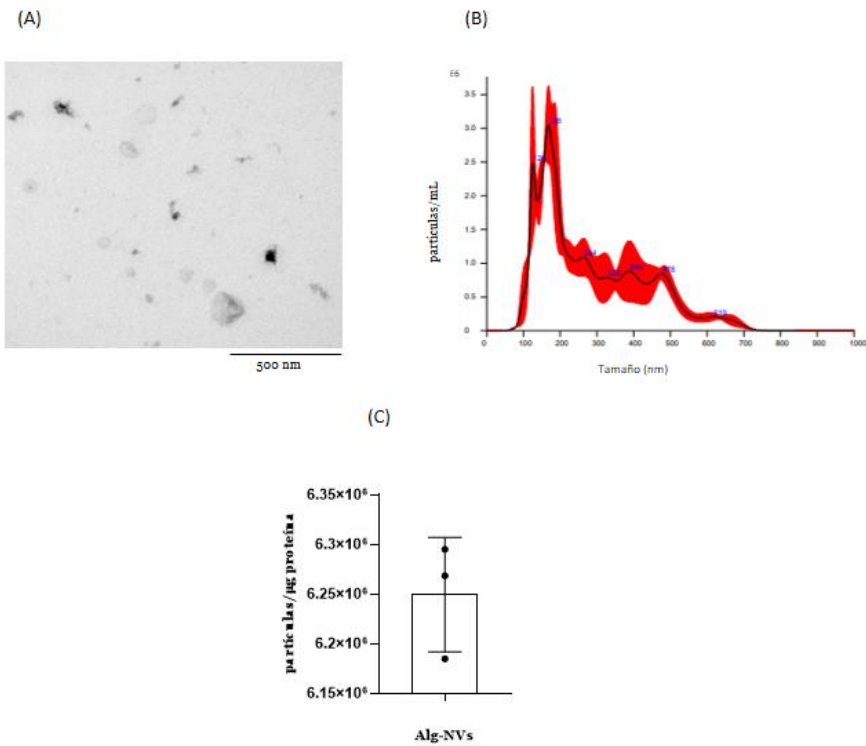


Figura 27. Aislamiento y caracterización de NVs de algarroba. (A) Imágenes representativas de las NVs realizadas con el microscopio electrónico de transmisión. (B) NTA. (C) Análisis de rastreo de las AlgNVs. Se utilizó una dilución 1:200 de la muestra en PBS filtrado. (C) La pureza de las AlgNVs aisladas se calcula mediante la proporción de partículas por μg de proteína. $n=3$.

Para caracterizar el contenido proteico de las *AlgNVs*, así como para identificar posibles marcadores de VEs, fueron analizadas tres muestras replicadas de *AlgNVs* mediante LC-MS/MS. De un total de 261 proteínas detectadas se seleccionaron aquellas que presentaban, al menos, un péptido identificado con una probabilidad mayor del 95% resultando un total de 197 proteínas identificadas (Tabla suplementaria S4, ver Anexo 6). Entre éstas se encontraron proteínas que han sido previamente relacionadas con VEs de plantas (Pinedo et al., 2021), tales como Anexina, distintos Factores de elongación, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), proteínas *Heat shock* (HSP70), Malato deshidrogenasa y Tetraspanina-8 (TET8).

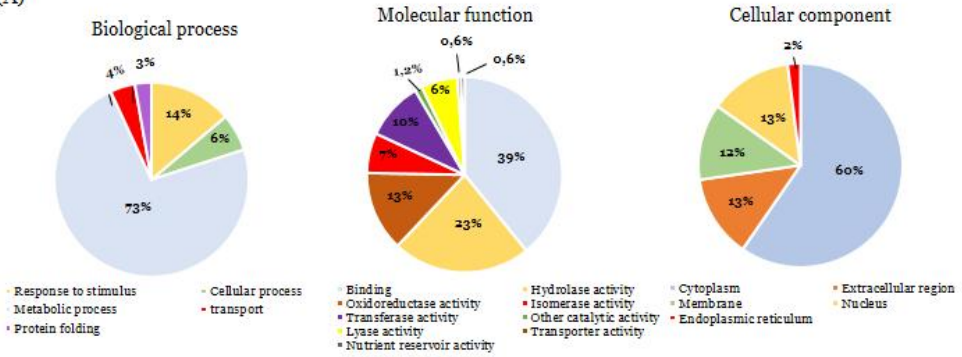
Con el objetivo de profundizar en la identificación del contenido proteico de las *AlgNVs*, se utilizó *Gene ontology* (GO) para clasificar las proteínas según el proceso biológico, función molecular y compartimento celular (Figura 28A). De acuerdo con el proceso biológico, la mayoría de las proteínas estaban asociadas a *metabolic process*, seguida de *response to stimulus* y *cellular process*. Al igual que en otras NVs derivadas de FA (Ekanayake et al., 2024), se identificaron enzimas relacionadas con la modificación de la pared celular como *Pectin acetyltransferase* o *Pectinesterase* (Tabla suplementaria S5, ver ANEXO 5), reforzando una sugerencia previa sobre la participación de las NVs en el remodelado de la pared celular (de la Canal & Pinedo, 2018).

En cuanto a la función molecular, las *AlgNVs*, al igual que las *GraNVs*, aparecen principalmente vinculadas a los términos GO *binding*, *hydrolase activity* y *oxidoreductase activity*.

En el análisis de los términos GO relacionados con el compartimento celular, se identificaron proteínas asociadas a *cytoplasm* y *nucleus*, lo que podría reflejar el origen de las NVs. En tercer lugar, aparece el término *extracellular region*, lo que sugiere una característica distintiva de las nanopartículas.

Las proteínas de las AlgNVs también fueron analizadas utilizando STRING para evaluar las redes de interacción proteína-proteína. De las 197, solo fueron examinadas 23 debido a que la base de datos no recoge la especie *Ceratonia siliqua*, y, por proximidad se empleó *Vigna angularis*, especie perteneciente a la misma familia. A pesar de ello, el análisis permitió identificar una red de interacciones que conecta a la mayoría de estas proteínas (Figura 28B). La enzima *Pectin esterase* (AOAOL9TEU4) está conectada con la proteína HSP70 (AOAOL9TGV7) que ayuda a proteger las células de diversas formas de estrés. El remodelado de la pared celular constituye un proceso crucial en las respuestas de adaptación de las plantas al estrés abiótico, entre otros el generado por las altas temperatura. En este proceso, enzimas como las *Pectin methylesterases* desempeñan un papel clave, ya que sus acciones modulan las propiedades de la pared celular interactuando con las proteínas HSP (Wu et al., 2018). Por lo tanto, la conexión entre la enzima *Pectin esterase* y la proteína HSP70 podría contribuir a respaldar la hipótesis planteada por Ambrosone et al. (2023) sobre la modificación de las pectinas de la pared celular como mecanismo que contribuye a la secreción de NVs en plantas frente a ciertos tipos de estrés.

(A)



(B)

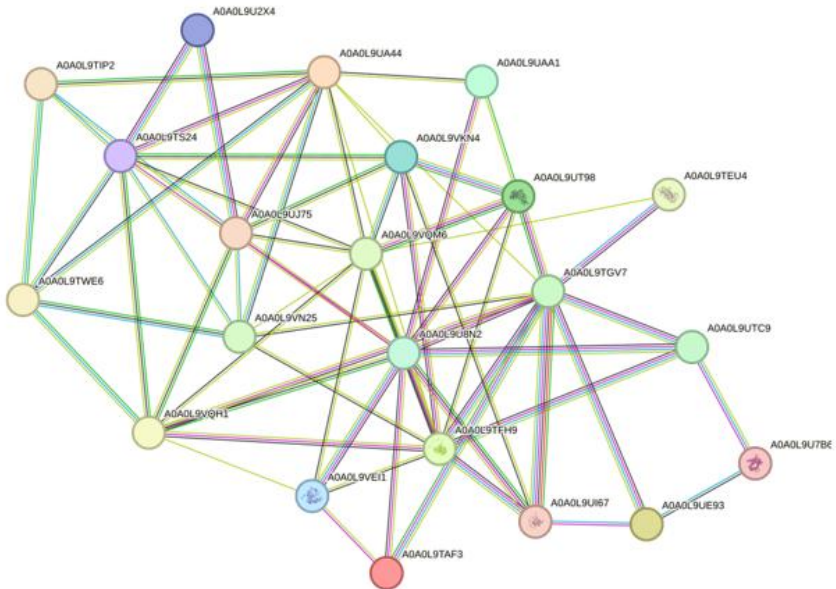


Figura 28. Caracterización proteómica de las AlgNVs. El contenido proteico fue analizado por LC-MS/MS. (A) Los gráficos de Gene Ontology se clasificaron de acuerdo con la función molecular, el proceso biológico o el componente celular. (B) Se generó una red de interacción proteína-proteína mediante la base de datos STRING con un umbral de confianza de 0.150.

4.3.2. Las AlgNVs presentan actividades biológicas *in vitro*

a) Las AlgNVs no son citotóxicas

Al igual que se hizo en la caracterización funcional de las *GraNVs*, se ha estudiado el impacto de las *AlgNVs* sobre las células THP-1 y Caco-2. En este caso, además, se empleó la línea celular de queratinocitos HaCaT debido al creciente interés de las nanovesículas en el campo de la dermatología y el potencial de las VEs como agentes terapéuticos (Sreeraj et al., 2024).

En primer lugar, se evaluó la posible citotoxicidad mediante el ensayo MTT para descartar que las *AlgNVs* pueden provocar algún tipo de daño celular. Para ello, los tres tipos de células se incubaron con diferentes concentraciones de *AlgNVs* (5, 10 o 20 $\mu\text{g/mL}$). Como control positivo de citotoxicidad se usó 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) y como control negativo tampón PBS.

Como se muestra en la Figura 29, las *AlgNVs* no solo no ejercieron efectos citotóxicos tras 24 y 48 h de incubación, sino que incluso, promovieron el crecimiento de las tres líneas celulares estudiadas a medida que se aumentó la dosis de nanovesículas.

Para tener una visión más global del efecto aislado de las *AlgNVs*, se realizó una comparación con la fracción SEC sin NVs (F20) y con el extracto total (*AlgET*) (Figura 30). Ninguno de estos tratamientos mostró tener citotoxicidad frente a las células.

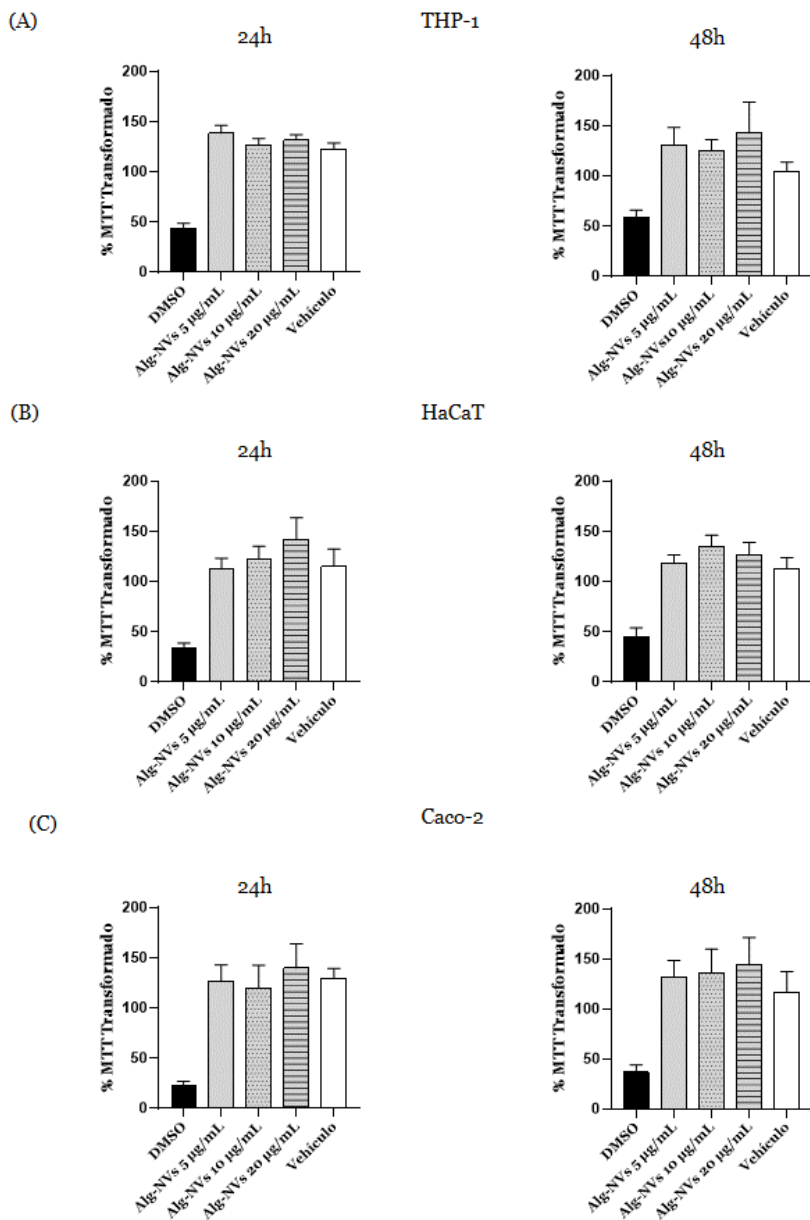


Figura 29. Evaluación de la citotoxicidad inducida por AlgNVs. La citotoxicidad se evaluó determinando el porcentaje de transformación de MTT en células THP-1 (A), HaCat (B) y Caco-2 (C) expuestas a diferentes concentraciones de AlgNVs, vehículo (PBS) o DMSO durante 24 y 48 horas. Los datos se expresan como la media \pm SEM ($n = 4$).

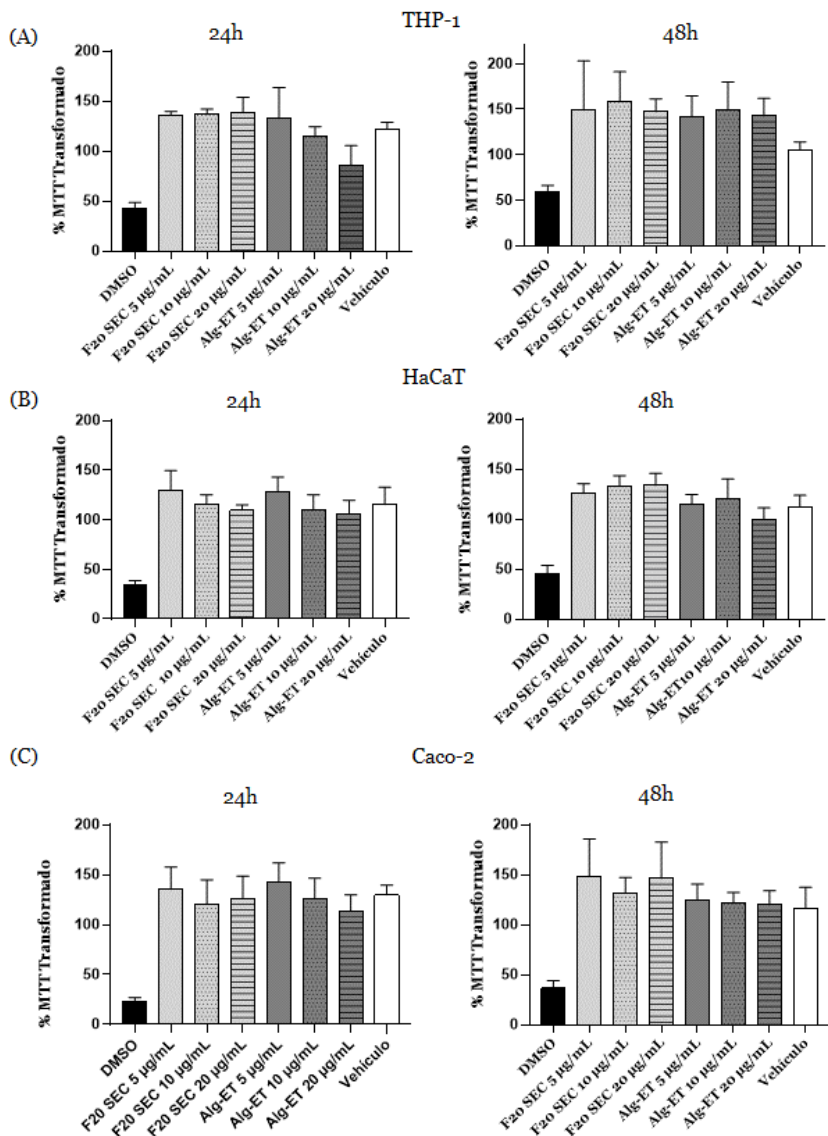


Figura 30. Evaluación de la citotoxicidad inducida por la fracción proteica sin NVs derivada de la SEC (F20) y del extracto total del fluido apoplástico de la pulpa de algarroba (AlgET). Los tratamientos se llevaron a cabo en células THP-1 (A), HaCaT (B) y Caco-2 (C) expuestas a diferentes concentraciones durante 24 y 48 horas. Los datos se expresan como la media \pm SEM ($n = 4$).

Estos resultados son consistentes con otros estudios que han demostrado la que las NVs derivadas de diversas plantas en diferentes líneas celulares no presentan citotoxicidad. Por ejemplo, las nanopartículas similares a exosomas derivadas de *Beta vulgaris* (BEX) no mostraron ningún efecto tóxico en líneas celulares cancerosas como HeLa, MCF-7 y N2A a concentraciones de 10 y 100 µg/mL (Mahdipour, 2022). En otros experimentos el ensayo MTT mostró que la viabilidad de las células HepG2 no se vio afectada al ser expuestas a nanopartículas de arándanos en un rango de 50-200 µg/mL (Zhao et al., 2022) y de manera similar, la viabilidad en células HaCaT, HDF y RAW264.7 no disminuyó después de la exposición a concentraciones elevadas de NVs de col y col roja (1×10^{11} y 2×10^{11} partículas/mL) (You et al., 2021).

Sin embargo, es importante señalar que se hay casos en los cuales la toxicidad de las NVs varía entre células cancerosas y normales. Así, diversas concentraciones de NVs de ajo (5–50 µg/mL) ejercieron efectos citotóxicos en dos líneas celulares cancerosas (A498 y A549), pero no en células normales HDF (Özkan et al., 2021). Asimismo, las NVs de té (0.5 a 64 µg/mL) disminuyeron la viabilidad celular en las líneas MCF-7, 4T1, A549 y HeLa, pero no fueron tóxicas en líneas celulares no cancerosas como HUVEC y HEK293T (Chen et al., 2022). Resultados comparables también se han tenido en plantas no comestibles, como *Cannabis sativa*, donde la viabilidad de células HepG2 y Huh-7 tratadas con NVs de dos quimiotipos de cáñamo disminuyó en el rango de 25-200 µg/mL, pero las NVs no indujeron efectos citotóxicos en células HUVEC (Tajik et al., 2022).

b) *Alg*NVs muestran efectos antiinflamatorios y cicatrizantes

La cicatrización es un proceso fisiológico que abarca múltiples etapas: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación (Mahmoud et al., 2024). Las células inmunitarias, como los macrófagos, son atraídas al área durante la fase de inflamación; estas células tienen la capacidad de cambiar de un estado proinflamatorio a uno antiinflamatorio, contribuyendo al proceso de cicatrización. En consecuencia, se buscan a menudo características antiinflamatorias para prevenir la desregulación de la inflamación y evitar daños irreversibles. Las investigaciones en el campo de las NVs derivadas de plantas han mostrado su capacidad para ejercer efectos antiinflamatorios y de cicatrización de heridas (Naruskaitė et al., 2021; Shao et al., 2023; Feng et al., 2024). De hecho, como se ha expuesto en los apartados 4.1.2. y 4.2.1., se ha confirmado que las *Gra*NVs reducen la expresión de NF- κ B en macrófagos y aceleran el cierre de heridas en Caco-2. Esos resultados se ven respaldados por investigaciones que han relacionado la regeneración y cicatrización de heridas con la antiinflamación o proliferación celular inducida por NVs derivadas de plantas (Shao et al., 2023; Li et al., 2023; Wu et al., 2024).

En el caso de la algarroba, varios estudios han mostrado que los extractos de algarroba poseen efectos antiinflamatorios, los cuales han sido atribuidos a sus compuestos bioactivos (Rtibi et al., 2016; Atta et al., 2023; El Sayed et al., 2023; Ikram et al., 2023). Uno de estos compuestos clave podría ser el D-pinitol, un polialcohol cíclico con múltiples propiedades terapéuticas, tales como actividad antiinflamatoria y cicatrizante, que se encuentra en la pulpa de la algarroba (Juneja et al., 2020; Haque et al., 2024).

Por ello, en este apartado se estudiará el efecto antiinflamatorio de las *Alg*NVs

en macrófagos humanos, además de su efecto cicatrizante en queratinocitos, comparándolo con el D-pinitol.

Inicialmente se eligieron la menor (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la mayor (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) concentración de *AlgNVs* para evaluar el efecto sobre la expresión de NF- κB en macrófagos humanos (Figura 31A). En ningún caso las NVs modificaron de manera significativa la expresión de NF- κB , a diferencia del marcado aumento provocado por el lipopolisacárido bacteriano (LPS). El D-pinitol, a las dosis ensayadas (6 y 32 μM), tampoco alteró la expresión de NF- κB .

Con el fin de evaluar el potencial antiinflamatorio de las *AlgNVs* y el D-Pinitol, se pretrataron los macrófagos THP-1 con LPS durante 1 hora, tras lo cual se aplicó un tratamiento con *AlgNVs*, D-pinitol o PBS. Los niveles de NF- κB se determinaron 24 h después de la administración de dichos tratamientos (Figura 31B). De manera significativa, solo las mayores concentraciones de *AlgNVs* (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y D-pinitol (32 μM), inhibieron la producción de NF- κB .

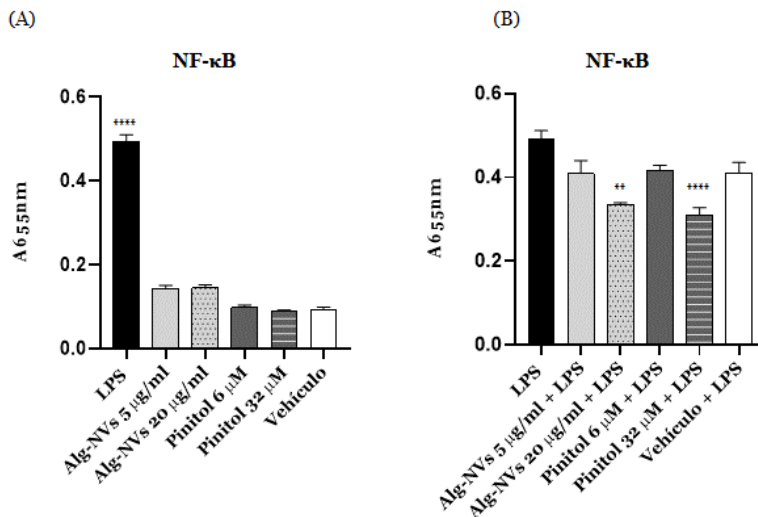


Figura 31. Las AlgNVs y el D-pinitol presentan actividad antiinflamatoria en macrófagos humanos THP-1-XBlue™ CD14 en presencia de LPS. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de AlgNVs (5 o 20 µg/mL) y con D-Pinitol (6 o 32 µM) en ausencia (A) o presencia (B) de LPS. El PBS fue utilizado como control negativo y el LPS como control positivo a inflamación. Los datos se presentan como la media ± SEM (n = 4). Se realizó One-way ANOVA como análisis estadístico utilizando GraphPad Prism8, **p < 0,01, ***p < 0,001, **** p < 0,0001.

Para el estudio de cicatrización, se empleó la línea celular de HaCaT, comúnmente utilizada en este tipo de ensayos debido a su capacidad para replicar el comportamiento de células epidérmicas (Schoop et al., 1999). Considerando su mayor efecto antiinflamatorio, se seleccionaron las concentraciones de 20 µg/mL de AlgNVs y 32 µM de D-pinitol.

Al igual que se realizó en GraNVs, se llevó a cabo un ensayo de rascado en un medio de crecimiento que contenía un 10% de SFB. Además de las AlgNVs y D-pinitol, las células HaCaT se incubaron con AlgET (20 µg/mL extracto total de fluido apoplástico de la vaina de algarroba) o con PBS. Como control negativo se usó el glucocorticoide dexametasona. A las 24 h, el porcentaje de

cierre de la herida en el tratamiento con *AlgNVs* era de $67,24 \pm 2,22\%$, mientras que con el D-pinitol era $24,61 \pm 2,53 \%$ significativamente menor que con la dexametasona ($45,11 \pm 1,28 \%$ cierre de herida) (Figura 32A, C). Transcurridas 48 h, la herida había cerrado un $98,06 \pm 1,75 \%$ con el tratamiento de *AlgNVs*. Este valor fue claramente superior al obtenido en el tratamiento con D-pinitol ($34,23 \pm 2,89 \%$) y también al efecto cicatrizante de la dexametasona ($73,99 \pm 1,45 \%$) (Figura 32B, C). Resulta interesante que el efecto del *AlgET* sobre el cierre de las heridas fue mejor que el D-pinitol pero inferior que las *AlgNVs*, lo que demuestra que el proceso de aislamiento de las *NVs* provoca que los componentes del extracto, por separado, tengan efectos diferentes.

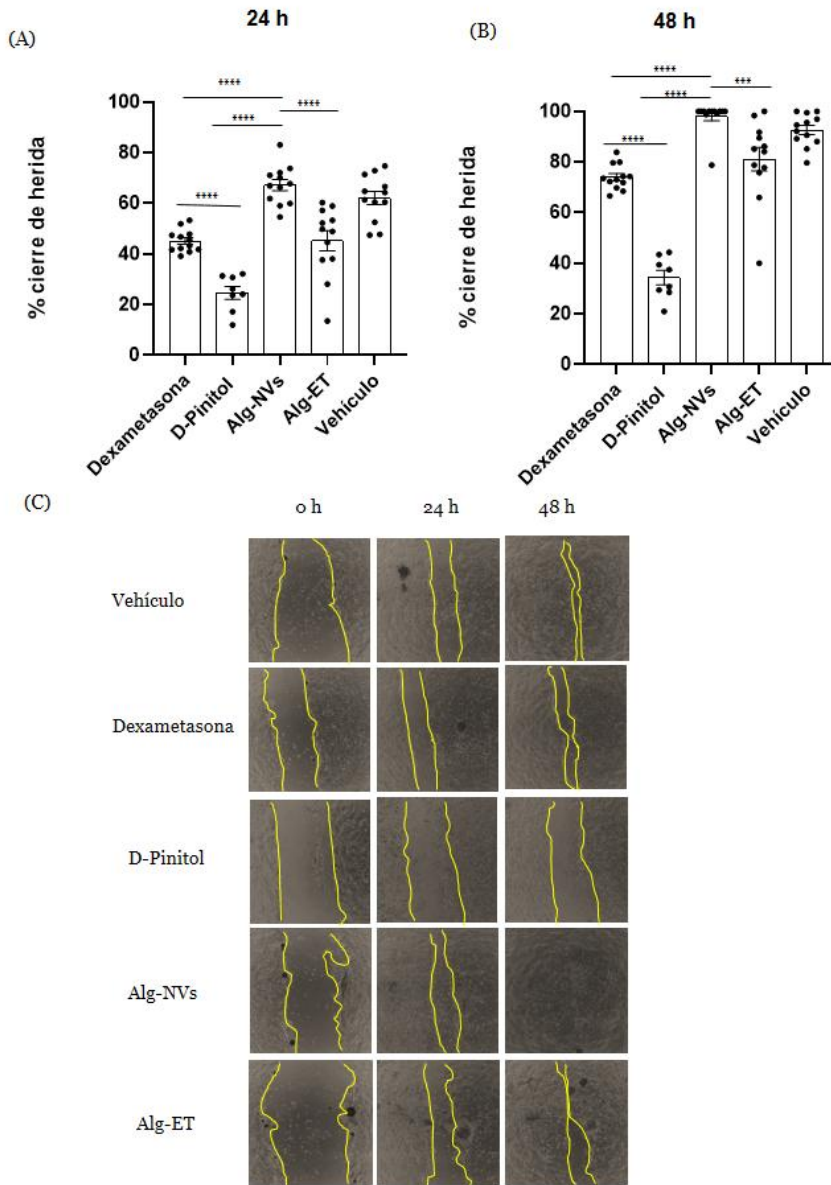


Figura 32. Las AlgNVs estimulan el cierre de heridas en queratinocitos. (A) Cuantificación del cierre de la herida 24 o 48 horas tras el raspado. (B) Fotos representativas del proceso de cicatrización a las 0, 24 o 48 horas. Los datos se presentan como la media \pm SEM ($n = 8-12$). Se realizó One-way ANOVA como análisis estadístico utilizando GraphPad Prism8, *** $p < 0.001$. **** $p < 0.0001$.

A la vista de los resultados, las *AlgNVs* han demostrado poseer propiedades antiinflamatorias, así como un efecto promotor de la cicatrización. Al compararlas con el D-pinitol se ha observado que este compuesto presenta un efecto antiinflamatorio comparable al de las NVs, pero carece de la capacidad cicatrizante que estas últimas exhiben. Este hallazgo sugiere que las NVs de algarroba podrían contener diversos compuestos bioactivos en su interior que, actuando sinérgicamente potenciarían sus efectos antiinflamatorios y cicatrizantes.

5. Conclusiones

PIMERA. Se han identificado nanovesículas similares a vesículas extracelulares en zumo de granada desarrollando un protocolo para su aislamiento y caracterización.

SEGUNDA. Las nanovesículas de zumo de granada contienen proteínas consideradas como posibles biomarcadores de las vesículas extracelulares en vegetales, tales como Patelinas, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y Tetraspanina 8.

TERCERA. Las nanovesículas del zumo de granada han mostrado efectos antiinflamatorios y la mejora del proceso de curación de heridas gracias a su capacidad antioxidante.

CUARTA. La pasteurización y la liofilización del zumo de granada disminuyen la concentración de nanovesículas y alteran el contenido proteico, especialmente de las proteínas de membrana Tetraspanina 8 y Patelina 3.

QUINTA. La internalización celular de las nanovesículas aisladas de zumos de granadas tratados es menor que las de zumos no tratados, afectando su biofuncionalidad, principalmente a los efectos antiinflamatorios y de cicatrización. No obstante, las nanovesículas de zumos tratados conservan sus propiedades antioxidantes.

SEXTA. Se han aislado nanovesículas del fluido apoplástico de la vaina de algarroba, estableciendo un protocolo específico para su aislamiento y caracterización.

SÉPTIMA. Las nanovesículas de algarroba contienen proteínas específicas de vesículas extracelulares como Anexina, *Elongation factor*, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, proteínas *Heat shock*, Malato deshidrogenasa y Tetraspanina-8.

OCTAVA. Se ha demostrado que las nanovesículas de algarroba no son citotóxicas y tienen efectos antiinflamatorios y cicatrizantes.

6. Referencias bibliográficas

- Abd El Wahab, W. M., El-Badry, A. A., Mahmoud, S. S., El-Badry, Y. A., El-Badry, M. A., & Hamdy, D. A. (2021). Ginger (*Zingiber officinale*)-derived nanoparticles in *Schistosoma mansoni* infected mice: hepatoprotective and enhancer of etiological treatment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(5), e0009423. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009423>
- Abdul-Hussein, I. F. (2018). Study of the effect of carob (*Ceratonia siliqua* l.) extract activity as antibiotic from UTI. *Al-Qadisiyah Journal for Agriculture Sciences*, 8(1), 6–12. <https://doi.org/10.33794/qjas.2018.162645>
- Adams, L. S., Seeram, N. P., Aggarwal, B. B., Takada, Y., Sand, D., & Heber, D. (2006). Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 980–985. <https://doi.org/10.1021/jf052005r>
- Adiba, A., Hssaini, L., Haddioui, A., Hamdani, A., & Razouk, R. (2022). Biochemical properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice as influenced by severe water stress. *Scientia Horticulturae*, 304, 111286. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111286>
- Adnan, A., Mushtaq, M., & Ul Islam, T. (2018). Fruit juice concentrates. In G. Rajauria & B. K. Tiwari (Eds.), *Fruit juices: Extraction, composition, quality and analysis* (pp. 217–240). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00012-6>
- Ağcam, E., Akyildiz, A., & Dündar, B. (2018). Thermal pasteurization and microbial inactivation of fruit juices. In G. Rajauria & B. K. Tiwari (Eds.), *Fruit juices: Extraction, composition, quality and analysis* (pp. 309–339). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00017-5>
- Ahn, G., Kim, Y. H., & Ahn, J. Y. (2021). Multifaceted effects of milk-exosomes (Mi-Exo) as a modulator of scar-free wound healing. *Nanoscale Advances*, 3(2), 528–537. <https://doi.org/10.1039/d0na00665c>
- Albertos, I., Jaime, I., María Diez, A., González-Arnaiz, L., & Rico, D. (2015). Carob seed peel as natural antioxidant in minced and refrigerated (4°C) Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 650–656. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.037>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alzahrani, F. A., Khan, M. I., Kameli, N., Alsaifi, E., & Riza, Y. M. (2023). Plant-derived extracellular vesicles and their exciting potential as the future of next-generation drug delivery. *Biomolecules*, 13(5), 839. <https://doi.org/10.3390/biom13050839>
- Ambrosone, A., Barbulova, A., Cappetta, E., Cillo, F., De Palma, M., Ruocco, M., & Pocsfalvi, G. (2023). Plant extracellular vesicles: current landscape and future directions. *Plants*, 12(24), 4141. <https://doi.org/10.3390/plants12244141>
- An, Q., Hüffelhoven, R., Kogel, K. H., & van Bel, A. J. E. (2006). Multivesicular bodies

participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. *Cellular Microbiology*, 8(6), 1009–1019. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00683.x>

- Andreu, Z., & Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in Immunology*, 5, 442. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442>
- Fernández-Zamudio, MA., & Bartual, J. (2020). Panorama actual del cultivo del granado: Evolución de las prácticas culturales y los costes. *Vida rural*, 12–17. www.hernandorena.com
- Atta, A. H., Atta, S. A., Khattab, M. S., El-Aziz, T. H. A., Mouneir, S. M., Ibrahim, M. A., Nasr, S. M., & Emam, S. R. (2023). *Ceratonia siliqua* pods (Carob) methanol extract alleviates doxorubicin-induced nephrotoxicity via antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic pathways in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(5), 83421–83438. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-28146-z>
- Aubin Dakia, P., Michel Agnan Combo, M., Marcel Yapó, B., & Kouakou Brou, D. (2017). Carob (*Ceratonia siliqua* L) seed tegument separation and analysis: comparison with locust bean gum hot-water-insoluble residue monosaccharides composition. *International Journal of New Technology and Research*, 3, 30–35. www.ijntr.org
- Aviram, M., Rosenblat, M., Gaitini, D., Nitecki, S., Hoffman, A., Dornfeld, L., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., Liker, H., & Hayek, T. (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition*, 23(3), 423–433. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2003.10.002>
- Azab, A. (2022). D-pinitol—active natural product from carob with notable insulin regulation. *Nutrients*, 14(7), 1453. <https://doi.org/10.3390/nu14071453>
- Bahari, H., Rezaiian, F., Goudarzi, K., Nooshan Mirmohammadali, S., Asbaghi, O., Sadat Hosseini Kolbadi, K., Naderian, M., & Hosseini, A. (2023). The effects of pomegranate consumption on lipid profile in adults: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Functional Foods*, 108, 105727. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105727>
- Baldini, N., Torreggiani, E., Roncuzzi, L., Perut, F., Zini, N., & Avnet, S. (2018). Exosome-like nanovesicles isolated from *citrus limon* L. exert antioxidative effect. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 19(11), 877–885. <https://doi.org/10.2174/1389201019666181017115755>
- Bampidis, V., Azimonti, G., Bastos, M. de L., Christensen, H., Dusemund, B., Durjava, M. F., Kouba, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Marcon, F., Mayo, B., Pechová, A., Petkova, M., Ramos, F., Sanz, Y., Villa, R. E., Woutersen, R., Brantom, P., Brozzi, R., ... Amaduzzi, A. (2022). Safety and efficacy of a feed additive consisting of locust bean gum for all animal species (*Dupont Nutrition and Health*). *EFSA Journal*, 20(8), e07435 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7435>
- Banerjee, N., Kim, H., Talcott, S., & Mertens-Talcott, S. (2013). Pomegranate polyphenolics suppressed azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci and inflammation: Possible role of miR-126/VCAM-1 and miR-126/PI3K/ AKT/mTOR. *Carcinogenesis*, 34(12), 2814–2822. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt295>

- Bar-Ya'akov, I., Tian, L., Amir, R., & Holland, D. (2019). Primary metabolites, anthocyanins, and hydrolyzable tannins in the pomegranate fruit. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 620. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00620>
- Beghè, D., Fabbri, A., & Ganino, T. (2016). Pomegranate: Botany, histology, and genetic resources. In A. Caligiani (Ed.), *Pomegranate* (pp. 1–26). Nova Science Publishers.
- Benedetti, G., Zabini, F., Tagliavento, L., Meneguzzo, F., Calderone, V., & Testai, L. (2023). An overview of the health benefits, extraction methods and improving the properties of pomegranate. *Antioxidants*, *12*(7), 1351. <https://doi.org/10.3390/antiox12071351>
- Bengoechea, C., Romero, A., Villanueva, A., Moreno, G., Alaiz, M., Millán, F., Guerrero, A., & Puppo, M. C. (2008). Composition and structure of carob (*Ceratonia siliqua* L) germ proteins. *Food Chemistry*, *107*(2), 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.069>
- Benjamin, O., & Gamrasni, D. (2020). Microbial, nutritional, and organoleptic quality of pomegranate juice following high-pressure homogenization and low-temperature pasteurization. *Journal of Food Science*, *85*(3), 592–599. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15032>
- Berberich, A. J., & Hegele, R. A. (2022). A modern approach to dyslipidemia. *Endocrine Reviews*, *43*(4), 611–653. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnab037>
- Berger, E., Colosetti, P., Jalabert, A., Meugnier, E., Wiklander, O. P. B., Jouhet, J., Errazurig-Cerda, E., Chanon, S., Gupta, D., Rautureau, G. J. P., Geloën, A., El-Andalousi, S., Panthu, B., Rieusset, J., & Rome, S. (2020). Use of nanovesicles from orange juice to reverse diet-induced gut modifications in diet-induced obese mice. *Molecular Therapy Methods and Clinical Development*, *18*, 880–892. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.08.009>
- Boateng, J., Verghese, M., Shackelford, L., Walker, L. T., Khatiwada, J., Ogutu, S., Williams, D. S., Jones, J., Guyton, M., Asiamah, D., Henderson, F., Grant, L., DeBruce, M., Johnson, A., Washington, S., & Chawan, C. B. (2007). Selected fruits reduce azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats. *Food and Chemical Toxicology*, *45*(5), 725–732. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.10.019>
- Boccia, E., Alfieri, M., Belvedere, R., Santoro, V., Colella, M., Del Gaudio, P., Moros, M., Dal Piaz, F., Petrella, A., Leone, A., & Ambrosone, A. (2022). Plant hairy roots for the production of extracellular vesicles with antitumor bioactivity. *Communications Biology*, *5*, 848. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03781-3>
- Boger, K. D., Sheridan, A. E., Ziegler, A. L., & Blikslager, A. T. (2023). Mechanisms and modeling of wound repair in the intestinal epithelium. *Tissue Barriers*, *11*(2), 164–178. <https://doi.org/10.1080/21688370.2022.2087454>
- Bruno, S. P., Paolini, A., D’Oria, V., Sarra, A., Sennato, S., Bordi, F., & Masotti, A. (2021). Extracellular Vesicles Derived From *Citrus sinensis* Modulate Inflammatory Genes and Tight Junctions in a Human Model of Intestinal Epithelium. *Frontiers in Nutrition*, *8*, 778998. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.778998>
- Buzas, E. I. (2022). Opportunities and challenges in studying the extracellular vesicle corona. *Nature Cell Biology*, *24*(9), 1322–1325. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00983-z>
- Buzas, E. I. (2023). The roles of extracellular vesicles in the immune system. *Nature Reviews*

Immunology, 23(4), 236–250. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00763-8>

- Cai, Q., He, B., & Jin, H. (2019). A safe ride in extracellular vesicles – small RNA trafficking between plant hosts and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 52, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.09.001>
- Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F. M., Palmquist, J., Huang, S. D, & Jin, H. (2018). Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*, 360(6393), 1126–1129. <https://doi.org/10.1126/science.aar4142>
- Cairati, E. (2013). Historia cultural del algarrobo, desde la cuenca del Mediterráneo hasta la Costa Norte de Perú. *Altre Modernità: Rivista di studi letterari e culturali*, 186–204.
- Cao, M., Yan, H., Han, X., Weng, L., Wei, Q., Sun, X., Lu, W., Wei, Q., Ye, J., Cai, X., Hu, C., Yin, X., & Cao, P. (2019). Ginseng-derived nanoparticles alter macrophage polarization to inhibit melanoma growth. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7, 326. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0817-4>
- Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Piovesana, S., Samperi, R., & Laganà, A. (2013). Proteome investigation of the non-model plant pomegranate (*Punica granatum* L). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(29), 9301–9309. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7382-3>
- Cardona Arenas, B. (2013). *Envejecer en el antiguo Egipto: Una perspectiva médica, farmacéutica y cultural* [Tesis doctoral, Universitat de Barcelona]. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). <http://www.tdx.cat/handle/10803/113571>
- Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bøhn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willett, W. C., Phillips, K. M., Jacobs, D. R., & Blomhoff, R. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, 9, 3. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-3>
- Castelli, G., Logozzi, M., Mizzi, D., Di Raimo, R., Cerio, A., Dolo, V., Pasquini, L., Screnci, M., Ottone, T., Testa, U., Fais, S., & Pelosi, E. (2023). Ex vivo anti-leukemic effect of exosome-like grapefruit-derived nanovesicles from organic farming—The potential role of ascorbic acid. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21). <https://doi.org/10.3390/ijms242115663>
- Chandra, R., Babu, K. D., Jadhav, V. T., & da Silva, J. A. T. (2010). Origin, history and domestication of pomegranate. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 4, 1–6.
- Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, 23, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
- Chaves, F. M., Pavan, I. C. B., da Silva, L. G. S., de Freitas, L. B., Rostagno, M. A., Antunes, A. E. C., Bezerra, R. M. N., & Simabuco, F. M. (2020). Pomegranate juice and peel extracts are able to inhibit proliferation, migration and colony formation of prostate cancer cell lines and modulate the Akt/mTOR/S6K signaling pathway. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75, 54–62. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00776-0>
- Chaya, T., Banerjee, A., Rutter, B. D., Adekanye, D., Ross, J., Hu, G., Innes, R. W., & Caplan, J. L. (2024). The extracellular vesicle proteomes of *Sorghum bicolor* and *Arabidopsis*

- thaliana* are partially conserved. *Plant Physiology*, 194(3), 1481–1497. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad644>
- Chen, Q., Li, Q., Liang, Y., Zu, M., Chen, N., Canup, B. S. B., Luo, L., Wang, C., Zeng, L., & Xiao, B. (2022). Natural exosome-like nanovesicles from edible tea flowers suppress metastatic breast cancer via ROS generation and microbiota modulation. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(2), 907–923. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.08.016>
- Chen, X., Zhou, Y., & Yu, J. (2019). Exosome-like Nanoparticles from Ginger Rhizomes Inhibited NLRP3 Inflammasome Activation. *Molecular Pharmaceutics*, 16(6), 2690–2699. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00246>
- Cho, E. G., Choi, S. Y., Kim, H., Choi, E. J., Lee, E. J., Park, P. J., Ko, J., Kim, K. P., & Baek, H. S. (2021). *Panax ginseng*-derived extracellular vesicles facilitate anti-senescence effects in human skin cells: An eco-friendly and sustainable way to use ginseng substances. *Cells*, 10(3), 486. <https://doi.org/10.3390/cells10030486>
- Colella, A. P., Prakash, A., & Miklavcic, J. J. (2023). Homogenization and thermal processing reduce the concentration of extracellular vesicles in bovine milk. *Food Science and Nutrition*, 12(1), 131–140. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3749>
- Corvigno, S., Liu, Y., Bayraktar, E., Stur, E., Bayram, N. N., Ahumada, A. L., Nagaraju, S., Rodriguez-Aguayo, C., Chen, H., Vu, T. C., Wen, Y., Liang, H., Zhao, L., Lee, S., Lopez-Berestein, G., & Sood, A. K. (2024). Enhanced plant-derived vesicles for nucleotide delivery for cancer therapy. *NPJ Precision Oncology*, 8(1), 86. <https://doi.org/10.1038/s41698-024-00556-3>
- Cui, W. W., Ye, C., Wang, K. X., Yang, X., Zhu, P. Y., Hu, K., Lan, T., Huang, L. Y., Wang, W., Gu, B., Yan, C., Ma, P., Qi, S. H., & Luo, L. (2022). *Momordica charantia*-derived extracellular vesicles-like nanovesicles protect cardiomyocytes against radiation injury via attenuating DNA damage and mitochondria dysfunction. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9, 864188. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.864188>
- Custódio, L., Fernandes, E., Escapa, A. L., Fajardo, A., Aligué, R., Alberício, F., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., & Romano, A. (2011). Antioxidant and cytotoxic activities of carob tree fruit pulps are strongly influenced by gender and cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7005–7012. <https://doi.org/10.1021/jf200838f>
- Custódio, Luísa, Escapa, A. L., Fernandes, E., Fajardo, A., Aligué, R., Alberício, F., Neng, N., Nogueira, J. M. F., & Romano, A. (2011). Phytochemical profile, antioxidant and cytotoxic activities of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) germ flour extracts. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(1), 78–84. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0214-8>
- Cvjetkovic, A., Jang, S. C., Konečná, B., Höög, J. L., Sihlbom, C., Lässer, C., & Lötval, J. (2016). Detailed analysis of protein topology of extracellular vesicles-evidence of unconventional membrane protein orientation. *Scientific reports*, 6, 36338. <https://doi.org/10.1038/srep36338>
- Dahmani, W., Elaoui, N., Abousalim, A., Akissi, Z. L. E., Legssyer, A., Ziyat, A., & Sahpaz, S. (2023). Exploring carob (*Ceratonia siliqua* L.): A comprehensive assessment of its characteristics, ethnomedicinal uses, phytochemical aspects, and pharmacological activities. *Plants*, 12(18), 3303. <https://doi.org/10.3390/plants12183303>
- Dakia, P. A., Blecker, C., Robert, C., Wathelet, B., & Paquot, M. (2008). Composition and

- physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocolloids*, 22(5), 807–818. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.03.007>
- Dakia, P. A., Wathelet, B., & Paquot, M. (2007). Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. *Food Chemistry*, 102(4), 1368–1374. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.059>
- Danesi, F., & Ferguson, L. R. (2017). Could pomegranate juice help in the control of inflammatory diseases? *Nutrients*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/nu9090958>
- Davidson, M. H., Maki, K. C., Dicklin, M. R., Feinstein, S. B., Witchger, M. S., Bell, M., McGuire, D. K., Provost, J. C., Liker, H., & Aviram, M. (2009). Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease. *American Journal of Cardiology*, 104(7), 936–942. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2009.05.037>
- de la Canal, L., & Pinedo, M. (2018). Extracellular vesicles: A missing component in plant cell wall remodeling. *Journal of Experimental Botany*, 69(20), 4655–4658. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery255>
- De La Fuente-Fernández, M., González-Hedström, D., Amor, S., Tejera-Muñoz, A., Fernández, N., Monge, L., Almodóvar, P., Andrés-Delgado, L., Santamaría, L., Prodanov, M., Inarejos-García, A. M., García-Villalón, A. L., & Granada, M. (2020). Supplementation with a carob (*Ceratonia siliqua* L.) fruit extract attenuates the cardiometabolic alterations associated with metabolic syndrome in mice. *Antioxidants*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/antiox9040339>
- De Robertis, M., Sarra, A., D'oria, V., Mura, F., Bordi, F., Postorino, P., & Fratantonio, D. (2020). Blueberry-Derived Exosome-Like Nanoparticles Counter the Response to TNF- α -Induced Change on Gene Expression in EA.hy926 Cells. *Biomolecules*, 10(5), 742. <https://doi.org/10.3390/biom10050742>
- Deng, Z., Rong, Y., Teng, Y., Mu, J., Zhuang, X., Tseng, M., Samykutty, A., Zhang, L., Yan, J., Miller, D., Suttles, J., & Zhang, H. G. (2017). Broccoli-derived nanoparticle inhibits mouse colitis by activating dendritic cell AMP-activated protein kinase. *Molecular Therapy*, 25(7), 1641–1654. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.01.025>
- Di Gioia, S., Hossain, M. N., & Conese, M. (2020). Biological properties and therapeutic effects of plant-derived nanovesicles. *Open Medicine*, 15(1), 1096–1122. <https://doi.org/10.1515/med-2020-0160>
- Díaz-Mula, H. M., Tomás-Barberán, F. A., & García-Villalba, R. (2019). Pomegranate fruit and juice (cv. Mollar), rich in ellagitannins and anthocyanins, also provide a significant content of a wide range of proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(33), 9160–9167. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07155>
- Doyle, L. M., & Wang, M. Z. (2019). Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*, 8(7), 29–39. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- Durazzo, A., Turfani, V., Narducci, V., Azzini, E., Maiani, G., & Carcea, M. (2014). Nutritional characterisation and bioactive components of commercial carobs flours. *Food Chemistry*, 153, 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.045>

- Ekanayake, G., Piibor, J., Midekessa, G., Godakumara, K., & Dissanayake, K. (2024). Systematic characterization of extracellular vesicles from potato (*Solanum tuberosum* cv. Laura) roots and peels: biophysical properties and proteomic profiling. *Frontiers in Plant Science*, *15*, 1477614. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1477614>
- El Sayed, N. S., Abidar, S., Nhiri, M., Hritcu, L., & Ibrahim, W. W. (2023). Aqueous extract of *Ceratonia siliqua* L. leaves elicits antioxidant, anti-inflammatory, and AChE inhibiting effects in amyloid- β 42-induced cognitive deficit mice: Role of α 7-nAChR in modulating Jak2/PI3K/Akt/GSK-3 β / β -catenin cascade. *Phytotherapy Research*, *37*(6), 2437–2453. <https://doi.org/10.1002/ptr.7766>
- ElSayed, N. A., Aleppo, G., Aroda, V. R., Bannuru, R. R., Brown, F. M., Bruemmer, D., Collins, B. S., Hilliard, M. E., Isaacs, D., Johnson, E. L., Kahan, S., Khunti, K., Leon, J., Lyons, S. K., Perry, M. L., Prahalad, P., Pratley, R. E., Seley, J. J., Stanton, R. C., Gabbay, R. A., ... on behalf of the American Diabetes Association (2023). 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of care in diabetes-2023. *Diabetes care*, *46*(Suppl 1), S19–S40. <https://doi.org/10.2337/dc23-S002>
- Fahmy, H., Hegazi, N., El-Shamy, S., & Farag, M. A. (2020). Pomegranate juice as a functional food: A comprehensive review of its polyphenols, therapeutic merits, and recent patents. *Food and Function*, *11*(7), 5768–5781. <https://doi.org/10.1039/d0fo01251c>
- Feng, H., Yue, Y., Zhang, Y., Liang, J., Liu, L., Wang, Q., Feng, Q., & Zhao, H. (2024). Plant-derived exosome-like nanoparticles: emerging nanosystems for enhanced tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, *19*, 1189–1204. <https://doi.org/10.2147/IJN.S448905>
- Fernandes, L., Pereira, J. A., Lopéz-Cortés, I., Salazar, D. M., González-Álvarez, J., & Ramalhosa, E. (2017). Physicochemical composition and antioxidant activity of several pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *European Food Research and Technology*, *243*(10), 1799–1814. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2884-4>
- Fernandes, L., Pereira, J. A., Lopéz-Cortés, I., Salazar, D. M., Ramalhosa, E., & Casal, S. (2015). Fatty acid, vitamin E and sterols composition of seed oils from nine different pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*, *39*, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.11.006>
- Fujita, D., Arai, T., Komori, H., Shirasaki, Y., Wakayama, T., Nakanishi, T., & Tamai, I. (2018). Apple-derived nanoparticles modulate expression of organic-anion-transporting polypeptide (OATP) 2B1 in caco-2 cells. *Molecular Pharmaceutics*, *15*(12), 5772–5780. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00921>
- Galindo, F. G., Sjöholm, I., Rasmusson, A. G., Widell, S., & Kaack, K. (2007). Plant stress physiology: Opportunities and challenges for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *47*(8), 749–763. <https://doi.org/10.1080/10408390601062211>
- Gao, C., Zhou, Y., Chen, Z., Li, H., Xiao, Y., Hao, W., Zhu, Y., Vong, C. T., Farag, M. A., Wang, Y., & Wang, S. (2022). Turmeric-derived nanovesicles as novel nanobiologics for targeted therapy of ulcerative colitis. *Theranostics*, *12*(13), 5596–5614. <https://doi.org/10.7150/thno.73650>
- Gao, Y., Zhang, M., Wu, T., Xu, M., Cai, H., & Zhang, Z. (2015). Effects of D-Pinitol on insulin

- resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in type 2 diabetes mellitus rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(26), 6019–6026. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01238>
- Garaeva, L., Kamyshinsky, R., Kil, Y., Varfolomeeva, E., Verlov, N., Komarova, E., Garmay, Y., Landa, S., Burdakov, V., Myasnikov, A., Vinnikov, I. A., Margulis, B., Guzhova, I., Kagansky, A., Konevega, A. L., & Shtam, T. (2021). Delivery of functional exogenous proteins by plant-derived vesicles to human cells *in vitro*. *Scientific Reports*, 11(1), 6489. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85833-y>
- Garrido, S. G. (2004). La granada, símbolo de reyes y de la monarquía española. *Boletín de Arte*, 25, 127–148. <https://doi.org/10.24310/BOLARTE.2004.VOI25.4612>
- Garzo, E., Sánchez-López, C. M., Fereres, A., Soler, C., Marcilla, A., & Pérez-Bermúdez, P. (2023). Isolation of extracellular vesicles from phloem sap by size exclusion chromatography. *Current Protocols*, 3(10), e903. <https://doi.org/10.1002/cpz1.903>
- Geethan, P. K. M. A., & Prince, P. S. M. (2008). Antihyperlipidemic effect of D-pinitol on streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 22(4), 220–224. <https://doi.org/10.1002/jbt.20218>
- Gelibter, S., Marostica, G., Mandelli, A., Siciliani, S., Podini, P., Finardi, A., & Furlan, R. (2022). The impact of storage on extracellular vesicles: A systematic study. *Journal of Extracellular Vesicles*, 11(2), e12162. <https://doi.org/10.1002/jev2.12162>
- Gioxari, A., Amerikanou, C., Nestoridi, I., Gourgari, E., Pratsinis, H., Kalogeropoulos, N., Andrikopoulos, N. K., & Kaliora, A. C. (2022). Carob: A sustainable opportunity for metabolic health. *Foods*, 11(14), 2154. <https://doi.org/10.3390/foods11142154>
- Gonelimali, F. D., Lin, J., Miao, W., Xuan, J., Charles, F., Chen, M., & Hatab, S. R. (2018). Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1639. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01639>
- Goulas, V., Stylos, E., Chatziathanasiadou, M. V., Mavromoustakos, T., & Tzakos, A. G. (2016). Functional components of carob fruit: Linking the chemical and biological space. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), 1875. <https://doi.org/10.3390/ijms17111875>
- Guillot, A. J., Jornet-Mollá, E., Landsberg, N., Milián-Guimerá, C., Montesinos, M. C., Garrigues, T. M., & Melero, A. (2021). Cyanocobalamin ultraflexible lipid vesicles: Characterization and in vitro evaluation of drug-skin depth profiles. *Pharmaceutics*, 13(3), 418. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030418>
- Haber, B. (2002). Carob fiber benefits and applications. *Cereal Foods World*, 47(8), 365–369.
- Halperin, W., & Jensen, W. A. (1967). Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. *Journal of Ultrastructure Research*, 18(3), 428–443. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(67\)80128-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(67)80128-X)
- Han, J. M., Song, H. Y., Lim, S. T., Kim, K. Il, Seo, H. S., & Byun, E. B. (2021). Immunostimulatory potential of extracellular vesicles isolated from an edible plant, *Petasites japonicus*, via the induction of murine dendritic cell maturation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10634. <https://doi.org/10.3390/ijms221910634>

- Haque, M. F., El-Nashar, H. A. S., Akbor, M. S., Alfaifi, M., Bappi, M. H., Chowdhury, A. K., Hossain, M. K., El-Shazly, M., Albayouk, T., Saleh, N., & Islam, M. T. (2024). Anti-inflammatory activity of d-pinitol possibly through inhibiting COX-2 enzyme: *in vivo* and *in silico* studies. *Frontiers in Chemistry*, *12*, 1366844. <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1366844>
- He, B., Cai, Q., Qiao, L., Huang, C. Y., Wang, S., Miao, W., Ha, T., Wang, Y., & Jin, H. (2021). RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles. *Nature Plants*, *7*(3), 342–352. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00863-8>
- Holland, D., Hatib, K., & Bar-Yàakov, I. (2009). Pomegranate: Botany, horticulture, and breeding. *Horticultural Reviews*, *35*, 127–191. <https://doi.org/10.1002/9780470593776.ch2>
- Hossain, M. N., De Leo, V., Tamborra, R., Laselva, O., Ingrosso, C., Daniello, V., Catucci, L., Losito, I., Sollitto, F., Loizzi, D., Conese, M., & Di Gioia, S. (2022). Characterization of anti-proliferative and anti-oxidant effects of nano-sized vesicles from *Brassica oleracea* L. (Broccoli). *Scientific Reports*, *12*(1), 14362. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17899-1>
- Hsouna, A. Ben, Trigui, M., Mansour, R. Ben, Jarraya, R. M., Damak, M., & Jaoua, S. (2011). Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, *148*(1), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.028>
- Husari, A., Hashem, Y., Bitar, H., Dbaibo, G., Zaatari, G., & El Sabban, M. (2016). Antioxidant activity of pomegranate juice reduces emphysematous changes and injury secondary to cigarette smoke in an animal model and human alveolar cells. *International Journal of COPD*, *11*, 227–237. <https://doi.org/10.2147/COPD.S97027>
- Ibrahim, A. H., Abd El-Baky, R. M., Desoukey, S. Y., Abd-Lateff, A., & Kamel, M. S. (2013). Bacterial growth inhibitory effect of *Ceratonia siliqua* L. plant extracts alone and in combination with some antimicrobial agents. *Journal of Advanced Biotechnology and Bioengineering*, *1*, 3–13. <https://doi.org/10.12970/2311-1755.2013.01.01.1>
- Iftikhar, M., Iftikhar, A., Zhang, H., Gong, L., & Wang, J. (2020). Transport, metabolism and remedial potential of functional food extracts (FFE) in Caco-2 cells monolayer: A review. *Food Research International*, *136*, 109240. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109240>
- Ikram, A., Khalid, W., Wajeaha Zafar, K. ul, Ali, A., Afzal, M. F., Aziz, A., Faiz ul Rasool, I., Al-Farga, A., Aqlan, F., & Koraqi, H. (2023). Nutritional, biochemical, and clinical applications of carob: A review. *Food Science and Nutrition*, *11*(7), 3641–3654. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3367>
- Ipinmoroti, A. O., Turner, J., Bellenger, E. J., Crenshaw, B. J., Xu, J., Reeves, C., Ajayi, O., Li, T., & Matthews, Q. L. (2023). Characterization of cannabis strain-plant-derived extracellular vesicles as potential biomarkers. *Protoplasma*, *260*(6), 1603–1606. <https://doi.org/10.1007/s00709-023-01870-6>
- Jahnke, K., & Stauffer, O. (2024). Membranes on the move: The functional role of the extracellular vesicle membrane for contact-dependent cellular signalling. *Journal of Extracellular Vesicles*, *13*(4), e12436. <https://doi.org/10.1002/jev2.12436>

- Jankovičová, J., Sečová, P., Michalková, K., & Antalíková, J. (2020). Tetraspanins, more than markers of extracellular vesicles in reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(20), 7568. <https://doi.org/10.3390/ijms21207568>
- Ju, S., Mu, J., Dokland, T., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Xiang, X., Deng, Z. Bin, Wang, B., Zhang, L., Roth, M., Welti, R., Mobley, J., Jun, Y., Miller, D., & Zhang, H. G. (2013). Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis. *Molecular Therapy*, *21*(7), 1345–1357. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.64>
- Juneja, K., Mishra, R., Chauhan, S., Gupta, S., Roy, P., & Sircar, D. (2020). Metabolite profiling and wound-healing activity of *Boerhavia diffusa* leaf extracts using *in vitro* and *in vivo* models. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, *10*(1), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2019.02.002>
- Kalaycıoğlu, Z., & Erim, F. B. (2017). Total phenolic contents, antioxidant activities, and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide. *Food Chemistry*, *221*, 496–507. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.084>
- Kang, H., Hu, Q., Yang, Y., Huang, G., Li, J., Zhao, X., Zhu, L., Su, H., Tang, W., & Wan, M. (2024). Urolithin A's role in alleviating severe acute pancreatitis via endoplasmic reticulum-mitochondrial calcium channel modulation. *ACS Nano*, *18*(21), 13885–13898. <https://doi.org/10.1021/acsnano.4c03044>
- Kavvoura, D. A., Stefanakis, M. K., Kletsas, D., Katerinopoulos, H. E., & Pratsinis, H. (2023). Biological Activities of *Ceratonia siliqua* pod and seed extracts: A comparative analysis of two cretan cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(15), 12104. <https://doi.org/10.3390/ijms241512104>
- Kawamura, Y. (2016). Carob Bean Gum, 82nd JECFA—Chemical and Technical Assessment (CTA). *JECFA-Chemical and Technical Assessment*, 2016.
- Khorasaniha, R., Olof, H., Voisin, A., Armstrong, K., Wine, E., Vasanthan, T., & Armstrong, H. (2023). Diversity of fibers in common foods: Key to advancing dietary research. *Food Hydrocolloids*, *139*, 108495. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108495>
- Kim, D. K., & Rhee, W. J. (2021). Antioxidative effects of carrot-derived nanovesicles in cardiomyoblast and neuroblastoma cells. *Pharmaceutics*, *13*(8), 1203. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081203>
- Kim, J., Zhang, S., Zhu, Y., Wang, R., & Wang, J. (2023). Amelioration of colitis progression by ginseng-derived exosome-like nanoparticles through suppression of inflammatory cytokines. *Journal of Ginseng Research*, *47*(5), 627–637. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2023.01.004>
- Kim, J., Zhu, Y., Chen, S., Wang, D., Zhang, S., Xia, J., Li, S., Qiu, Q., Lee, H., & Wang, J. (2023). Anti-glioma effect of ginseng-derived exosomes-like nanoparticles by active blood–brain-barrier penetration and tumor microenvironment modulation. *Journal of Nanobiotechnology*, *21*(1), 253. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02006-x>
- Kim, M. K., Choi, Y. C., Cho, S. H., Choi, J. S., & Cho, Y. W. (2021). The antioxidant effect of small extracellular vesicles derived from *Aloe vera* peels for wound healing. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *18*(4), 561–571. <https://doi.org/10.1007/s13770-021-00367-8>

- Kim, M., & Park, J. H. (2022). Isolation of *Aloe saponaria*-derived extracellular vesicles and investigation of their potential for chronic wound healing. *Pharmaceutics*, *14*(9), 1905. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091905>
- Kleinjan, M., Van Herwijnen, M. J. C., Libregts, S. F. W. M., Van Neerven, R. J., Feitsma, A. L., & Wauben, M. H. M. (2021). Regular industrial processing of bovine milk impacts the integrity and molecular composition of extracellular vesicles. *Journal of Nutrition*, *151*(6), 1416–1425. <https://doi.org/10.1093/jn/nxab031>
- Klenow, S., Gleib, M., Haber, B., Owen, R., & Pool-Zobel, B. L. (2008). Carob fibre compounds modulate parameters of cell growth differently in human HT29 colon adenocarcinoma cells than in LT97 colon adenoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(4), 1389–1397. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.003>
- Klenow, S., & Gleib, M. (2009). New insight into the influence of carob extract and gallic acid on hemin induced modulation of HT29 cell growth parameters. *Toxicology in Vitro*, *23*(6), 1055–1061. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.06.006>
- Klenow, S., Jahns, F., Pool-Zobel, B. L., & Gleib, M. (2009). Does an extract of carob (*Ceratonia siliqua* L.) have chemopreventive potential related to oxidative stress and drug metabolism in human colon cells?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(7), 2999–3004. <https://doi.org/10.1021/jf802872b>
- Krueger, D. A. (2012). Composition of pomegranate juice. *Journal of AOAC International*, *95*(1), 163–168. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-178>
- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, *24*, e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
- Laaraj, S., Salmaoui, S., Addi, M., El-Rhouttais, C., Tikent, A., Elbouzidi, A., Taibi, M., Hano, C., Noutfia, Y., & Elfazazi, K. (2023). Carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed constituents: A comprehensive review of composition, chemical profile, and diverse applications. *Journal of Food Quality*, *2023*. <https://doi.org/10.1155/2023/3438179>
- Lakkab, I., El Hajaji, H., Lachkar, N., Lefter, R., Ciobica, A., El Bali, B., & Lachkar, M. (2019). *Ceratonia siliqua* L. seed peels: Phytochemical profile, antioxidant activity, and effect on mood disorders. *Journal of Functional Foods*, *54*, 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.01.041>
- Lakkab, I., Ouakil, A., El Hajaji, H., Lachkar, N., Lefter, R., Ciobica, A., El Bali, B., Dobrin, R., Hritcu, L. D., & Lachkar, M. (2022). Carob seed peels effect on cognitive impairment and oxidative stress status in methionine-induced mice models of schizophrenia. *Brain Sciences*, *12*(12), 1660. <https://doi.org/10.3390/brainsci12121660>
- Latella, R., Calzoni, E., Urbanelli, L., Cerrotti, G., Porcellati, S., Emiliani, C., Buratta, S., & Tancini, B. (2024). Isolation of extracellular vesicles from agri-food wastes: A novel perspective in the valorization of agri-food wastes and by-products. *Foods*, *13*(10), 1492. <https://doi.org/10.3390/foods13101492>
- Lee, S. T., Wu, Y. L., Chien, L. H., Chen, S. T., Tzeng, Y. K., & Wu, T. F. (2012). Proteomic exploration of the impacts of pomegranate fruit juice on the global gene expression of prostate cancer cell. *Proteomics*, *12*(21), 3251–3262. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200084>

- Lei, C., Mu, J., Teng, Y., He, L., Xu, F., Zhang, X., Sundaram, K., Kumar, A., Sriwastva, M. K., Lawrenz, M. B., Zhang, L., Yan, J., Feng, W., McClain, C. J., Zhang, X., & Zhang, H. G. (2020). Lemon Exosome-like Nanoparticles-Manipulated Probiotics Protect Mice from *C. diff* Infection. *iScience*, 23(10), 101571. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101571>
- Lei, C., Teng, Y., He, L., Sayed, M., Mu, J., Xu, F., Zhang, X., Kumar, A., Sundaram, K., Sriwastva, M. K., Zhang, L., Chen, S. yu, Feng, W., Zhang, S., Yan, J., Park, J. W., Merchant, M. L., Zhang, X., & Zhang, H. G. (2021). Lemon exosome-like nanoparticles enhance stress survival of gut bacteria by RNase P-mediated specific tRNA decay. *iScience*, 24(6), 102511. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102511>
- Leng, Y., Yang, L., Zhu, H., Li, D., Pan, S., & Yuan, F. (2023). Stability of blueberry extracellular vesicles and their gene regulation effects in intestinal Caco-2 cells. *Biomolecules*, 13(9), 1412. <https://doi.org/10.3390/biom13091412>
- Li, A., Li, D., Gu, Y., Liu, R., Tang, X., Zhao, Y., Qi, F., Wei, J., & Liu, J. (2023). Plant-derived nanovesicles: Further exploration of biomedical function and application potential. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 13(8), 3300–3320. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.12.022>
- Li, S., Ye, Z., Zhao, L., Yao, Y., & Zhou, Z. (2023). Evaluation of antioxidant activity and drug delivery potential of cell-derived extracellular vesicles from *Citrus reticulata* Blanco cv. 'Dahongpao'. *Antioxidants*, 12(9), 1706. <https://doi.org/10.3390/antiox12091706>
- Lian, M. Q., Chng, W. H., Liang, J., Yeo, H. Q., Lee, C. K., Belaid, M., Tollemeto, M., Wacker, M. G., Czarny, B., & Pastorin, G. (2022). Plant-derived extracellular vesicles: Recent advancements and current challenges on their use for biomedical applications. *Journal of Extracellular Vesicles*, 11(12), e12283. <https://doi.org/10.1002/jev2.12283>
- Liu, B., Li, X., Yu, H., Shi, X., Zhou, Y., Alvarez, S., Naldrett, M. J., Kachman, S. D., Ro, S. H., Sun, X., Chung, S., Jing, L., & Yu, J. (2021). Therapeutic potential of garlic chive-derived vesicle-like nanoparticles in NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory diseases. *Theranostics*, 11(19), 9311–9330. <https://doi.org/10.7150/thno.60265>
- Liu, C., Yan, X., Zhang, Y., Yang, M., Ma, Y., Zhang, Y., Xu, Q., Tu, K., & Zhang, M. (2022). Oral administration of turmeric-derived exosome-like nanovesicles with anti-inflammatory and pro-resolving bioactions for murine colitis therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 206. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01421-w>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Liu, Y. J., & Wang, C. (2023). A review of the regulatory mechanisms of extracellular vesicles-mediated intercellular communication. *Cell Communication and Signaling*, 21(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01103-6>
- Lo, K. J., Wang, M. H., Ho, C. T., & Pan, M. H. (2024). Plant-derived extracellular vesicles: a new revolutionization of modern healthy diets and biomedical applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(6), 2853–2878. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c06867>
- López de las Hazas, M. C., Tomé-Carneiro, J., del Pozo-Acebo, L., del Saz-Lara, A., Chapado, L. A., Balaguer, L., Rojo, E., Espín, J. C., Crespo, C., Moreno, D. A., García-Viguera, C.,

- Ordovás, J. M., Visioli, F., & Dávalos, A. (2023). Therapeutic potential of plant-derived extracellular vesicles as nanocarriers for exogenous miRNAs. *Pharmacological Research*, 198, 106999. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106999>
- Lorca, C., Laparra, M., Céspedes, M. V., Casaní, L., Florit, S., Jové, M., Mota-Martorell, N., Vilella, E., Gallart-Palau, X., & Serra, A. (2022). Industrial by-products as a novel circular source of biocompatible extracellular vesicles. *Advanced Functional Materials*, 32(29), 2202700. <https://doi.org/10.1002/adfm.202202700>
- Lv, Y., Li, M., Weng, L., Huang, H., Mao, Y., Yang, D. A., Wei, Q., Zhao, M., Wei, Q., Rui, K., Han, X., Fan, W., Cai, X., Cao, P., & Cao, M. (2023). Ginseng-derived nanoparticles reprogram macrophages to regulate arginase-1 release for ameliorating T cell exhaustion in tumor microenvironment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 42(1), 322. <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02888-7>
- Lynn, A., Hamadeh, H., Leung, W. C., Russell, J. M., & Barker, M. E. (2012). Effects of pomegranate juice supplementation on pulse wave velocity and blood pressure in healthy young and middle-aged men and women. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(3), 309–314. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0295-z>
- Mach, F., Baigent, C., Catapano, A. L., Koskinas, K. C., Casula, M., Badimon, L., Chapman, M. J., De Backer, G. G., Delgado, V., Ference, B. A., Graham, I. M., Halliday, A., Landmesser, U., Mihaylova, B., Pedersen, T. R., Riccardi, G., Richter, D. J., Sabatine, M. S., Taskinen, M.-R., ... Wiklund, O. (2020). 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *European Heart Journal*, 40(1), 111–188. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz455>
- Macho-González, A., Garcimartín, A., Naes, F., López-Oliva, M. E., Amores-Arrojo, A., González-Muñoz, M. J., Bastida, S., Benedí, J., & Sánchez-Muniz, F. J. (2018). Effects of fiber purified extract of carob fruit on fat digestion and postprandial lipemia in healthy rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(26), 6734–6741. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01476>
- Macho-González, A., Garcimartín, A., López-Oliva, M. E., Bertocco, G., Naes, F., Bastida, S., Sánchez-Muniz, F. J., & Benedí, J. (2017). Fiber purified extracts of carob fruit decrease carbohydrate absorption. *Food and Function*, 8(6), 2258–2265. <https://doi.org/10.1039/c7fo00166e>
- Macho-González, A., Garcimartín, A., López-Oliva, M. E., Ruiz-Roso, B., de la Torre, I. M., Bastida, S., Benedí, J., & Sánchez-Muniz, F. J. (2019). Can carob-fruit-extract-enriched meat improve the lipoprotein profile, VLDL-oxidation, and LDL receptor levels induced by an atherogenic diet in STZ-NAD-diabetic rats?. *Nutrients*, 11(2), 332. <https://doi.org/10.3390/nu11020332>
- Macho-González, A., López-Oliva, M. E., Merino, J. J., García-Fernández, R. A., Garcimartín, A., Redondo-Castillejo, R., Bastida, S., Sánchez-Muniz, F. J., & Benedí, J. (2020). Carob fruit extract-enriched meat improves pancreatic beta-cell dysfunction, hepatic insulin signaling and lipogenesis in late-stage type 2 diabetes mellitus model. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 84, 108461. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108461>
- Mahdipour, E. (2022). *Beta vulgaris* juice contains biologically active exosome-like nanoparticles. *Tissue and Cell*, 76, 101800. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101800>
- Mahmoud, N. N., Hamad, K., Al Shibitini, A., Juma, S., Sharifi, S., Gould, L., & Mahmoudi, M.

- (2024). Investigating inflammatory markers in wound healing: Understanding implications and identifying artifacts. *ACS Pharmacology and Translational Science*, 7(1), 18–27. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.3c00336>
- Mahtout, R., Ortiz-Martínez, V. M., Salar-García, M. J., Gracia, I., Hernández-Fernández, F. J., Ríos, A. P. de los, Zaidia, F., Sánchez-Segado, S., & Lozano-Blanco, L. J. (2018). Algerian carob tree products: A comprehensive valorization analysis and future prospects. *Sustainability*, 10(1), 90. <https://doi.org/10.3390/su10010090>
- Malagón, J. (2020). *Cultivo del algarrobo: Ficha técnica*. Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica. <https://portalagrari.gva.es/documents/366567370/373114995/CULTIVO+del+ALGARROBO..Ficha+T%C3%A9cnica..pdf>
- Mansouri, F. El, Silva, J. C. G. E., Cacciola, F., Asraoui, F., Tayeq, H., Ben Amar, Y. M., Lovillo, M. P., Chouaibi, N., & Brigui, J. (2022). Evaluation of different extraction methods on the phenolic profile and the antioxidant potential of *Ceratonia siliqua* L. pods extracts. *Molecules*, 27(19), 6163. <https://doi.org/10.3390/molecules27196163>
- Martínez-Navarrete, N., Camacho, M. M., Agudelo, C., & Salvador, A. (2019). Sensory characterization of juice obtained via rehydration of freeze-dried and spray-dried grapefruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 244–252. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9166>
- Martínez-Rodríguez, R., Navarro-Alarcón, M., Rodríguez-Martínez, C., & Fonollá-Joya, J. (2013). Efectos sobre el perfil lipídico en humanos de un extracto de algarroba (*Ceratonia siliqua* L.) rico en polifenoles, incluido en un lácteo como alimento funcional; estudio piloto. *Nutricion Hospitalaria*, 28(6), 2107–2114. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.6.6952>
- Melgarejo, P., Salazar, D. M., & Artés, F. (2000). Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. *European Food Research and Technology*, 211, 185–190. <https://doi.org/10.1007/s002170050021>
- Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D. A., Bartual, J., Saura, D., & Martí, N. (2011). Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(10), 1893–1906. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4411>
- Meziani, S., Oomah, B. D., Zaidi, F., Simon-Levert, A., Bertrand, C., & Zaidi-Yahiaoui, R. (2015). Antibacterial activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) extracts against phytopathogenic bacteria *Pectobacterium atrosepticum*. *Microbial Pathogenesis*, 78, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.12.001>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2023). Anuario de estadística 2023. Gobierno de España.
- Monguió-Tortajada, M., Gálvez-Montón, C., Bayes-Genis, A., Roura, S., & Borràs, F. E. (2019). Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(12), 2369–2382. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03071-y>
- Moradnia, M., Mohammadkhani, N., Azizi, B., Mohammadi, M., Ebrahimpour, S., Tabatabaei-Malazy, O., Mirsadeghi, S., & Ale-Ebrahim, M. (2024). The power of *Punica*

- granatum*: A natural remedy for oxidative stress and inflammation; a narrative review. *Journal of Ethnopharmacology*, 330, 118243. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118243>
- Mu, J., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Deng, Z. Bin, Wang, B., Zhang, L., Kakar, S., Jun, Y., Miller, D., & Zhang, H. G. (2014). Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(7), 1561–1573. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300729>
- Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3, 10.3402/jev.v3.24641. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>
- Naruskaitė, D., Vydmantaitė, G., Rusteikaitė, J., Sampath, R., Rudaitytė, A., Stašytė, G., Calvente, M. I. A., & Jekabsonė, A. (2021). Extracellular vesicles in skin wound healing. *Pharmaceuticals*, 14(8), 811. <https://doi.org/10.3390/ph14080811>
- Nasar-Abbas, S. M., e-Huma, Z., Vu, T. H., Khan, M. K., Esbenshade, H., & Jayasena, V. (2016). Carob kibble: A bioactive-rich food ingredient. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 63–72. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12177>
- Nemet, M., Vasilić, M., & Tomas, A. (2022). Lipid-lowering effects of carob extracts (*Ceratonia siliqua*): proposed mechanisms and clinical importance. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 921123. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.921123>
- Nuncio-Jáuregui, N., Calín-Sánchez, A., Carbonell-Barrachina, A., & Hernández, F. (2014). Changes in quality parameters, proline, antioxidant activity and color of pomegranate (*Punica granatum* L.) as affected by fruit position within tree, cultivar and ripening stage. *Scientia Horticulturae*, 165, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.021>
- Nuncio-Jáuregui, Nallely, Nowicka, P., Munera-Picazo, S., Hernández, F., Carbonell-Barrachina, Á. A., & Wojdyło, A. (2015). Identification and quantification of major derivatives of ellagic acid and antioxidant properties of thinning and ripe Spanish pomegranates. *Journal of Functional Foods*, 12, 354–364. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.11.007>
- Oliveira, Á. M. F. De, Araújo, R. H. C. R., Alves, K. de A., Onias, E. A., Candeia, R. A., Lopes, M. F., Lima, J. F. De, Barbosa, L. da S., & Dias, G. A. (2019). Composition of fatty acids and antioxidant activity of pomegranate seed oil cv. "Molar". *Journal of Experimental Agriculture International*, 37(3), 1–9. <https://doi.org/10.9734/jeai/2019/v37i330267>
- Otte, M. L., Tamang, R. L., Papapanagiotou, J., Ahmad, R., Dhawan, P., & Singh, A. B. (2023). Mucosal healing and inflammatory bowel disease: Therapeutic implications and new targets. *World Journal of Gastroenterology*, 29(7), 1157–1172. <https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i7.1157>
- Owen, R. W., Haubner, R., Hull, W. E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., & Haber, B. (2003). Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology*, 41(12), 1727–1738. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(03\)00200-X](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00200-X)
- Özcan, M. M., Arslan, D., & Gökçalık, H. (2007). Some compositional properties and mineral

contents of carob (*Ceratonia siliqua*) fruit, flour and syrup. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58(8), 652–658.
<https://doi.org/10.1080/09637480701395549>

- Özkan, İ., Koçak, P., Yıldırım, M., Ünsal, N., Yılmaz, H., Telci, D., & Şahin, F. (2021). Garlic (*Allium sativum*)-derived SEVs inhibit cancer cell proliferation and induce caspase mediated apoptosis. *Scientific Reports*, 11(1), 14773. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93876-4>
- Pantiora, P. D., Balaouras, A. I., Mina, I. K., Freris, C. I., Pappas, A. C., Danezis, G. P., Zoidis, E., & Georgiou, C. A. (2023). The Therapeutic Alliance between Pomegranate and Health Emphasizing on Anticancer Properties. *Antioxidants*, 12(1), 187.
<https://doi.org/10.3390/antiox12010187>
- Papaefstathiou, E., Agapiou, A., Giannopoulos, S., & Kokkinofa, R. (2018). Nutritional characterization of carobs and traditional carob products. *Food Science and Nutrition*, 6(8), 2151–2161. <https://doi.org/10.1002/fsn3.776>
- Pérez-Bermúdez, P., Blesa, J., Soriano, J. M., & Marcilla, A. (2017). Extracellular vesicles in food: Experimental evidence of their secretion in grape fruits. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.09.022>
- Perut, F., Roncuzzi, L., Avnet, S., Massa, A., Zini, N., Sabbadini, S., Giampieri, F., Mezzetti, B., & Baldini, N. (2021). Strawberry-derived exosome-like nanoparticles prevent oxidative stress in human mesenchymal stromal cells. *Biomolecules*, 11(1), 87.
<https://doi.org/10.3390/biom11010087>
- Petruzzi, L., Campaniello, D., Speranza, B., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017). Thermal treatments for fruit and vegetable juices and beverages: A literature overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(4), 668–691.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12270>
- Pinedo, M., de la Canal, L., & de Marcos Lousa, C. (2021). A call for rigor and standardization in plant extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(6), 1–8.
<https://doi.org/10.1002/jev2.12048>
- Pocsfalvi, G., Turiák, L., Ambrosone, A., del Gaudio, P., Puska, G., Fiume, I., Silvestre, T., & Vékey, K. (2018). Protein biocargo of citrus fruit-derived vesicles reveals heterogeneous transport and extracellular vesicle populations. *Journal of Plant Physiology*, 229, 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.07.006>
- Prosapio, V., & Lopez-Quiroga, E. (2020). Freeze-Drying technology in foods. *Foods*, 9(7), 3–5. <https://doi.org/10.3390/foods9070920>
- Putnik, P., Kresoja, Ž., Bosiljkov, T., Režek Jambrak, A., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Roohinejad, S., Granato, D., Žuntar, I., & Bursać Kovačević, D. (2019). Comparing the effects of thermal and non-thermal technologies on pomegranate juice quality: A review. *Food Chemistry*, 279, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.131>
- Rahman, M. M., Islam, M. R., Akash, S., Hossain, M. E., Tumpa, A. A., Abrar Ishtiaque, G. M., Ahmed, L., Rauf, A., Khalil, A. A., Al Abdulmonem, W., & Simal-Gandara, J. (2023). Pomegranate-specific natural compounds as onco-preventive and onco-therapeutic compounds: Comparison with conventional drugs acting on the same molecular mechanisms. *Heliyon*, 9(7), e18090. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18090>

- Raimondo, S., Naselli, F., Fontana, S., Monteleone, F., Lo Dico, A., Saieva, L., Zito, G., Flugy, A., Manno, M., Di Bella, M. A., De Leo, G., & Alessandro, R. (2015). Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death. *Oncotarget*, 6(23), 19514–19527. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4004>
- Raimondo, S., Urzi, O., Meraviglia, S., Di Simone, M., Corsale, A. M., Rabienezhad Ganji, N., Palumbo Piccionello, A., Polito, G., Lo Presti, E., Dieli, F., Conigliaro, A., & Alessandro, R. (2022). Anti-inflammatory properties of lemon-derived extracellular vesicles are achieved through the inhibition of ERK/NF-κB signalling pathways. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(15), 4195–4209. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17404>
- Regente, M., Corti-Monzón, G., Maldonado, A. M., Pinedo, M., Jorrín, J., & de la Canal, L. (2009). Vesicular fractions of sunflower apoplastic fluids are associated with potential exosome marker proteins. *FEBS Letters*, 583(20), 3363–3366. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.09.041>
- Rico, D., Martín-Diana, A. B., Martínez-Villaluenga, C., Aguirre, L., Silván, J. M., Dueñas, M., De Luis, D. A., & Lasa, A. (2019). *In vitro* approach for evaluation of carob by-products as source bioactive ingredients with potential to attenuate metabolic syndrome (MetS). *Heliyon*, 5(1), e01175. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01175>
- Rocha, A., Wang, L., Penichet, M., & Martins-Green, M. (2012). Pomegranate juice and specific components inhibit cell and molecular processes critical for metastasis of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 136(3), 647–658. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2264-5>
- Rodríguez-Celma, J., Ceballos-Laita, L., Grusak, M. A., Abadía, J., & López-Millán, A. F. (2016). Plant fluid proteomics: Delving into the xylem sap, phloem sap and apoplastic fluid proteomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1864(8), 991–1002. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.03.014>
- Rodríguez-Solana, R., Romano, A., & Moreno-Rojas, J. M. (2021). Carob Pulp: A Nutritional and Functional By-Product. *Processes*, 9(7), 1146. <https://doi.org/10.3390/pr9071146>
- Román Ruiz, G. (2023). Echoes of famine: Effects of the embodied memories of the Spanish Hunger Years (1939–1952) on survivors' subsequent food practices and attitudes. *Memory Studies*, 17(4), 692–708. <https://doi.org/10.1177/17506980231155569>
- Roseiro, L. B., Duarte, L. C., Oliveira, D. L., Roque, R., Bernardo-Gil, M. G., Martins, A. I., Sepúlveda, C., Almeida, J., Meireles, M., Gírio, F. M., & Rauter, A. P. (2013). Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (*Ceratonia siliqua* L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. *Industrial Crops and Products*, 47, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.026>
- Rouhi, S. Z. T., Sarker, M. M. R., Rahmat, A., Alkahtani, S. A., & Othman, F. (2017). The effect of pomegranate fresh juice versus pomegranate seed powder on metabolic indices, lipid profile, inflammatory biomarkers, and the histopathology of pancreatic islets of Langerhans in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic Sprague-Dawley rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 156. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1667-6>
- Rtibi, K., Jabri, M. A., Selmi, S., Sebai, H., Marie, J. C., Amri, M., Marzouki, L., & El-Benna, J. (2016). Preventive effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) in dextran sulfate sodium-

- induced ulcerative colitis in rat. *RSC Advances*, 6(24), 19992–20000.
<https://doi.org/10.1039/c5ra21388f>
- Ruiz-Roso, B., Quintela, J. C., de la Fuente, E., Haya, J., & Pérez-Olleros, L. (2010). Insoluble carob fiber rich in polyphenols lowers total and ldl cholesterol in hypercholesterolemic subjects. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(1), 50–56.
<https://doi.org/10.1007/s11130-009-0153-9>
- Rutter, B. D., & Innes, R. W. (2017). Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins. *Plant Physiology*, 173, 728–741.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.01253>
- Şahin, F., Koçak, P., Güneş, M. Y., Özkan, İ., Yıldırım, E., & Kala, E. Y. (2019). *In vitro* wound healing activity of wheat-derived nanovesicles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 188(2), 381–394. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2913-1>
- Sánchez-López, C. M., González-Arce, A., Ramírez-Toledo, V., Bernal, D., & Marcilla, A. (2024). Unraveling new players in helminth pathology: extracellular vesicles from *Fasciola hepatica* and *Dicrocoelium dendriticum* exert different effects on hepatic stellate cells and hepatocytes. *International Journal for Parasitology*, 54(12), 617–634.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2024.06.002>
- Sánchez-López, C. M., Manzanque-López, M. C., Pérez-Bermúdez, P., Soler, C., & Marcilla, A. (2022). Characterization and bioactivity of extracellular vesicles isolated from pomegranate. *Food and Function*, 13(24), 12870–12882.
<https://doi.org/10.1039/d2fo01806c>
- Sánchez-López, C. M., Soler, C., Garzo, E., Fereres, A., Pérez-Bermúdez, P., & Marcilla, A. (2024). Phloem sap from melon plants contains extracellular vesicles that carry active proteasomes which increase in response to aphid infestation. *Journal of Extracellular Vesicles*, 13(10), e12517. <https://doi.org/10.1002/jev2.12517>
- Santangelo, C., Binetti, E., Azman, S. N. A., Bondi, D., Brunetti, V., Farina, M., Purcaro, C., Marramiero, L., Di Raimo, R., Pietrangelo, G., Di Filippo, E. S., & Pietrangelo, T. (2024). Biophysical features of plant-derived nanovesicles: Focus on almonds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 134, 106494.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106494>
- Sarbatly, R., Sariau, J., & Krishnaiah, D. (2023). Recent developments of membrane technology in the clarification and concentration of fruit juices. *Food Engineering Reviews*, 15(3), 420–437. <https://doi.org/10.1007/s12393-023-09346-2>
- Sasaki, D., Suzuki, H., Kusamori, K., Itakura, S., Todo, H., & Nishikawa, M. (2024). Development of rice bran-derived nanoparticles with excellent anti-cancer activity and their application for peritoneal dissemination. *Journal of Nanobiotechnology*, 22(1), 114. <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02381-z>
- Savci, Y., Kirbas, O. K., Bozkurt, B. T., Abdik, E. A., Tasli, P. N., Sahin, F., & Abdik, H. (2021). Grapefruit-derived extracellular vesicles as a promising cell-free therapeutic tool for wound healing. *Food and Function*, 12(11), 5144–5156.
<https://doi.org/10.1039/d0fo02953j>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis HHS Public Access. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.

- Schoop, V. M., Mirancea, N., & Fusenig, N. E. (1999). Epidermal organization and differentiation of HaCat keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, *112*(3), 343–353. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00524.x>
- Schulz, E., Karagianni, A., Koch, M., & Fuhrmann, G. (2020). Hot EVs – How temperature affects extracellular vesicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, *146*, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.11.010>
- Shah, T. A., Parikh, M., Patel, K. V., Patel, K. G., Joshi, C. G., & Gandhi, T. R. (2016). Evaluation of the effect of *Punica granatum* juice and punicalagin on NFκB modulation in inflammatory bowel disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *419*(1-2), 65-74. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2750-x>
- Shao, M., Jin, X., Chen, S., Yang, N., & Feng, G. (2023). Plant-derived extracellular vesicles a novel clinical anti-inflammatory drug carrier worthy of investigation. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *169*, 115904. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115904>
- Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., & Jin, B. (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry*, *383*, 132531. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>
- Shishehbor, F., Shahi, M. M., Zarei, M., Saki, A., Zakerkish, M., Shirani, F., & Zare, M. (2016). Effects of concentrated pomegranate juice on subclinical inflammation and cardiometabolic risk factors for type 2 diabetes: A quasi-experimental study. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, *14*(1), e33835. <https://doi.org/10.5812/ijem.33835>
- Shofian, N. M., Hamid, A. A., Osman, A., Saari, N., Anwar, F., Dek, M. S. P., & Hairuddin, M. R. (2011). Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(7), 4678–4692. <https://doi.org/10.3390/ijms12074678>
- Siano, F., Sciammaro, L., Volpe, M. G., Mamone, G., Puppo, M. C., & Picariello, G. (2018). Integrated analytical methods to characterize lipids from *Prosopis* spp. and *Ceratonia siliqua* seed germ flour. *Food Analytical Methods*, *11*(12), 3471–3480. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1323-x>
- Sidhom, K., Obi, P. O., & Saleem, A. (2020). A review of exosomal isolation methods: Is size exclusion chromatography the best option?. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 6466. <https://doi.org/10.3390/ijms21186466>
- Silvan, J. M., Ciechanowska, A. M., & Martinez-Rodriguez, A. J. (2020). Modulation of antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory properties by drying of *Prunus domestica* L. plum juice extracts. *Microorganisms*, *8*(1), 119. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010119>
- Smith, B. M., Bean, S. R., Schober, T. J., Michael Tilley, Herald, T. J., & Aramouni, F. (2010). Composition and molecular weight distribution of carob germ protein fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(13), 7794–7800. <https://doi.org/10.1021/jf101523p>
- Sohrab, G., Roshan, H., Ebrahimof, S., Nikpayam, O., Sotoudeh, G., & Siasi, F. (2019). Effects

- of pomegranate juice consumption on blood pressure and lipid profile in patients with type 2 diabetes: A single-blind randomized clinical trial. *Clinical Nutrition ESPEN*, 29, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2018.11.013>
- Sohrab, S. S., Raj, R., Nagar, A., Hawthorne, S., Paiva-Santos, A. C., Kamal, M. A., El-Daly, M. M., Azhar, E. I., & Sharma, A. (2023). Chronic inflammation's transformation to cancer: A nanotherapeutic paradigm. *Molecules*, 28(11), 4413. <https://doi.org/10.3390/molecules28114413>
- Song, H., Canup, B. S. B., Ngo, V. L., Denning, T. L., Garg, P., & Laroui, H. (2020). Internalization of garlic-derived nanovesicles on liver cells is triggered by interaction with CD98. *ACS Omega*, 5(36), 23118–23128. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02893>
- Sreekumar, A., Simmons, M. N., Lee, T. J., Sharma, A., & Saini, S. (2023). Therapeutic potential of pomegranate juice-derived nanovesicles in nude mouse benign prostatic hyperplasia (BPH) xenograft model. *Scientific Reports*, 13(1), 12427. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39511-w>
- Sreeraj, H., AnuKiruthika, R., Tamilselvi, K. S., & Subha, D. (2024). Exosomes for skin treatment: Therapeutic and cosmetic applications. *Nano TransMed*, 3, 100048. <https://doi.org/10.1016/j.ntm.2024.100048>
- Stanly, C., Alfieri, M., Ambrosone, A., Leone, A., Fiume, I., & Pocsfalvi, G. (2020). Grapefruit-derived micro and nanovesicles show distinct metabolome profiles and anticancer activities in the a375 human melanoma cell line. *Cells*, 9(12), 2722. <https://doi.org/10.3390/cells9122722>
- Stein, J. H., Korcarz, C. E., Hurst, R. T., Lonn, E., Kendall, C. B., Mohler, E. R., Najjar, S. S., Rembold, C. M., & Post, W. S. (2008). Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: A consensus statement from the american society of echocardiography carotid intima-media thickness task force endorsed by the society for vascular. *Journal of the American Society of Echocardiography*, 21(2), 93–111. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2007.11.011>
- Stover, E., & Mercure, E. W. (2007). The pomegranate: A new look at the fruit of paradise. *HortScience*, 42(5), 1088–1092. <https://doi.org/10.21273/hortsci.42.5.1088>
- Sundaram, K., Miller, D. P., Kumar, A., Teng, Y., Sayed, M., Mu, J., Lei, C., Sriwastva, M. K., Zhang, L., Jun, Y., Merchant, M. L., He, L., Fang, Y., Zhang, S., Zhang, X., Park, J. W., Lamont, R. J., & Zhang, H. G. (2019). Plant-derived exosomal nanoparticles inhibit pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis*. *iScience*, 21, 308–327. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.10.032>
- Sundaram, K., Mu, J., Kumar, A., Behera, J., Lei, C., Sriwastva, M. K., Xu, F., Dryden, G. W., Zhang, L., Chen, S. Y., Yan, J., Zhang, X., Park, J. W., Merchant, M. L., Tyagi, N., Teng, Y., & Zhang, H. G. (2022). Garlic exosome-like nanoparticles reverse high-fat diet induced obesity via the gut/brain axis. *Theranostics*, 12(3), 1220–1246. <https://doi.org/10.7150/thno.65427>
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & Von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51(1

D), D638–D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>

- Tajik, T., Baghaei, K., Moghadam, V. E., Farrokhi, N., & Salami, S. A. (2022). Extracellular vesicles of cannabis with high CBD content induce anticancer signaling in human hepatocellular carcinoma. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *152*, 113209. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113209>
- Takakura, H., Nakao, T., Narita, T., Horinaka, M., Nakao-Ise, Y., Yamamoto, T., Iizumi, Y., Watanabe, M., Sowa, Y., Oda, K., Mori, N., Sakai, T., & Mutoh, M. (2022). *Citrus limon* L.-Derived Nanovesicles Show an Inhibitory Effect on Cell Growth in p53-Inactivated Colorectal Cancer Cells via the Macropinocytosis Pathway. *Biomedicines*, *10*(6), 1352. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061352>
- Tapias, V., Cannon, J. R., & Greenamyre, J. T. (2014). Pomegranate juice exacerbates oxidative stress and nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *35*(5), 1162–1176. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.077>
- Tassou, C. C., Drosinos, E. H., & Nychas, G.-J. E. (1997). Short Communication: Weak antimicrobial effect of carob (*Ceratonia siliqua*) extract against food-related bacteria in culture media and model food systems. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *13*, 479–481 <https://doi.org/10.1023/A>
- Tehranifar, A., Zarei, M., Nemati, Z., Esfandiyari, B., & Vazifeshenas, M. R. (2010). Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, *126*(2), 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.07.001>
- Teng, Y., Ren, Y., Sayed, M., Hu, X., Lei, C., Kumar, A., Hutchins, E., Mu, J., Deng, Z., Luo, C., Sundaram, K., Sriwastva, M. K., Zhang, L., Hsieh, M., Reiman, R., Haribabu, B., Yan, J., Jala, V. R., Miller, D. M., ... Zhang, H. G. (2018). Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota. *Cell Host and Microbe*, *24*(5), 637–652.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.10.001>
- Tetra Pak (2023). *Tetra Pak Index 2023: El futuro de la nutrición*. Tetra Pak. <https://www.tetrapak.com/es-es/insights/tetra-pak-index/tetra-pak-index-2023>
- Tinnirello, V., Zizzo, M. G., Conigliaro, A., Tabone, M., Ganji, N. R., Cicio, A., Bressa, C., Larrosa, M., Rappa, F., Vergilio, G., Gasparro, R., Gallo, A., Serio, R. M., Alessandro, R., & Raimondo, S. (2024). Industrial-produced lemon nanovesicles ameliorate experimental colitis-associated damages in rats via the activation of anti-inflammatory and antioxidant responses and microbiota modification. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *174*, 116514. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116514>
- Trentini, M., Zanolla, I., Zanotti, F., Tiengo, E., Licastro, D., Dal Monego, S., Lovatti, L., & Zavan, B. (2022). Apple derived exosomes improve collagen type I production and decrease mmmps during aging of the skin through downregulation of the NF-κB pathway as mode of action. *Cells*, *11*(24), 3950. <https://doi.org/10.3390/cells11243950>
- Turhan, I. (2014). Relationship between sugar profile and d-pinitol content of pods of wild and cultivated types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.). *International Journal of Food Properties*, *17*(2), 363–370. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.631255>
- Turner, N. P., Abeysinghe, P., Sadowski, P., & Mitchell, M. D. (2023). Omics analysis of extracellular vesicles recovered from infant formula products and milk: towards

- personalized infant nutrition. *Molecular Nutrition and Food Research*, 67(19), e2300404. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202300404>
- Tzatzani, T.-T., & Ouzounidou, G. (2023). Carob as an agrifood chain product of cultural, agricultural and economic importance in the mediterranean region. *Journal of Innovation Economics & Management*, 42(3), 127–147. <https://doi.org/10.3917/jie.pr1.0140>.
- Urzi, O., Cafora, M., Ganji, N. R., Tinnirello, V., Gasparro, R., Raccosta, S., Manno, M., Corsale, A. M., Conigliaro, A., Pistocchi, A., Raimondo, S., & Alessandro, R. (2023). Lemon-derived nanovesicles achieve antioxidant and anti-inflammatory effects activating the AhR/Nrf2 signaling pathway. *iScience*, 26(7), 107041. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107041>
- Uscanga, M. A., Salvador, A., Camacho, M. del M., & Martínez-Navarrete, N. (2021). Impact of freeze-drying shelf temperature on the bioactive compounds, physical properties and sensory evaluation of a product based on orange juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(10), 5409–5416. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15086>
- Valero-Muñoz, M., Ballesteros, S., Ruiz-Roso, B., Pérez-Olleros, L., Martín-Fernández, B., Lahera, V., & de las Heras, N. (2019). Supplementation with an insoluble fiber obtained from carob pod (*Ceratonia siliqua* L.) rich in polyphenols prevents dyslipidemia in rabbits through SIRT1/PGC-1 α pathway. *European Journal of Nutrition*, 58(1), 357–366. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1599-4>
- Valero-Muñoz, M., Martín-Fernández, B., Ballesteros, S., Lahera, V., & de las Heras, N. (2014). Carob pod insoluble fiber exerts anti-atherosclerotic effects in rabbits throughsirtuin-1 and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α . *Journal of Nutrition*, 144(9), 1378–1384. <https://doi.org/10.3945/jn.114.196113>
- Van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Vanessa, V., Rachmawati, H., & Barlian, A. (2024). Anti-inflammatory potential of goldenberry-derived exosome-like nanoparticles in macrophage polarization. *Future Science OA*, 10(1), FSO943. <https://doi.org/10.2144/foa-2023-0172>
- Vegara, S., Martí, N., Lorente, J., Coll, L., Streitenberger, S., Valero, M., & Saura, D. (2014). Chemical guide parameters for *Punica granatum* cv. «Mollar» fruit juices processed at industrial scale. *Food Chemistry*, 147, 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.122>
- Vegara, S., Mena, P., Martí, N., Saura, D., & Valero, M. (2013). Approaches to understanding the contribution of anthocyanins to the antioxidant capacity of pasteurized pomegranate juices. *Food Chemistry*, 141(3), 1630–1636. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.015>
- Verardo, V., Garcia-Salas, P., Baldi, E., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., & Caboni, M. F. (2014). Pomegranate seeds as a source of nutraceutical oil naturally rich in bioactive lipids. *Food Research International*, 65, 445–452. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.044>

- Visan, K. S., Lobb, R. J., Ham, S., Lima, L. G., Palma, C., Edna, C. P. Z., Wu, L. Y., Gowda, H., Datta, K. K., Hartel, G., Salomon, C., & Möller, A. (2022). Comparative analysis of tangential flow filtration and ultracentrifugation, both combined with subsequent size exclusion chromatography, for the isolation of small extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, *11*(9), e12266. <https://doi.org/10.1002/jev2.12266>
- Vučić, V., Grabež, M., Trchounian, A., & Arsić, A. (2019). Composition and Potential Health Benefits of Pomegranate: A Review. *Current Pharmaceutical Design*, *25*(16), 1817 – 1827. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190708183941>
- Wang, B., Zhuang, X., Deng, Z. Bin, Jiang, H., Mu, J., Wang, Q., Xiang, X., Guo, H., Zhang, L., Dryden, G., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H. G. (2014). Targeted drug delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from grapefruit. *Molecular Therapy*, *22*(3), 522–534. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.190>
- Wang, F., Yuan, M., Shao, C., Ji, N., Zhang, H., & Li, C. (2023). *Momordica charantia*-Derived Extracellular Vesicles Provide Antioxidant Protection in Ulcerative Colitis. *Molecules*, *28*(17), 6182. <https://doi.org/10.3390/molecules28176182>
- Wang, Yuchen, Wang, J., Ma, J., Zhou, Y., & Lu, R. (2022). Focusing on future applications and current challenges of plant derived extracellular vesicles. *Pharmaceuticals*, *15*(6), 708. <https://doi.org/10.3390/ph15060708>
- Wang, Yulan, Belton, P. S., Bridon, H., Garanger, E., Wellner, N., Parker, M. L., Grant, A., Feillet, P., & Noel, T. R. (2001). Physicochemical studies of caroubin: A gluten-like protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(7), 3414–3419. <https://doi.org/10.1021/jf010076u>
- Webber, J., & Clayton, A. (2013). How pure are your vesicles? *Journal of Extracellular Vesicles*, *2*, 10.3402/jev.v2i0.19861. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.19861>
- Welsh, J. A., Buzas, E. I., Blenkinsop, C., Driscoll, L. O., Cai, H., Bussolati, B., Vizio, D. Di, Driedonks, T. A. P., Erdbrügger, U., Fu, Q., Hill, A. F., Lenassi, M., Möller, A., Sahoo, S., Abuelreich, S., Brucale, M., Hanser, E., Ivanov, A. R., Bridges, E. M., Valle, F. (2024). Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV 2023): From basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular Vesicles*, *13*(2), e12404. <https://doi.org/10.1002/jev2.12404>
- Witzel, K., Shahzad, M., Matros, A., Mock, H. P., & Mühling, K. H. (2011). Comparative evaluation of extraction methods for apoplastic proteins from maize leaves. *Plant Methods*, *7*, 48. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-48>
- Wolf, M., Poupardin, R. W., Ebner-Peking, P., Andrade, A. C., Blöchl, C., Obermayer, A., Gomes, F. G., Vari, B., Maeding, N., Eminger, E., Binder, H. M., Raninger, A. M., Hochmann, S., Brachtl, G., Spittler, A., Heuser, T., Ofir, R., Huber, C. G., Aberman, Z., Strunk, D. (2022). A functional corona around extracellular vesicles enhances angiogenesis, skin regeneration and immunomodulation. *Journal of Extracellular Vesicles*, *11*(4), e12207. <https://doi.org/10.1002/jev2.12207>
- Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British journal of haematology*, *13*(3), 269–288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>

- Wongkaewkhiaw, S., Wongrakpanich, A., Krobthong, S., Saengsawang, W., Chairoungdua, A., & Boonmuen, N. (2022). Induction of apoptosis in human colorectal cancer cells by nanovesicles from fingerroot (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.). *PLoS ONE*, *17*(4), e0266044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266044>
- World Health Organization. (2016). *Plan De Acción Mundial Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos*.
- Wu, H. C., Bulgakov, V. P., & Jinn, T. L. (2018). Pectin methylesterases: Cell wall remodeling proteins are required for plant response to heat stress. *Frontiers in Plant Science*, *8*(71), 1612. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01612>
- Wu, J., Ma, X., Lu, Y., Zhang, T., Du, Z., Xu, J., You, J., Chen, N., Deng, X., & Wu, J. (2022). Edible *Pueraria lobata*-derived exosomes promote M2 macrophage polarization. *Molecules*, *27*(23), 4–8. <https://doi.org/10.3390/molecules27238184>
- Wu, W., Zhang, B., Wang, W., Bu, Q., Li, Y., Zhang, P., & Zeng, L. (2024). Plant-derived exosome-like nanovesicles in chronic wound healing. *International Journal of Nanomedicine*, *19*, 11293–11303. <https://doi.org/10.2147/IJN.S485441>
- Yang, L., Jin, W. Q., Tang, X. L., Zhang, S., Ma, R., Zhao, D. Q., & Sun, L. W. (2022). Ginseng-derived nanoparticles inhibit lung cancer cell epithelial mesenchymal transition by repressing pentose phosphate pathway activity. *Frontiers in Oncology*, *12*, 942020. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.942020>
- Yang, M., Liu, X., Luo, Q., Xu, L., & Chen, F. (2020). An efficient method to isolate lemon derived extracellular vesicles for gastric cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, *18*(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00656-9>
- Yang, M., Luo, Q., Chen, X., & Chen, F. (2021). Bitter melon derived extracellular vesicles enhance the therapeutic effects and reduce the drug resistance of 5-fluorouracil on oral squamous cell carcinoma. *Journal of Nanobiotechnology*, *19*(1), 259. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00995-1>
- Yang, S., Lu, S., Ren, L., Bian, S., Zhao, D., Liu, M., & Wang, J. (2023). Ginseng-derived nanoparticles induce skin cell proliferation and promote wound healing. *Journal of Ginseng Research*, *47*(1), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2022.07.005>
- Yin, L., Yan, L., Yu, Q., Wang, J., Liu, C., Wang, L., & Zheng, L. (2022). Characterization of the microRNA profile of ginger exosome-like nanoparticles and their anti-inflammatory effects in intestinal Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *70*(15), 4725–4734. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07306>
- You, J. Y., Kang, S. J., & Rhee, W. J. (2021). Isolation of cabbage exosome-like nanovesicles and investigation of their biological activities in human cells. *Bioactive Materials*, *6*(12), 4321–4332. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.023>
- Yu, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H., & Hu, H. (2020). Targeting NF-κB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), 209. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00312-6>
- Zhan, W., Deng, M., Huang, X., Xie, D., Gao, X., Chen, J., Shi, Z., Lu, J., Lin, H., & Li, P. (2023). *Pueraria lobata*-derived exosome-like nanovesicles alleviate osteoporosis by

- enhancing autophagy. *Journal of Controlled Release*, 364, 644–653.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.11.020>
- Zhang, M., Viennois, E., Prasad, M., Zhang, Y., Wang, L., Zhang, Z., Han, M. K., Xiao, B., Xu, C., Srinivasan, S., & Merlin, D. (2016). Edible ginger-derived nanoparticles: A novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. *Biomaterials*, 101, 321–340.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.018>
- Zhang, M., Xiao, B., Wang, H., Han, M. K., Zhang, Z., Viennois, E., Xu, C., & Merlin, D. (2016). Edible ginger-derived nano-lipids loaded with doxorubicin as a novel drug-delivery approach for colon cancer therapy. *Molecular Therapy*, 24(10), 1783–1796.
<https://doi.org/10.1038/mt.2016.159>
- Zhao, D., Jiang, Y., Sun, J., Li, H., Huang, M., Sun, X., & Zhao, M. (2019). Elucidation of the anti-inflammatory effect of vanillin in LPS-activated THP-1 cells. *Journal of Food Science*, 84(7), 1920–1928. <https://doi.org/10.111750-3841.14693>
- Zhao, W. J., Bian, Y. P., Wang, Q. H., Yin, F., Yin, L., Zhang, Y. L., & Liu, J. H. (2022). Blueberry-derived exosomes-like nanoparticles ameliorate nonalcoholic fatty liver disease by attenuating mitochondrial oxidative stress. *Acta Pharmacologica Sinica*, 43(3), 645–658. <https://doi.org/10.1038/s41401-021-00681-w>
- Zhou, H., Duan, H., Liu, Y., Sun, X., Zhao, J., & Lin, H. (2019). Patellin protein family functions in plant development and stress response. *Journal of Plant Physiology*, 234–235, 94–97. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.01.012>
- Zhou, X., Xu, S., Zhang, Z., Tang, M., Meng, Z., Peng, Z., Liao, Y., Yang, X., Nüssler, A. K., Liu, L., & Yang, W. (2024). Gouqi-derived nanovesicles (GqDNVs) inhibited dexamethasone-induced muscle atrophy associating with AMPK/SIRT1/PGC1 α signaling pathway. *Journal of Nanobiotechnology*, 22(1), 276.
<https://doi.org/10.1186/s12951-024-02563-9>
- Zhu, B. J., Zayed, M. Z., Zhu, H. X., Zhao, J., & Li, S. P. (2019). Functional polysaccharides of carob fruit: A review. *Chinese Medicine*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13020-019-0261-x>
- Zhuang, X., Deng, Z. Bin, Mu, J., Zhang, L., Yan, J., Miller, D., Feng, W., McClain, C. J., & Zhang, H. G. (2015). Ginger-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver damage. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 28713.
<https://doi.org/10.3402/jev.v4.28713>
- Zu, M., Xie, D., Canup, B. S. B., Chen, N., Wang, Y., Sun, R., Zhang, Z., Fu, Y., Dai, F., & Xiao, B. (2021). "Green" nanotherapeutics from tea leaves for orally targeted prevention and alleviation of colon diseases. *Biomaterials*, 279, 121178.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121178>
- Zunft, H. J. F., Lüder, W., Harde, A., Haber, B., Graubaum, H. J., & Gruenwald, J. (2001). Carob pulp preparation for treatment of hypercholesterolemia. *Advances in Therapy*, 18(5), 230 – 236. <https://doi.org/10.1007/BF02853169>
- Zunft, H. J. F., Lüder, W., Harde, A., Haber, B., Graubaum, H. J., Koebnick, C., & Grünwald,

J. (2003). Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients. *European Journal of Nutrition*, 42(5), 235–242. <https://doi.org/10.1007/s00394-003-0438-y>

7. ANEXOS

7.1. Anexo 1. Artículo publicado en la revista *Food & Function*

Sánchez-López, C. M., Manzaneque-López, M. C., Pérez-Bermúdez, P., Soler, C., & Marcilla, A. (2022). Characterization and bioactivity of extracellular vesicles isolated from pomegranate. *Food & function*, *13*(24), 12870–12882. <https://doi.org/10.1039/d2fo01806c>



7.2. Anexo 2. Lista de proteínas identificadas en GraNVs por LC-MS/MS

Tabla Suplementaria S1.

Accession_PUNGR	Peptides (95%)	Uniprot	NCBI blast
AoA2IoJ3D2	36	Plasma membrane ATPase	
AoA2IoJ5V6	15	Uncharacterized protein	NAB domain-containing protein
AoA218WZE7	14	Phospholipase D	
AoA218XXE1	13	Uncharacterized protein	Heat Shock cognate 70 kDa protein 2 (putative)
AoA218WC38	11	Plasma membrane ATPase	
AoA2IoKE01	11	Plasma membrane ATPase	
AoA2IoHJT1	11	Uncharacterized protein	Monocopper oxidase-like protein SKU5
AoA218X9C1	10	14-3-3 domain-containing protein	
AoA2IoLiX1	10	Uncharacterized protein	Heat Shock protein 70 family (putative)
AoA218XSW9	9	Bet_v_1 domain-containing protein	
AoA2IoL8L2	9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	
AoA2IoHLQ1	8	Fructose-bisphosphate aldolase	
AoA218WS48	8	NmrA domain-containing protein	
AoA218WTZ5	8	PHB domain-containing protein	
AoA218WV62	8	Uncharacterized protein	Actin 7 isoform 1
AoA2IoLBX0	7	Uncharacterized protein	Late embryogenesis abundant protein LEA14-A
AoA2IoJPV2	7	Uncharacterized protein	Patellin-1
AoA2IoJGV8	7	Uncharacterized protein	Dehydrin COR47
AoA2IoK2C8	7	Annexin	
AoA2IoJQB8	7	Enolase_C domain-containing protein	
AoA218XM98	7	HATPase_c domain-containing protein	
AoA2IoI9F5	7	TPR_REGION domain-containing protein	
AoA218VTX0	7	Uncharacterized protein	Glutathione S-transferase
AoA2IoH1D6	6	Bet_v_1 domain-containing protein	

AoA2IoKBE7	6	Malate dehydrogenase	
AoA2IoL9U8	6	t-SNARE coiled-coil homology domain-containing protein	
AoA218VXL1	6	Uncharacterized protein	Fasciclin-like arabinogalactan protein 8
AoA2IoK2K1	6	Uncharacterized protein	Nucleoredoxin 1 (probable)
AoA2IoJV44	6	Uncharacterized protein	PKS_ER domain-containing protein
AoA2IoJJ12	6	Uncharacterized protein	Sodium/calcium exchanger NCL
AoA2IoKLK6	5	BRO1 domain-containing protein	
AoA218WED1	5	MFS domain-containing protein	
AoA2IoKRU1	5	Uncharacterized protein	Ras-related protein Rab7
AoA2IoKHY4	5	Uncharacterized protein	CSC1-like protein ERD4
AoA2IoK6D9	5	Uncharacterized protein	EF-hand domain-containing protein
AoA2IoJKR6	5	Uncharacterized protein	Calcium-dependent protein kinase 33
AoA2IoJDV3	5	Uncharacterized protein	UTP-glucose-1-phosphate uridyl transferase
AoA2IoISS2	5	Uncharacterized protein	Vesicle-associated membrane protein 711
AoA2IoI8E7	5	Uncharacterized protein	Calmodulin
AoA218XHL8	4	Adenosyl homocysteinase	
AoA218XPJ6	4	Bet_v_1 domain-containing protein	
AoA2IoKTL7	4	FAD-binding PCMH-type domain-containing	
AoA218VV18	4	FAS1 domain-containing protein	
AoA2IoIPN9	4	Glutamate decarboxylase	
AoA2IoLoD7	4	Glutathione peroxidase	
AoA2IoL2Po	4	Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor	
AoA2IoHHP3	4	Peroxidase_4 domain-containing protein	
AoA2IoKAI7	4	Phosphoglycerate kinase	
AoA218WW85	4	Serine hydroxymethyltransferase	
AoA2IoJD79	4	t-SNARE coiled-coil homology domain-containing protein	

AoA218VVR2	4	Tetraspanin (Tobamovirus multiplication protein 2A-like)	
AoA218VWB8	4	Uncharacterized protein	CSC1-like protein HYP1
AoA218XS57	4	Uncharacterized protein	Triose phosphate isomerase
AoA2IoLEM9	4	Uncharacterized protein	Ras-related protein RABB1b isoform X1
AoA2IoL7K4	4	Uncharacterized protein	ADP-ribosylation factor (ARF)
AoA2IoLiW9	4	Uncharacterized protein	Ras-related protein Rab-8A
AoA2IoKSK1	4	Uncharacterized protein	Ras-related protein Rab-2A-like
AoA2IoKPL9	4	Uncharacterized protein	Vacuolar protein sorting-associated protein 32-like protein 2
AoA2IoKBE9	4	Uncharacterized protein	E3 ubiquitin-protein ligase XBAT35 isoform X3 (putative)
AoA2IoK4o4	4	Uncharacterized protein	Patellin-3
AoA2IoIF97	4	Uncharacterized protein	Vacuolar protein sorting 34
AoA2IoIE28	4	Uncharacterized protein	Alcohol dehydrogenase
AoA2IoHMU9	4	Uncharacterized protein	Sucrose synthase
AoA2IoH1I5	4	Uncharacterized protein	Tr-type G domain-containing protein
AoA2IoINS2	3	ACB domain-containing protein	
AoA218WJZ8	3	Bet_v_1 domain-containing protein	
AoA2IoHR90	3	Cation_ATPase_N domain-containing protein	
AoA2IoHK32	3	DUF1421 domain-containing protein	
AoA2IoHV67	3	FAS1 domain-containing protein	
AoA2IoI4K5	3	Lipocln_cytosolic_FA-bd_domain-containing protein	
AoA218XKLo	3	Lipoxygenase	
AoA218VXA5	3	Nucleoside diphosphate kinase	
AoA2IoLFC8	3	Peptidase_M17_N domain-containing protein	
AoA2IoK239	3	Peroxidase_4 domain-containing protein	
AoA2IoKMG5	3	SHSP domain-containing protein	

AoA2IoJZL7	3	SHSP domain-containing protein	
AoA218WC47	3	Uncharacterized protein	Glutathione S-transferase DHAR2
AoA2IoKS56	3	Uncharacterized protein	ADP-ribosylation factor-like protein 8a
AoA2IoKLR7	3	Uncharacterized protein	Ubiquitin
AoA2IoKDA0	3	Uncharacterized protein	Small GTP-binding domain containing protein
AoA2IoK9D4	3	Uncharacterized protein	Transitional endoplasmic reticulum ATPase (putative)
AoA2IoK3T5	3	Uncharacterized protein	Ras-related protein Rab7
AoA2IoIIZ6	3	Uncharacterized protein	Eukaryotic initiation factor 4A-3
AoA2IoI6Y3	3	Uncharacterized protein	Ras-related protein RABD2c
AoA218XNQ6	3	USP domain-containing protein	
AoA2IoIHE0	3	USP domain-containing protein	
AoA2IoLDB4	3	Vacuolar proton pumpo subunit B	
AoA2IoJMZ1	3	VPS37 C-terminal domain-containing protein	
AoA218VVSQ8	2	AAI domain-containing protein	
AoA2IoIE30	2	AAI domain-containing protein	
AoA2IoL2R4	2	ADH_N_2 domain-containing protein	
AoA2IoJMQ6	2	Aldo_keto_reductase domain-containing protein	
AoA2IoKNG9	2	ALIX_LYPXL_bnd domain-containing protein	
AoA218X5B3	2	C2 domain-containing protein	
AoA2IoIHM1	2	Cupin_5 domain-containing protein	
AoA218VSK8	2	Cysteine synthase	
AoA218X0I8	2	DLH domain-containing protein	
AoA218WHD8	2	Epimerase domain-containing protein	
AoA2IoILB4	2	Epimerase domain-containing protein	
AoA218XV30	2	Flavodoxin-like domain-containing protein	
AoA2IoINRo	2	FYVE-type domain-containing protein	

AoA218XID6	2	Glutamine synthetase	
AoA21oKEN9	2	GTP-binding nuclear protein	
AoA21oI7B6	2	Helicase C-terminal domain-containing protein	
AoA21oIUM5	2	Knot1 domain-containing protein	
AoA21oI7B2	2	Phosphoinositide phospholipase C	
AoA218Y1J8	2	Profilin	
AoA21oHMR3	2	Pyr_redox_2 domain-containing protein	
AoA21oKTM0	2	Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha	
AoA218VW44	2	Remorin_C domain-containing protein	
AoA21oKH93	2	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	
AoA218X926	2	Thioredoxin domain-containing protein	
AoA218WZ58	2	Thioredoxin	
AoA21oL2R1	2	Uncharacterized protein	PKS_ER domain-containing protein
AoA21oKI27	2	Uncharacterized protein	Aquaporin PIP2-2
AoA21oK238	2	Uncharacterized protein	Aquaporin PIP2-7
AoA21oJPH7	2	Uncharacterized protein	EF1_GNE domain-containing protein
AoA21oJL20	2	Uncharacterized protein	Ras-related protein RIC2
AoA21oIZ88	2	Uncharacterized protein	Pyr_redox_2 domain-containing protein (probable Monodehydroascorbate reductase 2)
AoA21oIHB3	2	Uncharacterized protein	Chaperone protein dnaJ-like protein
AoA21oIEC7	2	Uncharacterized protein	Tetraspanin-8
AoA21oHIH2	2	Uncharacterized protein	Epimerase domain-containing protein
AoA218W2F8	2	USP domain-containing protein	
AoA21oII07	2	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog	
AoA21oJo81	2	V-SNARE domain-containing protein	
AoA21oJAS2	2	X8 domain-containing protein	

7.3. Anexo 3. Artículo enviado a la revista *Food Chemistry*

A continuación, se encuentra el borrador del artículo enviado a la revista Food Chemistry, bajo el título de *Pasteurization and lyophilization affect membrane proteins of Pomegranate-derived nanovesicles reducing their functional properties and cellular uptake.*

En el momento del depósito de esta tesis se encontraba *wuth editor.*

1 **Pasteurization and lyophilization affect membrane proteins of Pomegranate-**
2 **derived nanovesicles reducing their functional properties and cellular uptake**

3 Mari Cruz Manzaneque-López^{1,2,3+}, Aránzazu González-Arce⁴, Pedro Pérez-
4 Bermúdez⁵, Carla Soler^{1,2,3}, Antonio Marcilla^{3,4*} and Christian M. Sánchez-López^{3,4+*}

5 1. Dept. Medicina Preventiva i Salut Pública, F. Farmacia i Ciències de
6 l'Alimentació, Universitat de València, Burjassot, València, Spain.

7 2. Instituto de Ciencia de los Materiales, Parque Científico, Universitat de
8 València, Burjassot, Valencia, Spain.

9 3. Joint Research Unit on Endocrinology, Nutrition and Clinical Dietetics UV-IIS
10 La Fe, Valencia, 46012, Spain.

11 4. Parasites & health research group, Àrea de Parasitologia, Departament de
12 Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia, Universitat de València,
13 Burjassot, Valencia, 46100, Spain.

14 5. Dept. Biologia Vegetal, F. Ciències Biològiques, Universitat de València,
15 Burjassot, Valencia, Spain

16 +: This authors contributed equally.

17 *Corresponding authors at: Àrea de Parasitologia, Departament de Farmàcia i
18 Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia, Universitat de València, Burjassot, Valencia,
19 46100, Spain.

20 E-mail addresses: Antonio.Marcilla@uv.es; Christian.Sanchez@uv.es

21

22

23 **Abstract**

24 Plant-derived nanovesicles (PDNVs) are promising therapeutic agents, valued for
25 their bioactive compound content and as drug delivery systems. However, the
26 effects of industrial food processing techniques on PDNVs remain underexplored.
27 This study evaluated the impact of lyophilization and pasteurization on the
28 properties and uptake efficiency of pomegranate-derived nanovesicles (*PgNVs*).
29 *PgNVs* were isolated from pomegranate juice using tangential flow filtration and size
30 exclusion chromatography. Treated *PgNVs* were analyzed via transmission electron
31 microscopy, nanoparticle tracking analysis, and LC-MS/MS, assessing their functional
32 properties and cellular uptake. High-purity *PgNVs* were obtained, although both
33 treatments reduced their yield. Pre-treated *PgNVs* displayed diminished anti-
34 inflammatory and wound-healing capacities, though antioxidant activity remained
35 unaffected. Treated *PgNVs* also exhibited lower internalization by human
36 macrophages compared to untreated *PgNVs*. Proteomic analyses revealed that the
37 damage of membrane proteins, such as Tetraspanin-8, might be responsible for
38 these effects. Our findings emphasize the need of optimizing processing to preserve
39 PDNV therapeutic potential.

40 Keywords: Plant-derived nanovesicles; pomegranate; extracellular vesicles; uptake;
41 pasteurization; lyophilization.

42

43 **1. Introduction**

44 The pomegranate fruit is receiving increasing attention with numerous studies
45 exploring the potential health benefits of pomegranate juice (*PgJ*) that includes anti-
46 inflammatory, antidiabetic and anticancer effects, among others (Benedetti et al.,
47 2023; Pantiora et al., 2023). In fact, *PgJ* is recognized as one of the beverages with
48 the highest antioxidant content, primarily attributed to its anthocyanins and
49 hydrolysable tannins, as well as to low concentrations of phenolic compounds, such
50 as proanthocyanidins (Kalaycıoğlu & Erim, 2017; Moradnia et al., 2024).

51 To extend the shelf life of juices, the industry commonly employs thermal processing
52 methods. For *PgJ*, pasteurization is the preferred technique to inactivate
53 microorganisms and endogenous enzymes. Two types of pasteurization are typically
54 used: Low-Temperature Long-Time (LTLT), which involves heating at 63 °C for a
55 minimum of 30 minutes, and High-Temperature Short-Time (HTST), which uses
56 temperatures of 72 °C for at least 15 seconds (Vegara et al., 2013; Putnik et al.,
57 2019).

58 However, thermal processing can impact both the nutritional composition and
59 sensory qualities of fruit juices. This has led to the development of alternative
60 preservation methods, such as freeze-drying, to better retain the qualities of the
61 product (Sarbatly et al., 2023). Freeze-drying is a dehydration technique that
62 involves freezing the product, followed by the sublimation of ice under reduced
63 pressure (Prosapio & Lopez-Quiroga, 2020). Juice concentration, achieved by
64 removing a portion of its water content, extends the shelf life of the product, reduces
65 storage costs, and simplifies product handling (Adnan et al., 2018). However, the
66 freeze-drying process can affect polyphenol content and alter the physical properties

67 of rehydrated juices (Martínez-Navarrete et al., 2019; Silvan et al., 2020; Uscanga
68 et al., 2021).

69 The description of extracellular vesicles (EVs) in plants has been subject to debate,
70 especially regarding their origin, isolation and nomenclature (Pinedo et al., 2021;
71 Sánchez-López et al., 2024). Since nanovesicles (NVs) obtained from juice may
72 contain both, 'bona fide' EVs and vesicles generated during juice extraction, we
73 select the term NVs to name all vesicle preparations coming from juice. To our
74 knowledge, no studies have yet examined the impact of industrial treatments on
75 fruit juice derived nanovesicles.

76 NVs isolated from fruit juices display multiple functional properties (Lo et al., 2024).
77 For instance, NVs derived from lemon exhibit antioxidant (Baldini et al., 2018; Urzi
78 et al., 2023), anti-inflammatory (Raimondo et al., 2022), and wound-healing (Urzi
79 et al., 2023) properties. Similar effects have been reported in NVs extracted from
80 other citrus juices, including orange (Bruno et al., 2021), tangerine (Li et al., 2023),
81 and grapefruit (Wang et al., 2014). Our group first described the presence of vesicles
82 in the *PgJ* (*PgNVs*), exhibiting antioxidant, anti-inflammatory, and wound-healing
83 properties *in vitro* (Sánchez-López et al., 2022). Additionally, several research groups
84 have explored the therapeutic potential of *PgNVs* in conditions such as benign
85 prostate hyperplasia (Sreekumar et al., 2023) and acute pancreatitis (Kang et al.,
86 2024), or as carriers of exogenous microRNAs (López de las Hazas et al., 2023).

87 Regarding industrial treatments, it is well known that thermal processing and
88 homogenization on milk-derived EVs reduce EV concentration compared to
89 untreated raw milk and can selectively deplete specific EV subsets, also affecting EV
90 integrity and cargo (Kleinjan et al., 2021; Colella et al., 2023). This highlights the need
91 of selecting specific processing methods that preserve the bioactive components of

92 the milk. Nevertheless, these studies did not assess whether alterations in EV cargo
93 or integrity may have an impact in the functional properties of the processed EVs.
94 Plant-derived EVs and NVs differ significantly from mammalian EVs in their lipid,
95 sugar, protein and nucleic acid composition, leading to differences in their
96 biochemical functionality, bioavailability and biophysical properties like stability
97 (Wang et al., 2022; Alzahrani et al., 2023), therefore, they may respond differently
98 to industrial preservation methods.

99 Since *PgNVs* have been identified as potential key contributors to the therapeutic
100 properties of *PgJ* (Sánchez-López et al., 2022), evaluating the impact of common
101 industrial treatments on their preservation and functionality is essential to
102 understand their availability to consumers. This could provide valuable insights for
103 future nutritional recommendations.

104 In this study, we have examined the impact of two industrial operations widely used
105 in juice production, such as pasteurization and freeze-drying (lyophilization), on
106 *PgNVs* and assess whether their integrity, proteomic content and functional
107 properties are affected.

108

109 **2. Materials and methods**

110 **2.1. Juice extraction and processing**

111 Pomegranate fruits (*Punica granatum L.*), var. “Mollar de Elche”, were sourced from
112 a local market of the Valencian Community, Spain. After washing the fruits with
113 distilled water, pomegranate juice (Nat-*PgJ*) was freshly extracted using a manual
114 hand-press juicer. *PgJ* was then passed through a stainless-steel sieve (1 mm mesh)
115 to remove any solid particles. For low-temperature pasteurization, Nat-*PgJ* was
116 heated to 63°C for 30 min (Pas-*PgJ*) in a water bath, and immediately cooled in an
117 ice-water bath. For lyophilization, *PgJ* was processed at -60°C and pressure of 30 Pa
118 using a freeze-dryer (Scient-10N, GEDILAB S.L). The dried samples were ground into
119 a fine powder and rehydrated with Milli-Q® water to prepare reconstituted *PgJ* (Lyo-
120 *PgJ*).

121 Each juice sample was sequentially centrifuged to remove debris and larger particles.
122 First, the samples were centrifuged at 700 x g for 10 min, followed by 3,000 x g for
123 15 min, and finally at 20,000 x g for 20 min at 4 °C to exclude larger NVs and
124 contaminants. The supernatant (200 mL) was then concentrated using tangential
125 flow filtration with a Vivaflow™ 50R membrane (Sartorius) and a Masterflex® L/S
126 peristaltic pump (Cole-Parmer). The concentrated extract (Ext*Pg*), which was
127 reduced to a final volume of 4 to 5 mL, was aliquoted into 1 mL samples and stored
128 at -80 °C until use.

129 **2.2. Isolation of NVs by size exclusion chromatography (SEC) and protein** 130 **quantification**

131 Pomegranate NVs (*PgNVs*) were isolated as described previously (Sánchez-López
132 et al., 2022). In brief, a 12 mL syringe (Sigma-Aldrich) was stacked with 10 mL of

133 Sepharose™-CL2B resin (Sigma-Aldrich) and washed with 0.22 μm filtered
134 phosphate-buffered saline (PBS). 1 mL of ExtPg was loaded onto the column, and a
135 total of 20 fractions of 0.5 mL each were collected using filtered PBS as elution buffer.
136 NVs-enriched fractions (fractions 6-10) were then combined and further
137 concentrated using an Amicon™ Ultra-4 Centrifugal Filter unit (Millipore) by
138 centrifugation at 3,000 x g for 15 min at 4 °C. This method was used to obtain three
139 distinct PgNV samples: Natural-NVs (Nat-PgNVs), Pasteurized-NVs (Pas-PgNVs) and
140 Lyophilized-NVs (Lyo-PgNVs). Protein concentration was assessed with the Micro
141 BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), following lysis of NVs in Milli-Q®
142 water with 0.05% Triton™-X-100 and 0.01% SDS. Absorbance was measured at 595
143 nm using an iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad).

144

145

146 **2.3. Proteomic analysis**

147 To examine the effects of industrial processing on the NV proteome, a proteomic
148 analysis was performed following previous established protocols (Sánchez-López
149 et al., 2022; 2024).

150 Briefly, an automated low-input proteomics pipeline was used, based on the single-
151 pot solid-phase-enhanced sample preparation (SP3) method. Prior to sample
152 processing and to remove contaminants, a 1:1 combination of two different types of
153 carboxylate-modified magnetic particles (Thermo Scientific Sera-Mag SpeedBeads™)
154 was used. Samples were dried and dissolved in 30 μL of 50 mM ammonium
155 bicarbonate (ABC) and mixed with 4 μL of beads per sample. Acetonitrile (ACN) was
156 then added to achieve a final concentration of 70%, and the mixture was briefly

157 vortexed, incubated for 20 min at room temperature, and placed on a magnetic rack,
158 discarding the supernatant. Beads were subsequently washed twice with 200 μ L of
159 70% ethanol and once with 180 μ L of ACN, then allowed to dry to ensure complete
160 removal of ACN. For elution, beads were resuspended in 45 μ L of 50 mM ABC buffer
161 and digested overnight with 500 ng trypsin (Promega) at 37 °C. Digestion was
162 stopped with 60 μ L of 10% trifluoroacetic acid (TFA). The supernatants containing
163 peptides were collected and concentrated to 10 μ L using a speed vacuum
164 concentrator. Peptide mixtures were analyzed by liquid chromatography and
165 tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). For each sample, 5 μ L of the resulting
166 mixtures were delivered to a trap column, desalted, and then loaded onto an
167 analytical column, with elution carried out using a linear gradient of 15 to 40% ACN
168 over 60 min. Peptides were analyzed on a nanoESI QTOF mass spectrometer
169 (6600plus TripleTOF, Sciex) using data-dependent acquisition, with MS1 scans from
170 350–1400 m/z for 250 ms and MS2 experiments from 100–1500 m/z for 25 ms in
171 ‘high sensitivity’ mode.

172 Protein identification was performed using the ProteinPilotv5.0. search engine, and
173 the Paragon algorithm to search the *Uniprot_Punica granatum* database (Shilov et
174 al., 2007). For label-free quantitative proteomics, peptides data were processed in
175 Marker View 1.3 (Sciex). Firstly, areas were normalized by total areas summa, and
176 then a principal components analysis (PCA), discriminant analysis (DA) and a Student
177 t-test were performed. The remaining uncharacterized identifications were further
178 searched on NCBI databases (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the basic local
179 alignment search tool (BlastP) (Altschul et al., 1990). Protein–protein interaction
180 networks of the identified proteins were created using the STRING database with
181 default parameters, using ‘high confidence’ (0.150)(Szkłarczyk et al., 2023). Gene

182 Ontology (GO) analysis was performed using the Panther-GO system (Online version
183 19.0, <http://www.pantherdb.org/>).

184

185 **2.4. Nanoparticle tracking analysis (NTA)**

186 The size distribution and concentration of NVs were determined using nanoparticle
187 tracking analysis (NTA) with a NanoSight LM10 instrument (Malvern Instruments
188 Ltd.) as previously described (Sánchez-López et al., 2022). Images were taken with
189 manual monitoring of temperature. Samples were diluted with 0.22 µm filtered PBS
190 to reach the concentration (20-120 particles/frame) recommended by the
191 manufacturer.

192 **2.5. Transmission electron microscopy (TEM)**

193 Samples were processed as previously reported (Sánchez-López et al., 2022), and
194 analyzed with a Hitachi HT7800 transmission electron microscope (Servicio Central
195 de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE), Universitat de València),
196 operating at 100 kV. Images were recorded with an EMSIS XAROSA digital CMOS
197 camera and the size of the NVs was determined using Olympus image analysis
198 software.

199 **2.6. Immunogold staining**

200 Immunogold labeling of NVs was performed at the Príncipe Felipe Research Center
201 of Valencia. Samples containing NVs were fixed in 2% paraformaldehyde in PBS for
202 30 min, and carbon-coated nickel grids were used. The grids containing the NVs were
203 washed in PBS and blocked with PBS/0.1M glycine/0.3% BSA for 10 min. The grids
204 were then incubated for 1 h with anti-*Arabidopsis thaliana* TET8 antibodies
205 (PhytoAB, PHY1490A) (dilution 1:50). After a 20-min wash, the grids were exposed

206 to goat anti-rabbit secondary antibodies (Abcam) conjugated with 12 nm gold
207 particles (dilution 1:20) for 1 h. As a control, samples incubated only with secondary
208 antibodies were used. Grids were then washed in a PBS/0.1M glycine solution,
209 negatively stained, and observed using a Hitachi HT7800 transmission electron
210 microscope as specified in section 2.5.

211 **2.7. ELISA**

212 Maxisorp microtiter™ plates (Thermo Fisher Scientific) were coated overnight at 4°C
213 with 5 µg of *PgNVs* samples in 50 mM carbonate buffer (pH 9.6). The coated plates
214 were washed three times with PBS containing 0.05% Tween® 20 (PBS-T) (Bio-Rad)
215 and the uncoated sites were blocked with 5% BSA in PBS-T for 1 h at 37°C. Samples
216 were incubated for 1.5 h at 37°C with anti-*Arabidopsis thaliana* TET8 antibodies
217 (PhytoAB, PHY1490A), using a 1:50 dilution. The plates were then washed three
218 times with PBS-T and incubated with 100 µL of goat anti-rabbit horseradish
219 peroxidase conjugate (Bio-Rad). The secondary antibody incubations were
220 performed for 1 h at 37°C, followed by three washes with PBS-T. Subsequently, the
221 plates were incubated in the dark for 15 min at RT, with 50 µL of substrate solution
222 (0.012% hydrogen peroxide, 0.4 mg/mL ortho-phenylenediamine (Sigma-Aldrich) in
223 a 0.05 M phosphate-citrate buffer, pH 5.0). The reaction was stopped with 50 µL of
224 3 M HCl. Absorbance was measured at 490 nm using an iMark™ microplate
225 absorbance reader (Bio-Rad).

226 **2.8. Cell lines and culture conditions**

227 The human monocytic leukemia cell line, THP-1-XBlue™-CD14 (InvivoGen), was
228 grown and maintained in RPMI 1640 medium with L-glutamine (Gibco). The HepG2
229 human hepatoma and the Caco-2 human colon epithelial cell lines (ATCC®, refs. HB-
230 0865 and HTB-37, respectively) were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's

231 Medium (DMEM) with high glucose and L-glutamine (Gibco). Culture media was
232 supplemented with 100 µg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin (both from Sigma-
233 Aldrich), and 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco). All cell types were maintained in
234 75 cm² flasks under an atmosphere of 5% CO₂ and 100% humidity at 37 °C. THP-1-
235 XBlue™-CD14 monocytes were differentiated into macrophages by stimulating them
236 with 100 ng/mL of phorbol 12-myristate 3-acetate (PMA, Sigma-Aldrich) for 72 h.
237 Following differentiation, the culture medium was replaced with fresh medium and
238 cells were cultured additional 72 h before treatment application.

239 **2.9. *In vitro* assays**

240 **2.9.1. Evaluation of NVs uptake by human macrophages**

241 THP-1-XBlue™-CD14 cells were seeded in 24-well plates at a density of 1 x 10⁵
242 cells/well and differentiated into macrophages as outlined in section 2.8. Cells were
243 then incubated with either PBS, FM™4-64-labeled liposomes, or FM™4-64-labeled
244 Nat-PgNVs, Pas-PgNVs or Lyo-PgNVs, all at a concentration of 5,000 particles per
245 cell, in serum-free medium. Incubation was carried out for 1, 2, or 4 h at either 37°C
246 or 4°C. Following incubation, cells were washed twice with PBS to remove any non-
247 internalized lipid particles. Fluorescence corresponding to FM™4-64 was measured
248 using a BD LSR-Fortessa™ flow cytometer (Beckton Dickinson Biosciences). Cells
249 were gated by side scatter (SSC-A) versus forward scatter area (FSC-A), with clumped
250 cells and debris excluded through forward scatter height (FSC-H) versus FSC-A.
251 Positive cells for NV uptake were gated based on their mean fluorescence intensity
252 (MFI) levels relative to untreated controls. Flow cytometry data were analyzed using
253 FlowJo™ software (v10 version, BD Biosciences).

254 For laser confocal microscopy, cells were stained with the CellTracker™ Violet BMCQ
255 dye (Thermo Fisher Scientific), added to a final concentration of 1 µM and incubated

256 for 30 min at 37°C following treatments. Imaging was performed using an Olympus
257 FV1000 confocal microscope (Olympus Corporation), and images were analyzed
258 using the Olympus FV10-ASW 4.2 software (Olympus Corporation). Optical
259 excitation was achieved using argon laser beams at 405, 488, and 559 nm for
260 channels 1, 2, and 3, respectively. Unlabeled cells, as well as NVs and liposomes,
261 served as internal controls. Control samples without labeling were also included for
262 both FACS and confocal experiments to confirm specificity.

263 **2.9.2. Antioxidant activity and evaluation of the cell viability**

264 THP-1-XBlue™- CD14, HepG2 or Caco-2 cells were seeded in 96-well plates at a
265 density of 1.5×10^4 cells per well, and cultured for three days at 37 °C, 5% CO₂ and
266 100% humidity. To examine the protective effect of *PgNVs* against oxidative stress
267 induced by hydrogen peroxide (H₂O₂), cells were pretreated with either PBS or *PgNVs*
268 (5 µg/mL) and incubated for 24h under the same culture conditions. After this
269 pretreatment, cells were exposed to various H₂O₂ concentrations (ranging from 25
270 to 1000 µM) in filtered PBS. The specific range of H₂O₂ concentrations for each cell
271 line was chosen based on preliminary assays (data not shown). Cells were then
272 incubated for additional 24 h at 37 °C, 5% CO₂ and 100% humidity. Cell viability was
273 assessed using the 3(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
274 (MTT, Sigma-Aldrich) colorimetric assay. For this, cells were washed with PBS and
275 fresh medium, then 10 µL of MTT solution was added to each well (final
276 concentration of 0.5 mg/mL). As cytotoxicity control, cells treated with a
277 concentration of 20% of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich) were included.
278 After 4h of incubation, 180 µL of DMSO were added to dissolve the formazan
279 crystals, and absorbance was measured at 570 nm and 695 nm in a microplate reader
280 (iMark™ microplate absorbance reader (Bio-Rad)). Final values were obtained by

281 subtracting the background absorbance (695 nm) to the signal absorbance (570 nm)
282 values. Results are presented as a percentage of ΔA relative to untreated control
283 cells (100% of MTT transformed).

284 **2.9.3. QUANTI-Blue™ assay**

285 THP-1-XBlue™-CD14 is a cell line derived from the THP-1 monocytic cell line via
286 transfection of a reporter construct expressing a secreted embryonic alkaline
287 phosphatase (SEAP) gene under the control of an inducible promoter by NF- κ B and
288 AP1. Therefore, the measurement of NF- κ B expression was conducted using the
289 Quanti-blue™ colorimetric reagent (InvivoGen), which facilitates monitoring of SEAP
290 production, according to the manufacturer's instructions. THP-1-XBlue™-CD14
291 monocytes were differentiated into macrophages using PMA as described in section
292 2.8. Macrophages were then treated with either PBS, *Pg*NVs at concentrations of 2.5,
293 5 and 10 μ g/mL, or 300 ng/mL of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* K12
294 (InvivoGen) as a control for inflammation. In parallel, to assess the potential anti-
295 inflammatory effects of these treatments, macrophages were pre-stimulated with
296 300 ng/mL of LPS 1 h before treatments. All treatments were carried out in serum-
297 free medium. Following 24 h of incubation at 37°C, 5% CO₂ and 100% humidity, 20
298 μ L of each cell culture supernatant was mixed with 180 μ L of Quanti-blue™ reagent,
299 and incubated for 5 h at 37°C. Optical density was measured at 655 nm using a
300 microplate reader (iMark™ microplate absorbance reader, Bio-Rad).

301 **2.9.4. Wound-healing assay**

302 Caco-2 cells were seeded in a 24-well plate at a density of 3×10^5 cells per mL under
303 the conditions described in section 2.8, until confluence was reached. Confluent cells
304 were scratched using a 1000 μ L pipette tip after removing the medium to simulate

305 wounding. Cells were then washed with PBS and replaced with fresh medium
306 supplemented with 10% FBS. Then, cells were treated either with PBS, or 5 µg/mL of
307 either Nat-PgNVs, Pas-PgNVs or Lyo-PgNVs. Dexamethasone (Sigma-Aldrich) was
308 also added to a final concentration of 10 µM as negative control for wound healing.

309 Wound closure was photographed using an inverted microscope Eclipse TE2000-S
310 (Nikon) attached to a Nikon F-601 camera at 40x magnification at 0 and 24 h.
311 Migration rate area was calculated after measuring wound with ImageJ software
312 (Schneider et al., 2012), using the following formula: migration area (%) = $(A_0 -$
313 $A_t)/A_0 \times 100$. A_0 represents the initial wound area at day 0, and A_t the remaining
314 wound area the following day.

315 **2.9.5. NVs labeling and proteinase K treatment**

316 The internalization efficiency and rate of NVs derived from various pomegranate
317 juices were evaluated using confocal microscopy and flow cytometry, respectively,
318 following previously described protocols (Sánchez-López et al., 2024). Synthetic
319 liposomes, prepared by the thin-film hydration method (Guillot et al., 2021),
320 provided by Dr. Antonio José Guillot and Dr. Ana Melero from the Universitat de
321 València, were used as internal controls for labeling and uptake. To eliminate other
322 contaminants, synthetic liposomes were also processed through SEC purification
323 before labeling. 3×10^{11} particles, quantified by NTA, were incubated with the dye
324 FM™4-64 (Thermo Fisher Scientific) at a final concentration of 2.5 µM, for 45 min at
325 37°C. To remove excess of FM™4-64, NVs and liposomes were re-isolated by SEC,
326 using small columns with 1 mL of stacked Sepharose™ CL-2B (Sigma Aldrich), and the
327 NV-enriched fractions were pooled and concentrated using an Amicon® Ultra-4
328 (10000 MW, Millipore) by centrifugation at $3,200 \times g$ for 15 min at 4°C. Some PgNVs
329 preparations (including Nat-PgNVs, Pas-PgNVs or Lyo-PgNVs) were treated with

330 Proteinase K (Invitrogen) before FM™4-64 labeling. For that, *PgNVs* were diluted to
331 a concentration of 6×10^{11} particles with filtered PBS and incubated with 10 µg/mL
332 of Proteinase K (Invitrogen) for 1 h at 37 °C with gentle agitation. After treatment,
333 proteinase K was removed using SEC with a 1 mL column. NTA was performed
334 following SEC re-isolation to quantify the particle concentration prior to FM™4-64
335 labelling to ensure homogenous labeling conditions.

336 **2.10. Statistical analysis Data**

337 Data are presented as mean \pm SD unless otherwise specified, in which case mean \pm
338 SEM is reported. Statistical significance was assessed using one-way ANOVA. For
339 parameters that did not follow a normal distribution, the non-parametric Kruskal–
340 Wallis test was applied. *p* values < 0.05 were considered statistically significant. All
341 analyses and graphical representations were generated using GraphPad Prism 8
342 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

343 **3. Results and discussion**

344 **3.1. Pasteurization and lyophilization reduce the yield and purity of *PgNVs*.**

345 Thermal treatment remains the conventional method for juice preservation and is
346 widely recognized as one of the most cost-effective techniques to ensure microbial
347 safety and extend product shelf life (Ağçam et al., 2018). However, this approach
348 often negatively impacts sensory qualities and leads to the degradation of heat-
349 sensitive nutrients, such as vitamins and bioactive compounds, prompting the
350 development of other preservation techniques, including freeze-drying (Sarbatly
351 et al., 2023). While this alternative technique helps the preservation of nutritional
352 and sensory attributes, it still can impact the compositional integrity and physical

353 properties of the juice, potentially affecting consumer acceptance and product
354 stability (Martínez-Navarrete et al., 2019; Silvan et al., 2020; Uscanga et al., 2021).

355 Although no studies have examined the impact of preservation treatments on NVs
356 from fruit juices, several investigations have been carried out on milk EVs (Kleinjan
357 et al., 2021; Turner et al., 2023; Colella et al., 2023). They show that thermal
358 treatments applied to milk reduce EVs concentrations significantly (Kleinjan et al.,
359 2021; Colella et al., 2023), and exposure to high-temperature conditions ($\geq 135^{\circ}\text{C}$ for
360 ≥ 1 s) can lead to complete loss of detectable EVs (Kleinjan et al., 2021). On the other
361 hand, it was demonstrated that lyophilization of milk affects the concentration of
362 EVs, reducing their levels compared to the EVs from fresh milk samples (Turner et al.,
363 2023).

364

365 In this work, we studied *PgNVs* from *PgJ* subjected to pasteurization or
366 lyophilization. *PgNVs* were isolated using a combination of differential
367 centrifugation, tangential flow filtration (TFF), and size exclusion chromatography
368 (SEC), as previously described (Sánchez-López et al., 2022) (Fig. 1A). *PgNVs* were
369 then characterized in terms of size, morphology and concentration using
370 nanoparticle tracking analysis (NTA) and transmission electron microscopy (TEM)
371 (Fig. 1B). Although the EV-track database is mainly focused on mammalian EV, an
372 EV-track analysis was performed based on these data (EV-track ID EV240200) (EV-
373 TRACK Consortium et al., 2017).

374 NTA measurements showed that there were no significant changes in the mode size
375 of *PgNVs* after the treatments, a finding confirmed by TEM (Fig. 1B). Notably, while
376 Nat-*PgNVs* exhibited a wide range of morphologies, Pas-*PgNVs* and Lyo-*PgNVs* were

377 predominantly round-shaped (Fig. 1B). Interestingly, while no significant differences
378 were found in the protein concentration between treatments (Fig 1C), the mean
379 particle concentration of the isolated Nat-*Pg*NVs samples ($4.26 \pm 1.44 \times 10^{11}$
380 particles/mL) was nearly twice the concentration displayed by Lyo-*Pg*NVs ($2.46 \pm$
381 1.33×10^{11} particles/mL) and Pas-*Pg*NVs ($2.89 \pm 1.14 \times 10^{11}$ particles/mL) (Fig. 1D).

382 Additionally, we analyzed the ratio between particle number and protein
383 concentration as a measure of *Pg*NVs purity (Webber & Clayton, 2013; Welsh et al.,
384 2024). All *Pg*NVs preparations showed high particle/protein ratios, however, Nat-
385 *Pg*NVs ($4.6 \pm 5.39 \times 10^{10}$ particles/ μg protein) displayed a significantly higher ratio
386 than Lyo-*Pg*NVs ($0.7 \pm 0.87 \times 10^{10}$ particles/ μg protein) and Pas-*Pg*NVs (0.65 ± 0.87
387 $\times 10^{10}$ particles/ μg protein) samples (Fig. 1E).

388 Leng and colleagues observed that both Low-Temperature Long-Time (LTLT) and
389 High-Temperature Short-Time (HTST) thermal treatments altered the morphology
390 and increased the size of blueberry NVs, with HTST inducing more pronounced
391 changes (Leng et al., 2023). Based on these findings, we selected LTLT for our
392 experiments with *PgJ*, as it appeared to better preserve nanovesicles integrity.
393 Notably, these thermal treatments were applied to blueberry NVs already isolated
394 by SEC, whereas NVs within their native matrix are less susceptible to degradation
395 or aggregation due to the protective effects of surrounding proteins and lipids
396 (Gelibter et al., 2022). Interestingly, although both pasteurization and lyophilization
397 reduced NVs concentration per mL of *PgJ*, the particle/protein ratio increased.

398 Schulz et al. (2020) hypothesized that thermal treatment could disrupt EVs resulting
399 in reduced particle concentration and the release of encapsulated proteins, which
400 could in turn increase the protein concentration in the sample. However, in isolated
401 EVs from pasteurized milk, the protein content was found to be actually lower when

402 compared to untreated milk (Colella et al., 2023). These authors used differential
403 ultracentrifugation to isolate milk-EVs, a technique that might co-isolate soluble
404 proteins within the EV sample (Sidhom et al., 2020). These additional co-isolated
405 proteins could be also affected by the treatments, potentially influencing the results.

406

407 **3.2. *PgJ* processing induces changes in the proteomic content of *PgNVs* mainly** 408 **affecting membrane-related proteins**

409 *PgJ* is composed by a complex matrix of molecules, including polyphenols, organic
410 acids, vitamins, sugars, lipids and proteins (Bar-Ya'akov et al., 2019). Moreover,
411 plant-derived NVs differ from mammalian EVs in their composition, which impacts
412 their function, bioavailability, and stability (Wang et al., 2022; Alzahrani et al., 2023).
413 The application of industrial treatments can alter the composition of *PgJ* soluble
414 matrix and affect the membrane structure of *PgNVs*, potentially damaging their
415 lipids, sugars or membrane proteins. These alterations may lead to changes in the
416 interactions of *PgNVs* with soluble molecules from *PgJ*, modifying their adsorption
417 to *PgNVs* and their corona composition (Galindo et al., 2007).

418 To further investigate the potential impact of industrial juice processing on *PgNVs*,
419 we compared the protein cargo of Nat-*PgNVs* with Pas-*PgNVs* and Lyo-*PgNVs* using
420 label-free quantitative proteomics. We considered proteins achieving greater than
421 95% confidence, a false discovery rate (FDR) of less than 1% and a significance
422 threshold of $p < 0.05$ (Table 1 and Supplementary Table 1). Comparative analysis
423 revealed that Nat-*PgNVs* contained 14 upregulated and 2 downregulated proteins
424 relative to Pas-*PgNVs*. In contrast, the comparison between Nat-*PgNVs* and Lyo-

425 *Pg*NVs identified 5 upregulated and 11 downregulated proteins in Nat-*Pg*NVs (Table
426 1).

427 To obtain a comprehensive overview of the protein cargo showing significant
428 differences after treatments, proteins were classified by Gene Ontology (GO) into
429 three broad categories: "biological process", "molecular function" and "cellular
430 component" (Fig. 2A and Supplementary Table 2). The GO biological process
431 analyses showed that industrial treatments primarily affected proteins involved in
432 metabolic processes (Ubiquitin-NEDD8-like protein RUB2, Prosaposin, Chitinase III,
433 Chitinase, glutathione transferase) and response to stimulus (Elongation factor 1-
434 gamma-like, Water stress and hypersensitive response domain-containing protein,
435 Annexins, Phosphoprotein ECPP44, Heat shock cognate protein 80), although
436 proteins involved in transport processes or signaling also showed affected levels (Fig.
437 2A). Within the GO "molecular function" category, the most prevalent GO term was
438 "binding", encompassing over 45% of the proteins, followed by "hydrolase activity",
439 "other catalytic activity" and "transmembrane transporter activity" (Fig. 2A and
440 Supplementary Table 2). Interestingly, the GO cellular component analyses revealed
441 that 34% of the significantly altered proteins were membrane proteins (CASP-like
442 protein, Elongation factor 1-gamma-like, H(+)-exporting diphosphatase, Fasciclin-
443 like arabinogalactan protein 9, ADP-ribosylation factor, Copper transport protein,
444 Monosaccharide-sensing protein 2-like, Phosphoprotein ECPP44, Tetraspanin-8)
445 (Fig. 2A).

446 To assess potential protein-protein interactions where proteins with altered levels
447 should be involved, we used STRING analyses (Szklarczyk et al., 2023) (Fig. 2B).
448 Although only 14 proteins of the 32 up- or down-regulated proteins showed results
449 in STRING, the analyses revealed a network of interactions among most of these

450 proteins. Notably, the only functional enrichment detected in our network within
451 the GO “Biological Process” category was “Response to temperature stimulus”, a
452 process highly correlated with thermal treatments applied to *PgJ* (Supplementary
453 Table 3).

454 As far as we know, research on EVs corona is limited. The corona, which is mainly
455 composed by proteins, has been shown to greatly impact EV functionality, although
456 studies on the corona in plant-derived EVs and NVs have not been yet conducted
457 (Buzás, 2022; Wolf et al., 2022). Our ‘*label free*’ quantitative proteomics approach
458 reveals that a significant percentage of the proteins, with altered levels in *PgNVs*
459 after pasteurization or lyophilization, were membrane proteins. TEM visualizations
460 showing altered morphology in *PgNVs* following the treatments support this notion.

461 Notably, the plant EV biomarkers Tetraspanin-8 (TET-8) and Patellin-3 (PATL3)
462 (Rutter & Innes, 2017; Ambrosone et al., 2023) were among the membrane and
463 membrane-associated proteins, showing significant differences upon *PgJ* processing.
464 PATL3 levels were 6.5-fold higher in Nat-*PgNVs* when compared to Pas-*PgNVs* and
465 2.4-fold higher when compared to Lyo-*PgNVs* (Table 1). PATL3, a plasma membrane
466 protein crucial for vesicle and membrane trafficking events, has been shown to be
467 highly expressed in NVs derived from various citrus juices (Pocsfalvi et al., 2018; Zhou
468 et al., 2019).

469 Similarly, TET-8 levels were 2.6 times higher in Nat-*PgNVs* when compared to Pas-
470 *PgNVs* ($p= 0.062$) and 3.3 times higher than in Lyo-*PgNVs* (Table 1; Supplementary
471 Table 1). To confirm these results, we next performed negative TEM-immunogold
472 staining using anti-TET8 antibodies (Fig. 2C). As shown in Figure 2C, TET-8 was
473 detected on the surface of all *PgNVs*, although its presence on Pas-*PgNVs* and Lyo-

474 *PgNVs* was markedly reduced. This was reflected in the ratio of gold particles per
475 *PgNV*, which differed significantly between *Nat-PgNVs* and the treated *PgNVs* (Fig.
476 2D). To further validate these findings, ELISA assays were performed. These assays
477 confirmed that TET8 levels were higher in *Nat-PgNVs* than in treated samples,
478 confirming the results from proteomic and TEM-immunogold assays (Fig. 2E).
479 Consistent with our findings, Santangelo and colleagues demonstrated that TET8
480 levels in *NVs* from soaked, soaked-roasted, roasted, and blanched almonds were
481 reduced compared to those in raw almonds (Santangelo et al., 2024).

482 Tetraspanins are transmembrane proteins that associate with a variety of receptors
483 and signaling molecules on the cell membrane (Andreu & Yáñez-Mó, 2014). TET8
484 may play a key role in uptake mechanisms in plants. Further evidence of TET8
485 importance in intercellular communication comes from studies showing that levels
486 of host small RNAs transferred into fungal cells are reduced in *tet8tet9* mutants,
487 suggesting that TET8 and TET9 contribute to plant immunity by facilitating the
488 transfer of small RNAs into fungal cells (Cai et al., 2018). In mammals, it has been
489 shown that variations in tetraspanins expression can regulate how EVs are targeted
490 and taken up by recipient cells, influencing cellular responses through specific
491 adhesion and signaling interactions. In fact, CD9, CD63 and CD81, considered
492 markers of EVs in mammals, facilitate specific uptake pathways and enable targeting
493 to specific cells or tissues (Jankovičová et al., 2020). Although studies on the impact
494 of industrial treatments on Tetraspanin levels in mammalian EVs are limited, it has
495 been shown that different heat treatments applied to milk result in a decrease in
496 CD9 levels (Kleinjan et al., 2021).

497 **3.3. Industrial treatments reduce internalization of NVs**

498 As membrane proteins are shown to be crucial for EVs internalization by recipient
499 cells (Andreu & Yáñez-Mó, 2014; Jankovičová et al., 2020), we aimed to assess the
500 effect of industrial treatments in the uptake of *PgNVs*. Cells were treated with either
501 PBS, FM™4-64-labeled liposomes (synthetic lipid particles used as internal control),
502 Nat-*PgNVs*, Lyo-*PgNVs* or Pas-*PgNVs* at a concentration of 5000 particles per cell and
503 incubated for 30 min, 1h or 2h. All NV labelling was performed as previously reported
504 (Sánchez-López et al., 2024). The internalization was measured by flow cytometry
505 and confocal microscopy (Fig. 3). Uptake was evaluated by fold change in the mean
506 fluorescence intensity (MFI) relative to Nat-*PgNVs*-treated cells, and by measuring
507 the percentage of cells positive for FM™4-64 fluorescence (Fig. 3 A, B). Nat-*PgNVs*
508 were internalized more efficiently by macrophages at each time point, with Lyo-
509 *PgNVs* and Pas-*PgNVs* treatments showing reduced MFI levels and a lower
510 percentage of positive labeled cells. Nonetheless, all *PgNVs* preparations
511 demonstrated higher uptake levels than synthetic liposomes (Fig. 3). When THP-1-
512 XBlue™-CD14 macrophages were incubated with each treatment at 4 °C, the MFI
513 signal and the percentage of positive cells drastically decreased, indicating that
514 uptake was energy-dependent (data not shown).

515 The mechanisms underlying the docking and uptake of EVs by recipient cells remain
516 poorly understood. In mammals, several uptake pathways have been proposed,
517 including clathrin-mediated endocytosis, phagocytosis, macropinocytosis, and
518 fusion with plasma or endosomal membranes. In addition, lipid rafts and specific
519 protein-protein interactions are thought to play a role in EV uptake (Mulcahy et al.,
520 2014; Liu & Wang, 2023). Similar mechanisms have been reported in plants. For
521 instance, fingerroot-derived NVs are internalized by colorectal cancer cells (HT-29
522 and HCT116) via phagocytosis and caveolae-mediated endocytosis
523 (Wongkaewkhiaw et al., 2022). Similarly, ginger-derived nanolipids are phagocytosed

524 by Colon-26 and HT-29 cells (Zhang et al., 2016), and garlic-derived NVs were
525 internalized by HepG2 cells through the interaction of CD98 glycoproteins with
526 lectin-like proteins (Song et al., 2020).

527 To assess whether surface proteins were involved in the observed differences on
528 *Pg*NVs uptake by THP-1-XBlue™-CD14 macrophages, *Pg*NVs samples were exposed
529 to a proteinase K (PK) soft treatment, which digests surface-localized proteins while
530 maintaining the integrity of the lipid bilayer, ensuring that the structural integrity of
531 the NVs remains uncompromised (Cvjetkovic et al., 2016). Following PK treatment,
532 *Pg*NVs were re-purified by SEC, labeled with FM™4-64, and applied to THP-1-XBlue™-
533 CD14 cells as previously described. As shown in Figure 4, the uptake of Nat-*Pg*NVs
534 decreased significantly upon PK treatment, reaching levels comparable to those
535 observed with Pas-*Pg*NVs or Lyo-*Pg*NVs. In contrast, PK treatment showed minimal
536 effect on the uptake of Pas-*Pg*NVs and Lyo-*Pg*NVs, even yielding higher MFI, implying
537 better internalization in the treated versions compared to the untreated ones (Fig. 4
538 A, B).

539 These findings support the hypothesis that membrane and/or corona proteins are
540 degraded during industrial processing prior to PK addition. It is possible that the
541 membrane damage during pasteurization and lyophilization allows interaction with
542 other soluble proteins within *Pg*J matrix, thus altering the protein composition
543 associated with *Pg*NVs and masking some potential selective interactions with
544 macrophages. This degradation may contribute to the reduced uptake observed in
545 processed *Pg*NVs. Similar results were found with garlic-derived NVs subjected to
546 trypsin digestion, which reduced cellular uptake due to both surface proteins
547 degradation and lipid structure rearrangement (Song et al., 2020).

548

549

550 **3.4. Industrial processed *PgNVs* do not affect NF- κ B expression in LPS-treated**
551 **THP-1-XBlue™ CD14 cells**

552 It might be the case that differences in docking and uptake likely contribute to the
553 observed differences in NVs functionality *in vitro*. EV and NV membranes are not
554 merely passive carriers of cargo, they actively participate in signaling events. By
555 presenting specific molecules at the surface, EVs can directly interact with receptors
556 on target cells initiating responses such as intracellular signaling pathways, even
557 without requiring internalization (Jahnke & Staufer, 2024).

558 Previous results confirmed that *PgNVs* induce a potent anti-inflammatory effect on
559 human THP-1-XBlue™-CD14 macrophages (Sánchez-López et al., 2022). Hence, to
560 further investigate the impact of industrial processing on the functional properties
561 of *PgNVs*, we analyzed the effect of the Nat-*PgNVs*, Lyo-*PgNVs* and Pas-*PgNVs* on
562 NF- κ B expression in these human macrophages. We tested three different
563 concentrations of *PgNVs* (2.5, 5 and 10 μ g/mL) to avoid any potential influence of
564 particle/protein ratio differences among the samples on the results.

565 Confirming previous findings, *PgNVs* did not significantly alter NF- κ B expression, in
566 contrast to the substantial increase induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS), a
567 known pro-inflammatory agent (Fig. 5A). However, Pas-*PgNVs* slightly increased NF-
568 κ B levels at the highest concentration tested (10 μ g/mL) (Fig. 5A). This modest
569 increase could be attributed to subtle changes in the protein corona adsorbed to
570 Pas-*PgNVs*, which may lead to interactions with cellular receptors that initiate
571 inflammatory signaling pathways (Wolf et al., 2022). However, these effects appear
572 to be minor and may not be significant at *PgNVs* concentrations typically found in
573 juice.

574 To assess the anti-inflammatory potential of *PgNVs*, THP-1-XBlue™-CD14
575 macrophages were pretreated with LPS for 1 h, followed by a treatment with either
576 PBS, Nat-*PgNVs*, Lyo-*PgNVs* or Pas-*PgNVs*. NF-κB levels were determined 24 h after
577 *PgNVs* administration. Notably, only Nat-*PgNVs* inhibited NF-κB expression, even at
578 the lowest concentration (2.5 μg/mL) (Fig. 5B). In contrast, neither Lyo-*PgNVs* nor
579 Pas-*PgNVs* induced a significant modulatory effect in NF-κB expression, suggesting
580 that the industrial processing reduces the anti-inflammatory effect of *PgNVs* (Fig.
581 5B).

582 **3.5. The antioxidant properties of *PgNVs* remain unaffected by industrial** 583 **processing**

584 Thermal treatments and freeze-drying applied to different fruits and their products,
585 including juices, alter their nutritional composition, often affecting both their
586 antioxidant content and antioxidant capacity (Shofian et al., 2011; Petruzzi et al.,
587 2017). In this context, previous results suggested that Nat-*PgNVs* used at 5 μg/mL,
588 but not 10 μg/mL, provided a protective effect against H₂O₂-induced oxidative stress
589 in Caco-2 intestinal cells (Sánchez-López et al., 2022).

590 To further evaluate this protective capacity, MTT assays were carried out using
591 HepG2, Caco-2, and THP-1-XBlue™-CD14 human cell lines pre-treated either with
592 PBS, Nat-, Pas-, or Lyo-*PgNVs* (5 μg/mL) before exposure to varying H₂O₂
593 concentrations for 24 h (Fig. 6). DMSO was also used as cytotoxic internal control.
594 Preliminary experiments confirmed that increasing concentrations of Nat-, Pas-, and
595 Lyo-*PgNVs* (ranging from 5 to 20 μg/mL) did not induce cytotoxic effects in any of
596 the cell lines tested (Supplementary Fig. 1).

597 HepG2 cells pretreated with *PgNVs*, followed by exposure to 100 μM H₂O₂, displayed
598 a significant increase in viability (Nat-*PgNVs* 73.86 ± 20.80%; Lyo-*PgNVs* 71.35 ±

599 25.58%₇; Pas-*PgNVs* 67.34 ± 24.57%, MTT transformed) compared to cells pretreated
600 with PBS (42.11 ± 7.8% MTT transformed) (Fig. 6A). In Caco-2 cells, only Nat-*PgNVs*
601 significantly enhanced viability following exposure to 200 µM H₂O₂. However, at a
602 lower H₂O₂ concentration (50 µM), all *PgNVs* demonstrated significant antioxidant
603 effects, with MTT reduction of 93.02 ± 7.06% (Nat-*PgNVs*), 87.11 ± 18.37% (Lyo-
604 *PgNVs*), and 89.75 ± 17.52% (Pas-*PgNVs*), compared to 67.87 ± 14.97% for PBS
605 pretreatment (Fig. 6B). No protective effect was observed in THP-1-XBlue™-CD14
606 cells, which were exposed to high H₂O₂ concentrations (Fig. 6C).

607 The absence of differences in antioxidant properties may be attributed to the
608 presence of well-characterized antioxidant enzymes within *PgNVs*, which can
609 detoxify and mitigate H₂O₂-induced oxidative stress independently of host cell
610 interaction. Future studies should determine whether these enzymes remain
611 unaffected by the treatments.

612 **3.6. Industrial processes decrease wound-healing activity**

613 Previously, our group demonstrated that Nat-*PgNVs* significantly promote wound
614 closure in intestinal epithelial cells, suggesting their therapeutic potential (Sánchez-
615 López et al., 2022). However, those assays were performed in absence of FBS, which
616 may influence the efficacy of the obtained results. Given that *PgJ* is an ingested
617 product, the use of an intestinal epithelial model is particularly relevant. To
618 investigate the effects of industrial processing on the wound-healing activity of
619 *PgNVs*, we here conducted a comparative scratch assay on Caco-2 cells in medium
620 containing 10% FBS, testing the healing efficacy of either PBS, Nat-, Lyo- or Pas-
621 *PgNVs*. *PgNVs* were added at a final concentration of 5 µg/mL, the optimal
622 concentration determined in previous studies (Sánchez-López et al., 2022).
623 Dexamethasone, a well-known glucocorticoid, was included as a negative control.

624 After 24 h of treatment, scratch closure percentages were calculated, showing that
625 Nat-*Pg*NVs favor significantly wound closure ($81.89 \pm 18.04\%$ of wound healed)
626 compared to Lyo-*Pg*NVs ($52.49 \pm 27.33\%$ of wound healed) and Pas-*Pg*NVs ($55.19 \pm$
627 24.41% of wound healed) (Fig. 7). Notably, only Nat-*Pg*NVs significantly improved
628 wound healing efficacy compared to PBS-treated cells ($60.13 \pm 16.67\%$ of wound
629 healed) (Fig. 7).

630 The observed differences in functionality after industrial treatments emphasize the
631 probable significant loss of therapeutic activity in commercial *Pg*J, underscoring the
632 need for improved processing methods. Further studies are needed to assess
633 whether higher concentrations of industrial processed *Pg*NVs could achieve a
634 therapeutic potential similar to that of Nat-*Pg*NVs. One key consideration in our
635 approach was that pasteurization and lyophilization of the juice, rather than isolated
636 *Pg*NVs, provides insights into how these treatments impact the *Pg*NVs within their
637 natural matrix. Isolated NVs are known to be more prone to aggregation, disruption
638 and fusion during freeze-thaw cycles compared to NVs still embedded in their
639 natural matrix (Jeyaram & Jay, 2018; Ahmadian et al., 2024). For instance, freezing
640 and lyophilization of NVs often requires cryoprotectants, such as sucrose or other
641 sugars, which are naturally abundant in the juice itself (Moradnia et al., 2024). This,
642 *Pg*NVs isolated from the juice may be more susceptible to the reported structural
643 alterations than those processed within their native matrix, although future studies
644 are needed to address this point. Additionally, *Pg*NVs contain diverse bioactive
645 molecules beyond proteins, such as phenolic compounds or microRNAs, which may
646 play a pivotal role in their functionality (López de las Hazas et al., 2023). This study
647 encountered significant challenges in identifying bioactive metabolites, detecting
648 only trace amounts of few compounds at significant lower concentrations than in
649 the juice itself. Based on these findings, we assume that phenolic compounds are

650 unlikely to be key components of the therapeutic activity of the *PgNVs*, although
651 they may still contribute to the properties of *PgJ*. Previous research have
652 demonstrated that pasteurization results in a loss of milk-EV-associated RNAs
653 (Kleinjan et al., 2021; Colella et al., 2023), rising questions about whether similar
654 losses occurs in *PgNVs*. Therefore, future studies should evaluate whether industrial
655 processing affects other bioactive molecules in *PgJ*, such as RNAs, to fully understand
656 their contribution to the therapeutic properties of *PgNVs*.

657

658

659

660

661 **4. Conclusion**

662 In this study, we have demonstrated that pasteurization and lyophilization of *PgJ*
663 significantly affect the nanovesicles present in the juice. Both treatments led to a
664 decrease in *PgNVs* concentration and altered the protein cargo within the vesicles.
665 These changes ultimately impact their functional properties, diminishing *PgNVs* anti-
666 inflammatory and wound-healing effects.

667 These findings have important implications for the food science field, especially
668 regarding the industrial processing of functional foods. The preservation and
669 integrity of bioactive molecules, such as proteins, lipids, and other macromolecules
670 within *PgNVs*, are essential to maintain their therapeutic properties. Our results
671 suggest that industrial processing methods, such as pasteurization and freeze-
672 drying, may reduce the effectiveness of *PgNVs* as therapeutic agents when
673 consumed in processed pomegranate juice.

674 Additionally, this study provides new insights into the role of specific proteins, such
675 as Tetraspanin-8, in the functionality of PDNVs. These proteins might be critical for
676 vesicle integrity, docking, and potential cell interactions, all of which are crucial for
677 their bioactivity.

678 Future research should investigate the impact of processing on other bioactive
679 molecules, including microRNAs or phenolic compounds, within *PgNVs* and other
680 PDNVs. In addition, investigating alternative processing techniques or protective
681 strategies to preserve the integrity of nanovesicles could have significant
682 implications for enhancing the health benefits of functional foods.

683 **4. Acknowledgements**

684 The authors thank Mario Soriano (CIPF, Valencia, Spain) for processing samples for
685 immunogold staining, and the Servicio Central de Soporte a Investigación
686 Experimental (SCSIE), Universitat de València for its support in Electronic Microscopy
687 and Proteomics. Work supported by Agencia Estatal de Investigación (AEI),
688 Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain (Grant PID2023-146116NB-
689 I00 and ERDF/EU), and Conselleria d'Educació, Cultura, Universitats i Ocupació,
690 Generalitat Valenciana, Valencia, Spain (Grant CIPROM/2023/054). C.M.S-L is the
691 recipient of a Postdoctoral fellowship funded by AEI/10.13039/501100011033.
692 Group part of the “Red Traslacional para la Aplicación Clínica de Vesículas
693 Extracelulares, Tentacles”, (RED2018-102411-T, AEI, Spain).

694

695 **5. Author's contributions**

696 **Mari Cruz Manzaneque-López:** Data curation; Formal analysis; Investigation;
697 Visualization; Validation; Writing-original draft; Writing-review and editing.

698 **Aránzazu González-Arce:** Investigation; Formal analysis; Visualization; Writing-
699 review and editing. **Pedro Pérez-Bermúdez:** Formal analysis; Visualization;
700 Validation; Writing-review and editing. **Carla Soler:** Conceptualization; Visualization;
701 Writing-review and editing. **Antonio Marcilla:** Formal analysis; Funding acquisition;
702 Project administration; Resources; Supervision; Visualization; Validation; Writing-
703 review and editing. **Christian M. Sánchez-López:** Conceptualization; Data curation;
704 Formal analysis; Investigation; Supervision; Validation; Visualization; Writing-original
705 draft; Writing-review and editing.

706

707 **Figure legends**

708 **Table 1. List of significantly different abundant proteins in NVs from natural**
709 **pomegranate juice versus NVs obtained from industrially processed pomegranate**
710 **juice.**

711 **Figure 1. Characterization of nanovesicles isolated from natural, pasteurized and**
712 **lyophilized pomegranate juice.** (A) Schematic overview of *PgJ* processing and *PgNVs*
713 isolation by differential centrifugation, tangential flow filtration (TFF), and size
714 exclusion chromatography (SEC). (B) Representative transmission electron
715 microscopy (TEM) images and nanoparticle tracking analysis (NTA) data obtained for
716 Nat-*PgNVs*, Pas-*PgNVs* or Lyo-*PgNVs*. Prior to NTA, *PgNVs* were diluted 1:200 in
717 filtered PBS. (C) Protein concentration of *PgNVs* determined by the Micro BCA
718 Protein Assay Kit. (D) Particle concentration estimation by NTA measurements. (E)
719 Particle/protein ratio, calculated as total particle number per μg of protein, as an
720 indicator of protein enrichment and purity of each *PgNVs* preparation. Data are
721 shown as mean \pm SEM from 7-9 independent *PgNVs* isolations. One-way ANOVA was
722 performed as a statistical analysis with GraphPad Prism 8, * $p < 0.05$.

723 **Figure 2. *PgNVs* exhibit different proteomic profiles in response to industrial**
724 **processing.** The protein cargo of Nat-*PgNVs*, Pas-*PgNVs* or Lyo-*PgNVs* were analyzed
725 by LC-MS/MS. (A) Gene ontology (GO) classification of *PgNVs* proteins with
726 significantly changed levels following industrial processing, categorized by biological
727 process, molecular function or cellular component. (B) Protein-protein interaction
728 network of the proteins with significant differential expression generated by the
729 STRING database, using the minimum required interaction score (0.150). (C)
730 Detection of Tetraspanin-8 (TET8) on *PgNVs* surfaces observed via TEM immunogold
731 using anti-TET-8 antibodies (PhytoAB) and anti-rabbit coupled to gold nanoparticles
732 (12 nm; Abcam). Black arrows indicate TET-8 labeling. (D) Quantification of gold
733 particles detected per *PgNV*, averaged across TEM images obtained at 40,000-fold
734 magnification and processed by ImageJ. (E) TET-8 detection in *PgNVs* samples was
735 also determined by ELISA using anti-TET8 antibodies. Data are shown as mean \pm SEM
736 (n= 10 for particle quantification; n= 4 for ELISA experiments). One-way ANOVA was
737 performed as a statistical analysis with GraphPad Prism 8, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p
738 < 0.001.

739 **Figure 3. Differential uptake of FMTM4-64-labelled liposomes, Nat-*PgNVs*, Lyo-**
740 ***PgNVs* or Pas-*PgNVs* by THP-1-XBlueTM-CD14 human macrophages.** Cells were
741 treated with either PBS, FMTM4-64-labelled liposomes (both used as controls), Nat-
742 *PgNVs*, Lyo-*PgNVs* or Pas-*PgNVs* at a concentration of 5,000 particles per cell. (A)
743 Gating strategy and representative dot plots obtained in one representative
744 experiment of NVs internalization assessed after either 30 min, 1 h or 2 h of
745 incubation using flow cytometry. (B) Quantification of uptake over time, determined
746 by measuring the mean fluorescence intensity (MFI) and the percentage of cells
747 showing positive NVs internalization. (C) Representative confocal laser scanning
748 microscopy images showing NVs uptake in THP-1-XBlueTM-CD14 cells. Data are shown

749 as mean \pm SEM from 4 independent experiments. One-way ANOVA was performed
750 as statistical analysis with GraphPad Prism 8, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

751 **Figure 4. Proteinase K treatment reduces the uptake of Nat-*PgNVs* but not Lyo-*PgNVs* or Pas-*PgNVs* by THP-1-XBlue™-CD14 macrophages.** *PgNVs* were pretreated
752 with proteinase (PK) prior to FM™4-64 labelling, and their uptake by THP-1
753 macrophages was assessed by flow cytometry after 2 h of incubation. (A)
754 Representative dot plots from a single representative experiment. (B) Quantification
755 of uptake based on mean fluorescence intensity (MFI). (C) Percentage of
756 macrophages showing positive NVs internalization. Data are shown as mean \pm SEM
757 from 4 independent experiments. One-way ANOVA was performed as statistical
758 analysis with GraphPad Prism 8, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

760 **Figure 5. Industrial processing diminishes the anti-inflammatory effect of *PgNVs* in**
761 **LPS-stimulated macrophages.** THP-1-XBlue™-CD14 macrophages were treated
762 either with 2.5, 5 or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *PgNVs*, and the levels of NF- κB were evaluated using
763 the QUANTI-Blue™ reagent following 24 h of incubation. PBS was used as negative
764 control for statistical analysis. (A) NF- κB levels in non-activated macrophages, with
765 LPS (300 ng/mL) serving as positive control for inflammation. (B) NF- κB levels in pre-
766 stimulated macrophages with 300 ng/mL of LPS 1 h before adding the corresponding
767 treatments. Data are shown as the mean \pm SEM ($n = 8$). One-way ANOVA was
768 performed as the statistical analysis with Graph Pad Prism8, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,
769 *** $p < 0.001$.

770 **Figure 6. Industrial processing of *PgNVs* do not alter the cytoprotective effect in**
771 **response to hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced stress in HepG2, Caco-2 and THP-1-**
772 **XBlue™-CD14 cells.** HepG2 (A), Caco-2 (B) and THP-1-XBlue™-CD14 (C) cells were
773 pretreated for 24 h either with either Nat-*PgNVs*, Lyo-*PgNVs*, or Pas-*PgNVs* (5

774 $\mu\text{g}/\text{mL}$) before the addition of different concentrations (25–1000 μM) of H_2O_2 for 24
775 h. Data are expressed as the mean \pm SEM ($n= 4$). One-way ANOVA was performed
776 with Graph Pad Prism8, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

777 **Figure 7. Industrial processing of *PgNVs* reduces wound healing in intestinal**
778 **epithelial cells.** Caco-2 cells were growth until confluence and scratch assays were
779 performed using a pipette tip. Cells were then treated either with PBS,
780 dexamethasone (Dexa), Nat-*PgNVs*, Lyo-*PgNVs* or Pas-*PgNVs* (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (A)
781 Percentage of wound healing closure quantified 24 h post-injury. (B) Representative
782 images of the wound healing process under the different treatments. Data are
783 shown as mean \pm SEM from 16–28 independent experiments. One-way ANOVA was
784 performed as statistical analysis with Graph Pad Prism 8, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ***
785 $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

786 **Supplementary Figure 1. Untreated or industrial processing of *PgNVs* do not induce**
787 **cytotoxic effects in different human cell lines.** HepG2 (A), Caco-2 (B) and THP-1-
788 XBlue™-CD14 (C) cells were treated for 24 h either with Nat-*PgNVs*, Lyo-*PgNVs*, or
789 Pas-*PgNVs*, using protein concentrations ranging from 5 to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The viability of
790 the resulting cells was assessed using MTT assays and expressed as the percentage
791 of transformed MTT compared to untreated controls. Data are expressed as the
792 mean \pm SEM ($n= 4$). One-way ANOVA was performed with Graph Pad Prism8, * $p <$
793 0.05, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

794

795 **6. References**

- 796 Adnan, A., Mushtaq, M., & Islam, T. ul. (2018). Fruit Juice Concentrates. En *Fruit*
797 *Juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis* (pp. 217-240). Elsevier
798 Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00012-6>
- 799 Ağçam, E., Akyildiz, A., & Dündar, B. (2018). Thermal Pasteurization and Microbial
800 Inactivation of Fruit Juices. En *Fruit Juices: Extraction, Composition, Quality*
801 *and Analysis* (pp. 309-339). [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00017-5)
802 6.00017-5
- 803 Ahmadian, S., Jafari, N., Tamadon, A., Ghaffarzadeh, A., Rahbarghazi, R., &
804 Mahdipour, M. (2024). Different storage and freezing protocols for
805 extracellular vesicles: a systematic review. *Stem Cell Research and Therapy* ,
806 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-024-04005-7>
- 807 Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local
808 alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
809 [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- 810 Alzahrani, F. A., Khan, M. I., Kameli, N., Alsaahafi, E., & Riza, Y. M. (2023). Plant-
811 Derived Extracellular Vesicles and Their Exciting Potential as the Future of
812 Next-Generation Drug Delivery. *Biomolecules*, 13(5), 1-22.
813 <https://doi.org/10.3390/biom13050839>
- 814 Ambrosone, A., Barbulova, A., Cappetta, E., Cillo, F., De Palma, M., Ruocco, M., &
815 Pocsfalvi, G. (2023). Plant Extracellular Vesicles: Current Landscape and
816 Future Directions. *Plants*, 12(24), 1-18.
817 <https://doi.org/10.3390/plants12244141>
- 818 Andreu, Z., & Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in extracellular vesicle formation

819 and function. *Frontiers in Immunology*, 5(442), 1-12.
820 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442>

821 Baldini, N., Torreggiani, E., Roncuzzi, L., Perut, F., Zini, N., & Avnet, S. (2018).
822 Exosome-like Nanovesicles Isolated from Citrus limon L. Exert Antioxidative
823 Effect. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 19(11), 877-885.
824 <https://doi.org/10.2174/1389201019666181017115755>

825 Bar-Ya'akov, I., Tian, L., Amir, R., & Holland, D. (2019). Primary metabolites,
826 anthocyanins, and hydrolyzable tannins in the pomegranate fruit. *Frontiers in*
827 *Plant Science*, 10(May), 1-19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00620>

828 Benedetti, G., Zabini, F., Tagliavento, L., Meneguzzo, F., Calderone, V., & Testai, L.
829 (2023). An Overview of the Health Benefits, Extraction Methods and
830 Improving the Properties of Pomegranate. *Antioxidants*, 12(7), 1-29.
831 <https://doi.org/10.3390/antiox12071351>

832 Bruno, S. P., Paolini, A., D'Oria, V., Sarra, A., Sennato, S., Bordi, F., & Masotti, A.
833 (2021). Extracellular Vesicles Derived From Citrus sinensis Modulate
834 Inflammatory Genes and Tight Junctions in a Human Model of Intestinal
835 Epithelium. *Frontiers in Nutrition*, 8, 1-12.
836 <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.778998>

837 Buzás, E. I. (2022). Opportunities and challenges in studying the extracellular
838 vesicle corona. *Nature Cell Biology*, 24(9), 1322-1325.
839 <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00983-z>

840 Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F. M., Palmquist, J., Huang, S. Da, & Jin, H.
841 (2018). Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to
842 silence virulence genes. *Science*, 360(6393), 1126-1129.

- 843 <https://doi.org/10.1126/science.aar4142>
- 844 Colella, A. P., Prakash, A., & Miklavcic, J. J. (2023). Homogenization and thermal
845 processing reduce the concentration of extracellular vesicles in bovine milk.
846 *Food Science and Nutrition*, 12(1), 131-140.
847 <https://doi.org/10.1002/fsn3.3749>
- 848 Cvjetkovic, A., Jang, S. C., Konečná, B., Höög, J. L., Sihlbom, C., Lässer, C., & Lötval, J. (2016). Detailed Analysis of Protein Topology of Extracellular Vesicles-
849 Evidence of Unconventional Membrane Protein Orientation. *Scientific*
850 *Reports*, 6, 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep36338>
- 852 Galindo, F. G., Sjöholm, I., Rasmusson, A. G., Widell, S., & Kaack, K. (2007). Plant
853 stress physiology: Opportunities and challenges for the food industry. *Critical*
854 *Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(8), 749-763.
855 <https://doi.org/10.1080/10408390601062211>
- 856 Gelibter, S., Marostica, G., Mandelli, A., Siciliani, S., Podini, P., Finardi, A., & Furlan,
857 R. (2022). The impact of storage on extracellular vesicles: A systematic study.
858 *Journal of Extracellular Vesicles*, 11(2), 1-18.
859 <https://doi.org/10.1002/jev2.12162>
- 860 Guillot, A. J., Jornet-Mollá, E., Landsberg, N., Milián-Guimerá, C., Montesinos, M. C.,
861 Garrigues, T. M., & Melero, A. (2021). Cyanocobalamin ultraflexible lipid
862 vesicles: Characterization and in vitro evaluation of drug-skin depth profiles.
863 *Pharmaceutics*, 13(3), 1-22. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030418>
- 864 Jahnke, K., & Staufer, O. (2024). Membranes on the move: The functional role of
865 the extracellular vesicle membrane for contact-dependent cellular signalling.
866 *Journal of Extracellular Vesicles*, 13(4), 1-10.

- 867 <https://doi.org/10.1002/jev2.12436>
- 868 Jankovičová, J., Sečová, P., Michalková, K., & Antalíková, J. (2020). Tetraspanins,
869 more than markers of extracellular vesicles in reproduction. *International*
870 *Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 1-30.
871 <https://doi.org/10.3390/ijms21207568>
- 872 Jeyaram, A., & Jay, S. M. (2018). Preservation and Storage Stability of Extracellular
873 Vesicles for Therapeutic Applications. *AAPS Journal*, 20(1), 1-7.
874 <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0160-y>
- 875 Kalaycıoğlu, Z., & Erim, F. B. (2017). Total phenolic contents, antioxidant activities,
876 and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide.
877 *Food Chemistry*, 221, 496-507.
878 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.084>
- 879 Kang, H., Hu, Q., Yang, Y., Huang, G., Li, J., Zhao, X., Zhu, L., Su, H., Tang, W., & Wan,
880 M. (2024). Urolithin A's Role in Alleviating Severe Acute Pancreatitis via
881 Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Calcium Channel Modulation. *ACS*
882 *Nano*, 18(21), 13885-13898. <https://doi.org/10.1021/acsnano.4c03044>
- 883 Kleinjan, M., Van Herwijnen, M. J. C., Libregts, S. F. W. M., Van Neerven, R. J.,
884 Feitsma, A. L., & Wauben, M. H. M. (2021). Regular Industrial Processing of
885 Bovine Milk Impacts the Integrity and Molecular Composition of Extracellular
886 Vesicles. *Journal of Nutrition*, 151(6), 1416-1425.
887 <https://doi.org/10.1093/jn/nxab031>
- 888 Leng, Y., Yang, L., Zhu, H., Li, D., Pan, S., & Yuan, F. (2023). Stability of Blueberry
889 Extracellular Vesicles and Their Gene Regulation Effects in Intestinal Caco-2
890 Cells. *Biomolecules*, 13(9), 1-14. <https://doi.org/10.3390/biom13091412>

- 891 Li, S., Ye, Z., Zhao, L., Yao, Y., & Zhou, Z. (2023). Evaluation of Antioxidant Activity
892 and Drug Delivery Potential of Cell-Derived Extracellular Vesicles from Citrus
893 reticulata Blanco cv. 'Dahongpao'. *Antioxidants*, 12(9).
894 <https://doi.org/10.3390/antiox12091706>
- 895 Liu, Y. J., & Wang, C. (2023). A review of the regulatory mechanisms of extracellular
896 vesicles-mediated intercellular communication. *Cell Communication and*
897 *Signaling*, 21(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01103-6>
- 898 Lo, K. J., Wang, M. H., Ho, C. T., & Pan, M. H. (2024). Plant-Derived Extracellular
899 Vesicles: A New Revolutionization of Modern Healthy Diets and Biomedical
900 Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(6), 2853-2878.
901 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c06867>
- 902 López de las Hazas, M. C., Tomé-Carneiro, J., del Pozo-Acebo, L., del Saz-Lara, A.,
903 Chapado, L. A., Balaguer, L., Rojo, E., Espín, J. C., Crespo, C., Moreno, D. A.,
904 García-Viguera, C., Ordovás, J. M., Visioli, F., & Dávalos, A. (2023). Therapeutic
905 potential of plant-derived extracellular vesicles as nanocarriers for exogenous
906 miRNAs. *Pharmacological Research*, 198, 1-16.
907 <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106999>
- 908 Martínez-Navarrete, N., Camacho, M. M., Agudelo, C., & Salvador, A. (2019).
909 Sensory characterization of juice obtained via rehydration of freeze-dried and
910 spray-dried grapefruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1),
911 244-252. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9166>
- 912 Moradnia, M., Mohammadkhani, N., Azizi, B., Mohammadi, M., Ebrahimpour, S.,
913 Tabatabaei-Malazy, O., Mirsadeghi, S., & Ale-Ebrahim, M. (2024). The power
914 of *Punica granatum*: A natural remedy for oxidative stress and inflammation;

- 915 a narrative review. *Journal of Ethnopharmacology*, 330, 1-17.
916 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118243>
- 917 Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. F. (2014). Routes and mechanisms of
918 extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1), 1-14.
919 <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>
- 920 Pantiora, P. D., Balaouras, A. I., Mina, I. K., Freris, C. I., Pappas, A. C., Danezis, G. P.,
921 Zoidis, E., & Georgiou, C. A. (2023). The Therapeutic Alliance between
922 Pomegranate and Health Emphasizing on Anticancer Properties. *Antioxidants*,
923 12(1), 1-27. <https://doi.org/10.3390/antiox12010187>
- 924 Petruzzi, L., Campaniello, D., Speranza, B., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., &
925 Bevilacqua, A. (2017). Thermal Treatments for Fruit and Vegetable Juices and
926 Beverages: A Literature Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science
927 and Food Safety*, 16(4), 668-691. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12270>
- 928 Pinedo, M., de la Canal, L., & de Marcos Lousa, C. (2021). A call for Rigor and
929 standardization in plant extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular
930 Vesicles*, 10(6), 1-8. <https://doi.org/10.1002/jev2.12048>
- 931 Pocsfalvi, G., Turiák, L., Ambrosone, A., del Gaudio, P., Puska, G., Fiume, I.,
932 Silvestre, T., & Vékey, K. (2018). Protein biocargo of citrus fruit-derived
933 vesicles reveals heterogeneous transport and extracellular vesicle
934 populations. *Journal of Plant Physiology*, 229(July), 111-121.
935 <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.07.006>
- 936 Prosapio, V., & Lopez-Quiroga, E. (2020). Freeze-Drying technology in foods. *Foods*,
937 9(7), 3-5. <https://doi.org/10.3390/foods9070920>
- 938 Putnik, P., Kresoja, Ž., Bosiljkov, T., Režek Jambrak, A., Barba, F. J., Lorenzo, J. M.,

- 939 Roohinejad, S., Granato, D., Žuntar, I., & Bursać Kovačević, D. (2019).
940 Comparing the effects of thermal and non-thermal technologies on
941 pomegranate juice quality: A review. *Food Chemistry*, 279(July 2018), 150-
942 161. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.131>
- 943 Raimondo, S., Urzì, O., Meraviglia, S., Di Simone, M., Corsale, A. M., Rabienezhad
944 Ganji, N., Palumbo Piccionello, A., Polito, G., Lo Presti, E., Dieli, F., Conigliaro,
945 A., & Alessandro, R. (2022). Anti-inflammatory properties of lemon-derived
946 extracellular vesicles are achieved through the inhibition of ERK/NF-κB
947 signalling pathways. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(15), 4195-
948 4209. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17404>
- 949 Rutter, B. D., & Innes, R. W. (2017). Extracellular Vesicles Isolated from the Leaf
950 Apoplast Carry Stress-Response Proteins. *Plant Physiology*, 173, 728-741.
- 951 Sánchez-López, C. M., González-Arce, A., Ramírez-Toledo, V., Bernal, D., & Marcilla,
952 A. (2024). Unraveling new players in helminth pathology: extracellular vesicles
953 from *Fasciola hepatica* and *Dicrocoelium dendriticum* exert different effects
954 on hepatic stellate cells and hepatocytes. *International Journal for*
955 *Parasitology*, 54(12), 617-634. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2024.06.002>
- 956 Sánchez-López, C. M., Manzanque-López, M. C., Pérez-Bermúdez, P., Soler, C., &
957 Marcilla, A. (2022). Characterization and bioactivity of extracellular vesicles
958 isolated from pomegranate. *Food and Function*, 13(24), 12870-12882.
959 <https://doi.org/10.1039/d2fo01806c>
- 960 Sánchez-López, C. M., Soler, C., Garzo, E., Ferreres, A., Pérez-Bermúdez, P., &
961 Marcilla, A. (2024). Phloem sap from melon plants contains extracellular
962 vesicles that carry active proteasomes which increase in response to aphid

963 infestation. *Journal of extracellular vesicles*, 13(10), e12517.
964 <https://doi.org/10.1002/jev2.12517>

965 Sánchez-López, C., Manzaneque López, M. C., Pérez-Bermúdez, P., Soler, C., &
966 Marcilla, A. (2022). Characterization and bioactivity of extracellular vesicles
967 isolated from pomegranate. *Food & Function*, 12870-12882.
968 <https://doi.org/10.1039/d2fo01806c>

969 Santangelo, C., Binetti, E., Azman, S. N. A., Bondi, D., Brunetti, V., Farina, M.,
970 Purcaro, C., Marramiero, L., Di Raimo, R., Pietrangelo, G., Di Filippo, E. S., &
971 Pietrangelo, T. (2024). Biophysical features of plant-derived nanovesicles:
972 Focus on almonds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 134, 106494.
973 <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106494>

974 Sarbatly, R., Sariau, J., & Krishnaiah, D. (2023). Recent Developments of Membrane
975 Technology in the Clarification and Concentration of Fruit Juices. *Food*
976 *Engineering Reviews*, 15(3), 420-437. [https://doi.org/10.1007/s12393-023-](https://doi.org/10.1007/s12393-023-09346-2)
977 [09346-2](https://doi.org/10.1007/s12393-023-09346-2)

978 Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25
979 years of Image Analysis HHS Public Access. *Nat Methods*, 9(7), 671-675.

980 Shofian, N. M., Hamid, A. A., Osman, A., Saari, N., Anwar, F., Dek, M. S. P., &
981 Hairuddin, M. R. (2011). Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds
982 and antioxidant activity of selected tropical fruits. *International Journal of*
983 *Molecular Sciences*, 12(7), 4678-4692. <https://doi.org/10.3390/ijms12074678>

984 Sidhom, K., Obi, P. O., & Saleem, A. (2020). A review of exosomal isolation
985 methods: Is size exclusion chromatography the best option? *International*
986 *Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 1-19.

- 987 <https://doi.org/10.3390/ijms21186466>
- 988 Silvan, J. M., Ciechanowska, A. M., & Martinez-Rodriguez, A. J. (2020). Modulation
989 of antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory properties by drying of
990 *Prunus domestica* L. plum juice extracts. *Microorganisms*, *8*(1), 1-13.
991 <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010119>
- 992 Song, H., Canup, B. S. B., Ngo, V. L., Denning, T. L., Garg, P., & Laroui, H. (2020).
993 Internalization of garlic-derived nanovesicles on liver cells is triggered by
994 interaction with CD98. *ACS Omega*, *5*(36), 23118-23128.
995 <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02893>
- 996 Sreekumar, A., Simmons, M. N., Lee, T. J., Sharma, A., & Saini, S. (2023).
997 Therapeutic potential of pomegranate juice-derived nanovesicles in nude
998 mouse benign prostatic hyperplasia (BPH) xenograft model. *Scientific Reports*,
999 *13*(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39511-w>
- 1000 Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable,
1001 A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & Von
1002 Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association
1003 networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of
1004 interest. *Nucleic Acids Research*, *51*(1 D), D638-D646.
1005 <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>
- 1006 Turner, N. P., Abeyasinghe, P., Sadowski, P., & Mitchell, M. D. (2023). Omics Analysis
1007 of Extracellular Vesicles Recovered from Infant Formula Products and Milk:
1008 Towards Personalized Infant Nutrition. *Molecular Nutrition and Food*
1009 *Research*, *67*(19), 1-15. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202300404>
- 1010 Urzi, O., Cafora, M., Ganji, N. R., Tinnirello, V., Gasparro, R., Raccosta, S., Manno,

1011 M., Corsale, A. M., Conigliaro, A., Pistocchi, A., Raimondo, S., & Alessandro, R.
1012 (2023). Lemon-derived nanovesicles achieve antioxidant and anti-
1013 inflammatory effects activating the AhR/Nrf2 signaling pathway. *iScience*,
1014 26(7), 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107041>

1015 Uscanga, M. A., Salvador, A., Camacho, M. del M., & Martínez-Navarrete, N. (2021).
1016 Impact of freeze-drying shelf temperature on the bioactive compounds,
1017 physical properties and sensory evaluation of a product based on orange
1018 juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(10), 5409-
1019 5416. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15086>

1020 Vegara, S., Mena, P., Martí, N., Saura, D., & Valero, M. (2013). Approaches to
1021 understanding the contribution of anthocyanins to the antioxidant capacity of
1022 pasteurized pomegranate juices. *Food Chemistry*, 141(3), 1630-1636.
1023 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.015>

1024 Wang, B., Zhuang, X., Deng, Z. Bin, Jiang, H., Mu, J., Wang, Q., Xiang, X., Guo, H.,
1025 Zhang, L., Dryden, G., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H. G. (2014). Targeted drug
1026 delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from
1027 grapefruit. *Molecular Therapy*, 22(3), 522-534.
1028 <https://doi.org/10.1038/mt.2013.190>

1029 Wang, Y., Wang, J., Ma, J., Zhou, Y., & Lu, R. (2022). Focusing on Future Applications
1030 and Current Challenges of Plant Derived Extracellular Vesicles.
1031 *Pharmaceuticals*, 15(6). <https://doi.org/10.3390/ph15060708>

1032 Webber, J., & Clayton, A. (2013). How pure are your vesicles? *Journal of*
1033 *Extracellular Vesicles*, 2(1), 1-6. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.19861>

1034 Welsh, J. A., Buzás, E. I., Blenkiron, C., Driscoll, L. O., Cai, H., Bussolati, B., Vizio, D.

- 1035 Di, Driedonks, T. A. P., Erdbrügger, U., Fu, Q., Hill, A. F., Lenassi, M., Möller, A.,
1036 Sahoo, S., Abuelreich, S., Brucale, M., Hanser, E., Ivanov, A. R., Bridges, E. M.,
1037 ... Valle, F. (2024). Minimal information for studies of extracellular vesicles
1038 (MISEV 2023): From basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular*
1039 *Vesicles*, 13. <https://doi.org/10.1002/jev2.12404>
- 1040 Wolf, M., Poupardin, R. W., Ebner-Peking, P., Andrade, A. C., Blöchl, C., Obermayer,
1041 A., Gomes, F. G., Vari, B., Maeding, N., Eminger, E., Binder, H. M., Raninger, A.
1042 M., Hochmann, S., Brachtl, G., Spittler, A., Heuser, T., Ofir, R., Huber, C. G.,
1043 Aberman, Z., ... Strunk, D. (2022). A functional corona around extracellular
1044 vesicles enhances angiogenesis, skin regeneration and immunomodulation.
1045 *Journal of Extracellular Vesicles*, 11(4). <https://doi.org/10.1002/jev2.12207>
- 1046 Wongkaewkhiaw, S., Wongrakpanich, A., Krobthong, S., Saengsawang, W.,
1047 Chairoungdua, A., & Boonmuen, N. (2022). Induction of apoptosis in human
1048 colorectal cancer cells by nanovesicles from fingerroot (*Boesenbergia rotunda*
1049 (L.) Mansf.). *PLoS ONE*, 17(4 April), 1-19.
1050 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266044>
- 1051 Zhang, M., Xiao, B., Wang, H., Han, M. K., Zhang, Z., Viennois, E., Xu, C., & Merlin, D.
1052 (2016). Edible ginger-derived nano-lipids loaded with doxorubicin as a novel
1053 drug-delivery approach for colon cancer therapy. *Molecular Therapy*, 24(10),
1054 1783-1796. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.159>
- 1055 Zhou, H., Duan, H., Liu, Y., Sun, X., Zhao, J., & Lin, H. (2019). Patellin protein family
1056 functions in plant development and stress response. *Journal of Plant*
1057 *Physiology*, 234-235(January), 94-97.
1058 <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.01.012>

7.4. Anexo 4. Lista de las proteínas significativamente expresadas de forma diferencial en Nat-GrANVs, Lio-GrANVs y Pas-GrANVs

Tabla suplementaria S2.

Nat-GrANVs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Nat-GrANVs	Mean all others	Fold Change Nat-GrANVs / all others
Upregulated	tr AoA6P8CP12 AoA6P8CP12_PUNGR	Patellin-3-like	4,517778 521	0,016 06	10062,48 504	3326,880 552	3,024600 638
	tr AoA2IoI5P8 AoA2IoI5P8_PUNGR	CASP-like protein	3,728178 829	0,034 13	45401,25 199	13772,341 81	3,296552 802
	tr AoA218VV18 AoA218VV18_PUNGR	Fasciclin-like arabinogalactan protein 9	3,488794 729	0,021 93	19015,10 69	9944,644 912	1,9120951 09
	tr AoA218XAV9 AoA218XAV9_PUNGR	H(+)-exporting diphosphatase (EC 7.1.3.1)	2,922302 576	0,029 42	116101,88 15	65574,181 85	1,7705425 86
	tr AoA2IoK2Z7 AoA2IoK2Z7_PUNGR	Prosaposin	2,610919 472	0,069 53	177891,25 36	83994,23 723	2,1178983 16
	tr AoA218VZ43 AoA218VZ43_PUNGR	Tetraspanin-8-like	2,523450 682	0,059 22	67292,93 822	30697,95 227	2,192098 601
	tr AoA2IoK2C8 AoA2IoK2C8_PUNGR	Annexin	2,295238 484	0,064 35	169042,4 391	115863,74 53	1,4589761 33
	tr AoA218WUR8 AoA218WUR8_PUNGR	Tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase catalytic domain-containing protein	2,195432 833	0,114 44	25525,86 361	13163,352 29	1,9391613 21
	tr AoA218XNI7 AoA218XNI7_PUNGR	non-specific serine/threonine protein kinase (EC 2.7.11.1)	2,011298 545	0,166 33	60372,91 329	21248,03 808	2,841340 602
	tr AoA6P8CMR2 AoA6P8CMR2_PUNGR	ADP-ribosylation factor-like protein 8a	1,815844 215	0,116 24	17175,40 851	10454,63 988	1,642850 324
	tr AoA218X2Z0 AoA218X2Z0_PUNGR	NDR1/HIN1-like protein 10	1,672880 48	0,225 22	29803,14 001	11057,811 34	2,6952114 75
	tr AoA6P8D4F3 AoA6P8D4F3_PUNGR	Enolase-phosphatase E1 isoform X1	1,669824 006	0,190 65	152324,1 319	101608,3 687	1,4991297 85
	tr AoA218WZ5 AoA218WZ5_PUNGR	Hypersensitive-induced response protein 1	1,645829 946	0,144 45	151675,32 71	114831,89 89	1,320846 633
	tr AoA218X752 AoA218X752_PUNGR	Ubiquitin-NEDD8-like protein RUB2	1,610498 34	0,154 33	1652846, 976	1163575,2 44	1,420489 981
	tr AoA218XIM6 AoA218XIM6_PUNGR	Aquaporin PIP2-7	1,586652 006	0,244 72	113334,3 374	41563,89 703	2,726749 547
	tr AoA2IoIF97 AoA2IoIF97_PUNGR	ADP-ribosylation factor	1,5151084 22	0,177 03	99322,20 675	74720,81 602	1,3292441 39
	tr AoA218X494 AoA218X494_PUNGR	Elongation factor 1-gamma-like	1,472532 443	0,184 76	45442,63 335	33198,30 422	1,368823 933

Nat- GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p- value	Mean Nat- GraNVs	Mean all others	Fold Change Nat- GraNVs/ all others
Upregulated	tr AoA218W347 AoA218W347_P UNGR	Non-specific lipid-transfer protein	1,3260395 16	0,280 65	119621,02 81	48198,365 2	2,4818482 45
	tr AoA21oJT73 AoA21oJT73_PU NGR	Lipid transfer-like protein VAS	1,2302197 84	0,338 06	247730,65 27	126863,44 56	1,9527347 02
	tr AoA6P8CQE7 AoA6P8CQE7_P UNGR	Vacuolar- sorting protein BRO1	1,1672376	0,3416 3	1113758,11 3	602332,07 68	1,8490765 42
	tr AoA6P8DP68 AoA6P8DP68_P UNGR	Proactivator polypeptide- like 1	1,1059555 24	0,338 92	57069,531 03	38506,7111 3	1,4820671 34
	tr AoA218WZ93 AoA218WZ93_P UNGR	Sucrose synthase (EC 2.4.1.13)	1,0936679 15	0,3153 2	65947,729 88	54843,607 87	1,2024688 46
	tr AoA218WG85 AoA218WG85_ PUNGR	Monocopper oxidase-like protein SKU5	1,0926654 17	0,3107 3	156939,92 62	121338,241	1,2934086 15
	tr AoA218X7W1 AoA218X7W1_P UNGR	Tr-type G domain- containing protein	1,0846520 57	0,3750 8	143397,02 73	93740,367 28	1,5297254 69
	tr AoA6P8D3Ao AoA6P8D3Ao_P UNGR	COP1- interactive protein 1-like	0,9783319 76	0,405 91	143199,33 49	109425,00 3	1,3086527 84
	tr AoA218WED1 AoA218WED1_ PUNGR	Monosacchari de-sensing protein 2-like	0,8981726 15	0,406 2	77403,225 44	68074,443 06	1,1370379 54
	tr AoA218W7C4 AoA218W7C4_P UNGR	alanine transaminase (EC 2.6.1.2)	0,8665682 47	0,4718 4	24883,134 99	14984,889 64	1,6605484 32
	tr AoA218WG84 AoA218WG84_ PUNGR	17.8 kDa class I heat shock protein-like	0,8069197 81	0,4763 2	37105,624 39	25257,906 61	1,4690696 64
	tr AoA21oIGD4 AoA21oIGD4_PU NGR	Neurofilamen t heavy polypeptide- like	0,7960765 67	0,499 81	13359,291 47	9445,5548 92	1,4143469 2
	tr AoA218XIR3 AoA218XIR3_PU NGR	Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor	0,7770462 14	0,4778 2	61798,696 97	49562,267 83	1,2468900 17
	tr AoA218WFS2 AoA218WFS2_P UNGR	Barwin-like	0,7630960 81	0,5138 6	5807,6279 19	3106,5442 79	1,8694817 77
	tr AoA21oISS2 AoA21oISS2_PU NGR	Vesicle- associated membrane protein 714	0,7547879 92	0,5151 3	6716,2439 61	4333,2379 29	1,5499365 76
	tr AoA218W9Uo AoA218W9Uo_ PUNGR	phosphopyruv ate hydratase (EC 4.2.1.11)	0,7490346 2	0,509 81	479377,18 4	375527,46 55	1,2765436 03

Nat- GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p- value	Mean Nat- GraNVs	Mean all others	Fold Change Nat- GraNVs/ all others
Upregulated	tr AoA2IoKPL9 AoA2IoKPL9_P UNGR	Vacuolar protein sorting-associated protein 32 homolog 2-like	0,7116947 71	0,503 57	35750,687 16	30654,99 609	1,1662270 99
	tr AoA218XU13 AoA218XU13_P UNGR	Tobamovirus multiplication protein 2A	0,7087124	0,547 57	357509,32 94	172252,99 37	2,075489 788
	tr AoA2IoJ145 AoA2IoJ145_PU NGR	Glycosyltransfera se (EC 2.4.1.-)	0,667605 985	0,541 23	71581,239 64	57911,257 42	1,236050 516
	tr AoA6P8DWU5 AoA6P8DWU 5_PUNGR	Inhibitor of trypsin and hageman factor- like isoform X1	0,646599 457	0,553 15	37243,317 94	32863,391 3	1,1332767 7
	tr AoA2IoI07 AoA2IoI07_PU NGR	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog	0,6415532 76	0,576 04	51234,498 08	40346,53 074	1,2698613 03
	tr AoA2IoHZM8 AoA2IoHZM8 _PUNGR	Spidroin-2-like	0,6160973 82	0,559 66	23292,34 284	19640,09 607	1,1859587 02
	tr AoA218VTL2 AoA218VTL2_P UNGR	17.3 kDa class II heat shock protein-like	0,585494 84	0,593 93	32318,248 17	24905,72 37	1,2976233 32
	tr AoA2IoK2K1 AoA2IoK2K1_P UNGR	protein-disulfide reductase (EC 1.8.1.8)	0,5577510 66	0,629 54	1253422,4 86	601890,8 565	2,082474 708
	tr AoA6P8EEI8 AoA6P8EEI8_P UNGR	Calcineurin B-like protein	0,542499 451	0,605 76	38615,034 84	35857,83 641	1,076892 493
	tr AoA218VY32 AoA218VY32_P UNGR	ADP-ribosylation factor-like protein 8a	0,535549 225	0,614 85	12419,279 71	9789,656 448	1,2686124 15
	tr AoA6P8BNG2 AoA6P8BNG2 _PUNGR	Heat shock cognate 70 kDa protein 2	0,5346151 74	0,613 85	409008,7 368	379224,8 863	1,0785387 55
	tr AoA218XRA5 AoA218XRA5_ PUNGR	Uncharacterized protein	0,525965 408	0,615 93	55359,542 52	50382,28 54	1,098789 824
	tr AoA218W5S4 AoA218W5S4_ PUNGR	Water stress and hypersensitive response domain- containing protein	0,499443 673	0,634 66	126592,71 35	115236,13 9	1,098550 46
	tr AoA218X2E4 AoA218X2E4_P UNGR	monodehydroasco rbate reductase (NADH) (EC 1.6.5.4)	0,462903 899	0,684 41	89276,514 15	74903,26 286	1,1918908 57
	tr AoA6P8DJH5 AoA6P8DJH5_ PUNGR	UTP-glucose-1- phosphate uridylyltransferas e (EC 2.7.7.9)	0,4396851 54	0,673 43	129096,87 14	119862,99 57	1,0770369 17
	tr AoA218WZE7 AoA218WZE7_ PUNGR	Phospholipase D (EC 3.1.4.4)	0,4293241 1	0,692 5	611117,77 1	519801,32 1	1,1756756 77

Nat-GraNVs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Nat-GraNVs	Mean all others	Fold Change Nat-GraNVs/all others
	tr AoA6P8DSX8 AoA6P8DSX8_PUNGR	L-ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11)	0,422758435	0,68584	99588,16716	91320,77287	1,090531366
	tr AoA6P8D5R9 AoA6P8D5R9_PUNGR	IST1-like protein	0,407080907	0,70611	12603,78702	11220,88514	1,123243564
	tr AoA218X9K8 AoA218X9K8_PUNGR	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	0,363585704	0,73793	426345,0066	385158,0936	1,106935084
	tr AoA6P8DUE6 AoA6P8DUE6_PUNGR	Plasma membrane ATPase (EC 7.1.2.1)	0,360733973	0,72963	1985043,183	1875987,757	1,058132269
	tr AoA21oK3T5 AoA21oK3T5_PUNGR	Ras-related protein Rab7	0,345153286	0,745	50872,01164	47595,6932	1,068836448
	tr AoA218WXP3 AoA218WXP3_PUNGR	Copper transport protein	0,315308534	0,7638	24315,06645	22655,61377	1,073246865
	tr AoA218XRK9 AoA218XRK9_PUNGR	Tr-type G domain-containing protein	0,30697382	0,77826	360661,8106	334189,3344	1,079214007
	tr AoA6P8BS0o AoA6P8BS0o_PUNGR	Ras-related protein RABE1a-like	0,300422484	0,77682	109512,0502	101931,7138	1,07436681
	tr AoA21oJo81 AoA21oJo81_PUNGR	Vesicle transport v-SNARE 13-like	0,298588185	0,78002	92251,5795	84245,29677	1,095035367
	tr AoA6P8D916 AoA6P8D916_PUNGR	Glutamate decarboxylase (EC 4.1.1.15)	0,224809582	0,83372	207596,4885	196826,4981	1,054718193
	tr AoA6P8C8C8 AoA6P8C8C8_PUNGR	14-3-3-like protein D	0,20105424	0,85764	51239,6861	44309,90428	1,156393518
	tr AoA218XPJ6 AoA218XPJ6_PUNGR	MLP-like protein 328	0,194839861	0,85622	457973,0842	437443,452	1,04693094
	tr K4JXo8 K4JXo8_PUNGR	Selenium-binding protein	0,194057296	0,85235	4542,467548	4260,477422	1,066187448
	tr AoA218VVR2 AoA218VVR2_PUNGR	Tobamovirus multiplication protein 2A-like	0,187344665	0,86423	131704,5724	120808,6878	1,090191233
	tr AoA218X958 AoA218X958_PUNGR	Protein SSUH2 homolog isoform X2	0,177294163	0,87208	827101,2982	777417,3623	1,063908961
	tr AoA218VWS1 AoA218VWS1_PUNGR	14-3-3-like protein A	0,146381692	0,8889	73928,78965	71107,72725	1,039673078
	tr AoA21oI9F5 AoA21oI9F5_PUNGR	Alpha-soluble NSF attachment protein 2	0,132090585	0,89876	98058,27531	95138,45195	1,030690255
	tr AoA218VZ38 AoA218VZ38_PUNGR	Hypersensitive-induced reaction 1 protein-like	0,125081193	0,90625	89884,17516	86731,90231	1,036345021
	tr AoA21oLFF4 AoA21oLFF4_PUNGR	Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A)	0,094128076	0,9282	27026,01369	26425,92454	1,02270835

Upregulated

Nat-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Nat-GraNVs	Mean all others	Fold Change Nat-GraNVs/all others
Upregulated	tr AoA218XID6 AoA218XID6_P UNGR	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	0,0669858 64	0,9505 3	68385,432 68	67176,588 96	1,01799501 5
	tr AoA6P8DEZ1 AoA6P8DEZ1_P UNGR	Syntaxin-22-like	0,0577900 83	0,9572	253238,67 89	245723,89 31	1,0305822 35
	tr AoA218WA16 AoA218WA16_P UNGR	V-type proton ATPase catalytic subunit A (EC 7.1.2.2) (V-ATPase 69 kDa subunit) (Vacuolar proton pump subunit alpha)	0,0356834 35	0,9728 7	13817,788 97	13646,562 44	1,0125472 28
	tr AoA218WJo3 AoA218WJo3_P UNGR	Temperature-induced lipocalin-1-like isoform X1	- 0,0083898 28	0,9939 1	194735,39 47	195542,32 62	0,9958733 66
Downregulated	tr AoA218WoZ6 AoA218WoZ6_P UNGR	GTP-binding nuclear protein	- 0,0367908 61	0,9725 3	63737,672 78	64319,710 41	0,9909508 67
	tr AoA218W532 AoA218W532_P UNGR	NADP-dependent oxidoreductase domain-containing protein	- 0,0561636 23	0,9567 8	25609,817 36	25880,241 82	0,9895509 3
	tr AoA218JGV8 AoA218JGV8_P UNGR	Phosphoprotein ECPP44	- 0,0952622 02	0,926 82	558548,14 24	569142,03 2	0,9813862 11
	tr AoA218X5B3 AoA218X5B3_P UNGR	Protein SRC2	- 0,1050207 47	0,920 3	34088,424 61	34951,639 31	0,9753025 98
	tr AoA218XUB1 AoA218XUB1_P UNGR	Major allergen Pru ar 1-like	- 0,10572754 3	0,9193	121118,599 2	123647,24 48	0,9795495 19
	tr AoA218H9F5 AoA218H9F5_P UNGR	Ras-related protein Rab7	- 0,12140527 1	0,9076 2	103984,84 19	106921,84 26	0,9725313 31
	tr AoA218X926 AoA218X926_P UNGR	Thioredoxin H1	- 0,13856123 2	0,896 23	23411,7749 2	24503,107 36	0,9554614 68
	tr AoA6P8D9F5 AoA6P8D9F5_P UNGR	2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent)-like	- 0,1419823 69	0,892 48	26757,590 4	27801,047 77	0,9624669 77
	tr AoA218Y2I1 AoA218Y2I1_P UNGR	Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 9	- 0,1548030 41	0,882	30130,929 36	31228,980 08	0,9648387 26
	tr AoA218XSW9 AoA218XSW9_P UNGR	Major allergen Pru ar 1-like	- 0,2013237 96	0,846 69	955449,68 88	987772,83 24	0,9672767 44
tr AoA218WES2 AoA218WES2_P UNGR	Major strawberry allergen Fra a 1.06-like	- 0,2066192 94	0,843 43	915846,74 01	944043,85 06	0,9701315 67	

Nat-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Nat-GraNVs	Mean all others	Fold Change Nat-GraNVs/ all others
Downregulated	tr AoA6P8C3Z6 AoA6P8C3Z6_PUNGR	Sodium/calcium exchanger NCL-like	- 0,2225137 79	0,835 43	72330,85 023	76055,46 745	0,951027 621
	tr AoA218VR31 AoA218VR31_PUNGR	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	- 0,236828 895	0,826 2	207473,7 294	219679,9 792	0,944436 221
	tr AoA6P8DUZ4 AoA6P8DUZ4_PUNGR	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	- 0,237739 002	0,827 48	67618,322 03	72773,44 574	0,929162 022
	tr AoA218VWB8 AoA218VWB8_PUNGR	CSC1-like protein HYP1	- 0,2523767 77	0,8117	39504,27 03	43546,04 135	0,907183 962
	tr AoA218XNM4 AoA218XNM4_PUNGR	Aminopeptidase (EC 3.4.11.-)	- 0,270347 606	0,8	12090,129 36	13258,25 07	0,9118947 61
	tr AoA218WL67 AoA218WL67_PUNGR	EF-hand domain-containing protein	- 0,288068 63	0,783 9	128404,2 302	140345,8 917	0,9149126 4
	tr AoA6P8BXC0 AoA6P8BXC0_PUNGR	Elongation factor Tu	- 0,340003 013	0,749 68	37736,26 072	43614,21 87	0,865228 401
	tr AoA218XLU8 AoA218XLU8_PUNGR	Ras-related protein RABB1c	- 0,343780 988	0,741 9	91638,65 382	97971,215 57	0,935363 038
	tr AoA218WA97 AoA218WA97_PUNGR	Adenosine kinase (AK) (EC 2.7.1.20) (Adenosine 5'-phosphotransferase)	- 0,348060 071	0,738 04	242281,8 404	258445,6 88	0,937457 468
	tr AoA218VUH2 AoA218VUH2_PUNGR	Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	- 0,356472 28	0,736	368700,4 833	399434,4 614	0,923056 268
	tr AoA218WS48 AoA218WS48_PUNGR	Phenylcoumaran benzylic ether reductase Betv6-like	- 0,368083 393	0,728 63	1475220, 896	1589181,1 2	0,928289 971
	tr AoA6P8EDC1 AoA6P8EDC1_PUNGR	Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	- 0,386060 851	0,7154	14504,972 97	16493,99 358	0,879409 398
	tr AoA6P8EKS3 AoA6P8EKS3_PUNGR	Syntaxin-52-like isoform X1	- 0,3920112 84	0,708 04	191289,89 88	209790,5 123	0,9118138 7
	tr AoA218XM98 AoA218XM98_PUNGR	Heat shock cognate protein 80	- 0,497272 037	0,639 53	106968,2 639	117351,03 79	0,9115237 99
	tr AoA6P8CNM7 AoA6P8CNM7_PUNGR	Profilin	- 0,507594 531	0,630 07	75636,744 7	81186,28 556	0,931644 356
	tr AoA218WJZ8 AoA218WJZ8_PUNGR	MLP-like protein 328 isoform X2	- 0,608503 435	0,562 99	45928,05 614	52502,18 211	0,874783 757
	tr AoA2IoKSF6 AoA2IoKSF6_PUNGR	GRAM domain-containing protein	- 0,6405011 6	0,574 88	42371,787 99	55616,661 17	0,7618542 2

Nat-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Nat-GraN Vs	Mean all others	Fold Change Nat-GraNVs / all others
Downregulated	tr AoA218WC75 AoA218WC75_PUNGR	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	-0,941467101	0,38475	225244,9882	270372,3486	0,833091806
	tr AoA218W2A1 AoA218W2A1_PUNGR	Cinnamoyl-CoA reductase 1-like	-1,015202804	0,37328	16256,15834	20715,62388	0,784729364
	tr AoA1Z1GAP2 AoA1Z1GAP2_PUNGR	Large ribosomal subunit protein uL14c	-1,108326228	0,30566	10332,89874	17058,34336	0,6057387
	tr AoA218WGE5 AoA218WGE5_PUNGR	Uncharacterized protein LOC116196468	-1,245915223	0,26222	13320,43332	18018,47461	0,739265316
	tr AoA210KL23 AoA210KL23_PUNGR	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase (EC 2.1.1.14)	-1,341044442	0,24899	114703,9449	154443,4026	0,742692423
	tr AoA6P8E027 AoA6P8E027_PUNGR	aldehyde dehydrogenase (NAD(+)) (EC 1.2.1.3)	-1,35601804	0,25428	37391,19121	48296,84578	0,774195304
	tr AoA218WNT9 AoA218WNT9_PUNGR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	-1,400832564	0,20658	277255,7571	432800,8762	0,640608123
	tr AoA210KTL7 AoA210KTL7_PUNGR	Delta(24)-sterol reductase	-1,527724954	0,18578	74180,4925	93040,90406	0,797289034
	tr AoA218Y286 AoA218Y286_PUNGR	Actin-7	-1,619096526	0,15427	424257,46	549582,9262	0,771962592
	tr K4JZ73 K4JZ73_PUNGR	Cinnamoyl-CoA reductase 1-like (Cinnamyl alcohol dehydrogenase)	-1,682472107	0,14855	11764,41179	17464,50727	0,673618305
	tr AoA218WUD0 AoA218WUD0_PUNGR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	-1,696606578	0,13411	242435,9726	364412,6771	0,665278647
	tr AoA218XGR1 AoA218XGR1_PUNGR	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	-1,783622095	0,12429	266250,0259	371739,9817	0,7162265
	tr AoA218WH8 AoA218WH8_PUNGR	GDP-mannose 3,5-epimerase 2	-2,031100895	0,08758	19477,57244	32502,90083	0,599256434

Nat- GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p- value	Mean Nat- GraNVs	Mean all others	Fold Change Nat- GraNVs / all others
Downregulated	tr AoA218W2A9 AoA218W2A9_PUNGR	Ran-binding protein 1 homolog a-like	- 2,1507985 89	0,070 28	2918,7559 71	5694,839 966	0,512526 425
	tr AoA218VTXo AoA218VTXo_PUNGR	glutathione transferase (EC 2.5.1.18)	- 2,370366 047	0,055 23	158621,44 94	219891,55 72	0,7213621 63
	tr AoA218XV61 AoA218XV61_PUNGR	Thioredoxin	- 2,6936701 2	0,035 07	1483,482 284	8865,1417 13	0,167338 812
	tr AoA218XHL8 AoA218XHL8_PUNGR	Adenosylhomocysteinase (EC 3.13.2.1)	- 2,9773399 48	0,020 68	9727,6252 67	20884,44 219	0,465783 341
	tr AoA218W056 AoA218W056_PUNGR	Cyclin-D5-1 isoform X1	- 2,999828 432	0,029 86	868,3707 063	7378,0187 11	0,1176970 05

Lio- GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p- value	Mean Lio- GraNVs	Mean all others	Fold Change Lio- GraNVs / all others
Upregulated	tr K4JZ73 K4JZ73_PUNGR	Cinnamoyl-CoA reductase 1-like (Cinnamyl alcohol dehydrogenase)	7,012012 738	0,003	24402,49 714	11145,46 46	2,189455 354
	tr AoA218VTXo AoA218VTXo_PUNGR	glutathione transferase (EC 2.5.1.18)	5,614869 704	0,001 22	262892,7 552	167755,9 043	1,567114 769
	tr AoA6P8EDC1 AoA6P8EDC1_PUNGR	Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	4,83592 445	0,002 05	23801,38 835	11845,78 589	2,00927 0518
	tr AoA218WUDo AoA218WUDo_PUNGR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	4,79803 6601	0,002 08	477121,3 442	247069,9 913	1,9311181 49
	tr AoA218XV61 AoA218XV61_PUNGR	Thioredoxin	4,776825 22	0,020 64	13974,73 579	2619,514 96	5,334856 263
	tr AoA21oKL23 AoA21oKL23_PUNGR	5-methyltetrahydropteroyltryglutamate--homocysteine S-methyltransferase (EC 2.1.1.14)	4,30608 2146	0,003 67	186794,7 534	118397,9 983	1,577685 063
	tr AoA218W568 AoA218W568_PUNGR	Universal stress protein A-like protein	4,250491 265	0,004 77	63828,19 865	32711,29 199	1,951258 87
	tr AoA218WoI5 AoA218WoI5_PUNGR	Annexin	4,126157 469	0,007 03	145597,4 393	85556,17 716	1,701775 887
	tr AoA218Y286 AoA218Y286_PUNGR	Actin-7	4,056170 283	0,005 85	661504,8 705	430959,2 209	1,534959 315
	tr AoA218XLU8 AoA218XLU8_PUNGR	Ras-related protein RABB1c	3,951015 832	0,010 1	123892,2 521	81844,41 644	1,513753 258
	tr AoA218XSW9 AoA218XSW9_PUNGR	Major allergen Pru ar 1-like	3,858527 903	0,011 69	1215621, 066	857687,1 436	1,417324 575
	tr AoA218XGR1 AoA218XGR1_PUNGR	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	3,70304 6679	0,013 05	464279,9 266	272725,0 313	1,702373 722
	tr AoA218WNT9 AoA218WNT9_PUNGR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	3,674322 664	0,044 71	628506, 0834	257175,7 13	2,443878 063
	tr AoA218XM98 AoA218XM98_PUNGR	Heat shock cognate protein 80	3,625512 756	0,009 3	152312,3 575	94678,99 109	1,608723 917

Lio-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Lio-GraNVs	Mean all others	Fold Change Lio-GraNVs/all others
Upregulated	tr AoA218WL67 AoA218WL67_PUNGR	EF-hand domain-containing protein	3,6219401 98	0,009 85	194183,66 39	107456,17 49	1,8070963 74
	tr AoA218VR31 AoA218VR31_PUNGR	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	3,5999457 73	0,010 92	274977,00 16	185928,34 31	1,4789407 42
	tr AoA218WGE5 AoA218WGE5_PUNGR	Uncharacterized protein LOC116196468	3,4296837 13	0,022 91	22817,522 71	13269,929 91	1,7194908 24
	tr AoA218W5S4 AoA218W5S4_PUNGR	Water stress and hypersensitive response domain-containing protein	3,3911978 34	0,0169 5	156441,59 23	100311,69 96	1,5595547 97
	tr AoA6P8D4P9 AoA6P8D4P9_PUNGR	Endo-1,31,4-beta-D-glucanase-like isoform X2	3,380924 024	0,0138 5	42674,28 025	24297,24 891	1,7563420 62
	tr AoA6P8DSX8 AoA6P8DSX8_PUNGR	L-ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11)	3,3565428 77	0,0143 7	122568,20 22	79830,755 33	1,5353506 52
	tr AoA21oLBW5 AoA21oLBW5_PUNGR	phosphoglucomutase (alpha-D-glucose-1,6-bisphosphate-dependent) (EC 5.4.2.2)	3,3488723 56	0,0149 7	77318,195 99	48329,36 744	1,5998180 83
	tr AoA6P8DUE6 AoA6P8DUE6_PUNGR	Plasma membrane ATPase (EC 7.1.2.1)	3,1007471 57	0,0251 5	2371040,1 67	1682989,2 65	1,408826 673
	tr AoA218WA97 AoA218WA97_PUNGR	Adenosine kinase (AK) (EC 2.7.1.20) (Adenosine 5'-phosphotransferase)	3,0691402 63	0,035 68	333814,52 32	212679,34 66	1,5695671 85
	tr AoA218XUB1 AoA218XUB1_PUNGR	Major allergen Pru ar 1-like	3,048822 223	0,022 78	153533,76 55	107439,66 17	1,4290231 67
	tr AoA218Y2I1 AoA218Y2I1_PUNGR	Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 9	2,9920789 99	0,040 58	41819,922 81	25384,48 335	1,6474600 74
	tr AoA6P8EKS3 AoA6P8EKS3_PUNGR	Syntaxin-52-like isoform X1	2,8021804 34	0,027 98	264483,5 674	173193,67 8	1,5270971 23
	tr AoA6P8BNG2 AoA6P8BNG2_PUNGR	Heat shock cognate 70 kDa protein 2	2,7517045 31	0,030 48	475480,4 313	345989,0 39	1,3742644 35

Lio-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Lio-GraNVs	Mean all others	Fold Change Lio-GraNVs/all others
Upregulated	tr AoA218WS48 AoA218WS48_P UNGR	Phenylcoumaran benzylic ether reductase Betv6-like	2,6255223 94	0,0351 9	1917600,2 7	1367991,4 33	1,4017633 62
	tr AoA218W532 AoA218W532_P UNGR	NADP-dependent oxidoreductase domain-containing protein	2,6135472 1	0,0361 5	32313,782 5	22528,259 25	1,4343665 94
	tr AoA218WES2 AoA218WES2_P UNGR	Major strawberry allergen Fra a 1.06-like	2,5675175 98	0,046 37	1088045,6 07	857944,41 7	1,2682005 8
	tr AoA218WED1 AoA218WED1_P UNGR	Monosaccharide-sensing protein 2-like	2,5415798 34	0,039 47	87718,335 33	62916,888 11	1,3941938
	tr AoA218WC75 AoA218WC75_P UNGR	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	2,5353746 37	0,039 8	316799,21 88	224595,23 33	1,4105340 26
	tr AoA210JV44 AoA210JV44_P UNGR	Alcohol dehydrogenase 2-like	2,5065465 72	0,045 42	213381,84 74	144261,27 3	1,4791346 49
	tr AoA210LFF4 AoA210LFF4_P UNGR	Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A)	2,4993048 33	0,046 25	34705,707 16	22586,077 8	1,5365973 44
	tr AoA6P8DJH5 AoA6P8DJH5_P UNGR	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (EC 2.7.7.9)	2,4009748 48	0,0475 6	151142,85 84	108840,0 022	1,3886701 15
	tr AoA6P8CNM7 AoA6P8CNM7_P UNGR	Profilin	2,3960373 97	0,060 04	91236,359 54	73386,478 14	1,2432312 03
	tr AoA218WC47 AoA218WC47_P UNGR	glutathione dehydrogenase (ascorbate) (EC 1.8.5.1)	2,1552148 19	0,093 9	94148,102 21	66544,790 89	1,4148079 95
	tr AoA6P8D916 AoA6P8D916_P UNGR	Glutamate decarboxylase (EC 4.1.1.15)	2,1384754 42	0,070 09	243574,11 25	178837,68 61	1,3619842 54
	tr AoA218VXA5 AoA218VXA5_P UNGR	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	2,10911717 6	0,1081 6	36033,916 55	26225,893 91	1,3739823 96
	tr AoA218X926 AoA218X926_P UNGR	Thioredoxin H1	2,0993874 46	0,084 67	32251,756 19	20083,116 73	1,6059138 94
	tr AoA218VUH2 AoA218VUH2_P UNGR	Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	2,0922998 86	0,0749 1	474860,98 89	346354,20 86	1,3710270 5
	tr AoA218XID6 AoA218XID6_P UNGR	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	1,97155274 9	0,094 92	81142,254 85	60798,177 87	1,3346165 57

Lio-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Lio-GraNVs	Mean all others	Fold Change Lio-GraNVs/all others
	tr AoA218XFU2 AoA218XFU2_P UNGR	Glycine-rich RNA-binding protein-like	1,9539016 18	0,094 43	97123,126 72	67561,879 47	1,4375432 93
	tr AoA21oKSF6 AoA21oKSF6_PU NGR	GRAM domain-containing protein	1,9488538 29	0,092 58	66425,267 85	43589,921 23	1,5238675 82
	tr AoA21oJo81 AoA21oJo81_PUN GR	Vesicle transport v-SNARE 13-like	1,9307101 69	0,099 34	109013,54 7	75864,313 01	1,4369542 5
	tr AoA6P8DUZ4 AoA6P8DUZ4_P UNGR	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	1,9295680 61	0,0951 2	87697,203 32	62734,005 1	1,3979213 22
	tr AoA218XPJ6 AoA218XPJ6_PU NGR	MLP-like protein 328	1,8512701 54	0,1087 5	531765,96 73	400547,01 04	1,3275993 92
	tr AoA218X9K8 AoA218X9K8_P UNGR	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	1,8221803 31	0,1134 78	483136,23 78	356762,47 8	1,3542237 98
	tr AoA218XIR3 AoA218XIR3_PU NGR	Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor	1,8071733 63	0,1167 1	66819,652 84	47051,789 89	1,4201298 82
	tr AoA218VVS1 AoA218VVS1_P UNGR	14-3-3-like protein A	1,8053431 4	0,1209 8	91280,348 01	62431,948 07	1,4620775 23
	tr AoA218W2A1 AoA218W2A1_P UNGR	Cinnamoyl-CoA reductase 1-like	1,8035021 6	0,1187 7	23186,891 41	17250,257 35	1,3441475 65
	tr AoA218VVR2 AoA218VVR2_P UNGR	Tobamovirus multiplication protein 2A-like	1,7402429 34	0,1266 5	164939,64 62	104191,150 9	1,5830485 09
	tr AoA6P8C3Z6 AoA6P8C3Z6_P UNGR	Sodium/calcium exchanger NCL-like	1,7324339 82	0,1272 2	87599,592 41	68421,096 36	1,2803009 17
	tr AoA218VZ38 AoA218VZ38_PU NGR	Hypersensitive-induced reaction 1 protein-like	1,7049576 85	0,1336 1	108663,31 25	77342,333 63	1,4049655 27
	tr AoA218W2A9 AoA218W2A9_P UNGR	Ran-binding protein 1 homolog a-like	1,5988439 83	0,2188 3	6898,7178 45	3704,8590 29	1,8620729 67
	tr AoA218WHD8 AoA218WHD8_P UNGR	GDP-mannose 3,5-epimerase 2	1,5752536 97	0,1765 1	36886,661 28	23798,356 41	1,5499667 56
	tr AoA218X2E3 AoA218X2E3_PU NGR	Protein SRC1	1,5421618 16	0,1683 9	47047,894 8	32597,896 39	1,4432800 89
	tr AoA218XS57 AoA218XS57_PU NGR	Triosephosphate isomerase, cytosolic (EC 5.3.1.1)	1,4581803 87	0,2371 3	43749,619 28	31471,808 8	1,3901209 04

Lio-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Lio-GraNVs	Mean all others	Fold Change Lio-GraNVs/ all others
Upregulated	tr AoA218X494 AoA218X494_PUNGR	Elongation factor 1-gamma-like	1,236849581	0,25709	44415,30059	33711,9706	1,317493454
	tr AoA218W9U0 AoA218W9U0_PUNGR	phosphopyruvate hydratase (EC 4.2.1.11)	1,204762309	0,27027	479925,107	375253,504	1,278935711
	tr AoA6P8DEZ1 AoA6P8DEZ1_PUNGR	Syntaxin-22-like	1,123566646	0,33346	335742,7702	204471,8474	1,641999984
	tr AoA218XRK9 AoA218XRK9_PUNGR	Tr-type G domain-containing protein	1,121022617	0,29969	384662,9442	322188,7676	1,193905508
	tr AoA6P8D9F5 AoA6P8D9F5_PUNGR	2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent)-like	1,040163182	0,35554	32623,60347	24868,0423	1,311868641
	tr AoA218W0Z6 AoA218W0Z6_PUNGR	GTP-binding nuclear protein	0,920330606	0,38857	71368,41175	60504,34092	1,179558535
	tr AoA218WTZ5 AoA218WTZ5_PUNGR	Hypersensitive-induced response protein 1	0,913660686	0,39248	140801,2681	120268,9284	1,170720235
	tr AoA218WZ93 AoA218WZ93_PUNGR	Sucrose synthase (EC 2.4.1.13)	0,912010494	0,39287	64495,81467	55569,56547	1,160631978
	tr AoA218WJZ8 AoA218WJZ8_PUNGR	MLP-like protein 328 isoform X2	0,895568456	0,40078	56510,72436	47210,8488	1,196986005
	tr AoA6P8BS00 AoA6P8BS00_PUNGR	Ras-related protein RABE1a-like	0,892323432	0,40533	117419,693	97977,8924	1,198430484
	tr AoA2IoK2C8 AoA2IoK2C8_PUNGR	Annexin	0,836684389	0,43311	146589,298	127090,3158	1,153426184
	tr AoA218X2E4 AoA218X2E4_PUNGR	monodehydroascorbate reductase (NADH) (EC 1.6.5.4)	0,809465078	0,44972	88366,84957	75358,09515	1,172625839
	tr AoA218XRA5 AoA218XRA5_PUNGR	Uncharacterized protein	0,753670933	0,48542	57886,37843	49118,86745	1,178495789
	tr AoA2IoI9F5 AoA2IoI9F5_PUNGR	Alpha-soluble NSF attachment protein 2	0,714982941	0,49823	105663,4924	91335,84339	1,156867759
	tr AoA6P8E027 AoA6P8E027_PUNGR	aldehyde dehydrogenase (NAD(+)) (EC 1.2.1.3)	0,638393525	0,54401	47583,26554	43200,80862	1,101443863
	tr AoA6P8C8C8 AoA6P8C8C8_PUNGR	14-3-3-like protein D	0,626163998	0,55241	55078,03214	42390,73126	1,299294221
	tr AoA218XNM4 AoA218XNM4_PUNGR	Aminopeptidase (EC 3.4.11.-)	0,614594878	0,56376	14437,03296	12084,7989	1,194644038
	tr AoA6P8EEI8 AoA6P8EEI8_PUNGR	Calcineurin B-like protein	0,584048054	0,58398	38640,8225	35844,94259	1,077999286
	tr AoA2IoHSF9 AoA2IoHSF9_PUNGR	Ras-related protein Rab7	0,583341564	0,58009	113484,811	102171,858	1,110724746

Lio-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Lio-GraNVs	Mean all others	Fold Change Lio-GraNVs /all others
Upregulated	tr AoA2IoJGV8 AoA2IoJGV8_P UNGR	Phosphoprotein ECPP44	0,581323 944	0,584 16	604868,6 336	545981,7 864	1,1078549 66
	tr AoA218X958 AoA218X958_P UNGR	Protein SSUH2 homolog isoform X2	0,478282 211	0,650 16	844513,33 76	768711,34 26	1,098609 18
	tr AoA2IoII07 AoA2IoII07_PU NGR	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog	0,474957 017	0,649 43	47252,30 628	42337,62 664	1,1160830 22
	tr AoA2IoJ145 AoA2IoJ145_PU NGR	Glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	0,4599711 36	0,668 22	68697,52 583	59353,114 33	1,1574375 94
	tr AoA2IoIF97 AoA2IoIF97_PU NGR	ADP-ribosylation factor	0,440792 82	0,681 63	89157,464 32	79803,18 724	1,1172168 36
	tr AoA2IoIGD4 AoA2IoIGD4_P UNGR	Neurofilament heavy polypeptide- like	0,3378921 26	0,745 92	11476,420 53	10386,99 036	1,1048841 03
	tr AoA2IoKPL9 AoA2IoKPL9_P UNGR	Vacuolar protein sorting-associated protein 32 homolog 2-like	0,3277746 63	0,758 63	34165,939 65	31447,36 984	1,086448 241
	tr AoA6P8D5R9 AoA6P8D5R9_ PUNGR	IST1-like protein	0,3151780 71	0,761 87	12232,612 49	11406,472 41	1,072427 307
	tr AoA218XU13 AoA218XU13_P UNGR	Tobamovirus multiplication protein 2A	0,263621 858	0,800 1	259274,97 75	221370,16 96	1,1712281 65
	tr AoA218W056 AoA218W056_ PUNGR	Cyclin-D5-1 isoform X1	0,255000 837	0,809 43	5851,3267 3	4886,540 7	1,1974374 29
	tr AoA218W7C4 AoA218W7C4_ PUNGR	alanine transaminase (EC 2.6.1.2)	0,2477612 64	0,812 42	19328,58 399	17762,165 14	1,088188 508
	tr AoA6P8DWU5 AoA6P8DWU 5_PUNGR	Inhibitor of trypsin and hageman factor-like isoform X1	0,2152662 42	0,836 08	35051,873 99	33959,113 27	1,0321787 18
	tr AoA2IoK2K1 AoA2IoK2K1_P UNGR	protein-disulfide reductase (EC 1.8.1.8)	0,1425939 62	0,890 67	883801,0 656	786701,5 667	1,123426 091
	tr K4JX08 K4JX08_PUNGR	Selenium-binding protein	0,140016 966	0,900 23	4573,6671 74	4244,877 609	1,0774556 05
	tr AoA6P8D3Ao AoA6P8D3Ao_ PUNGR	COP1-interactive protein 1-like	0,088599 922	0,931 88	122118,33 78	119965,50 16	1,0179454 61
	tr AoA6P8D4F3 AoA6P8D4F3_ PUNGR	Enolase- phosphatase E1 isoform X1	0,063122 219	0,951 44	119579,79 33	117980,53 8	1,0135552 47
	tr AoA218XHL8 AoA218XHL8_ PUNGR	Adenosylhomocyst einase (EC 3.13.2.1)	0,032738 023	0,974 81	17272,685 56	17111,912 04	1,009395 415

Lio-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Lio-GraNVs	Mean all others	Fold Change Lio-GraNVs /all others
Downregulated	tr AoA218WJo3 AoA218WJo3_PUNGR	Temperature-induced lipocalin-1-like isoform X1	- 0,119250 299	0,908 62	190205,0 161	197807,5 155	0,961566 175
	tr AoA218VWB8 AoA218VWB8_PUNGR	CSC1-like protein HYP1	- 0,163494 99	0,874 89	40832,80 834	42881,77 233	0,952218 3
	tr AoA218X7W1 AoA218X7W1_PUNGR	Tr-type G domain-containing protein	- 0,1713274 75	0,869 54	107065,0 268	111906,3 675	0,956737 576
	tr AoA218VTL2 AoA218VTL2_PUNGR	17.3 kDa class II heat shock protein-like	- 0,184802 257	0,858 62	26210,23 454	27959,73 052	0,937428 01
	tr AoA218WXP3 AoA218WXP3_PUNGR	Copper transport protein	- 0,220408 04	0,831 91	22329,27 888	23648,50 756	0,944215 14
	tr AoA218X752 AoA218X752_PUNGR	Ubiquitin-NEDD8-like protein RUB2	- 0,275322 64	0,792 07	1272820, 425	1353588, 519	0,940330 394
	tr AoA21oK3T5 AoA21oK3T5_PUNGR	Ras-related protein Rab7	- 0,288320 439	0,781 88	47103,55 494	49479,92 155	0,9519731 13
	tr AoA218X5B3 AoA218X5B3_PUNGR	Protein SRC2	- 0,336519 627	0,755 66	32532,23 868	35729,73 227	0,910508 885
	tr AoA6P8CQE7 AoA6P8CQE7_PUNGR	Vacuolar-sorting protein BRO1	- 0,397178 927	0,703 18	690019,7 881	814201,2 394	0,847480 641
	tr AoA21oKTL7 AoA21oKTL7_PUNGR	Delta(24)-sterol reductase	- 0,431035 99	0,68	82232,15 44	89015,07 31	0,923800 336
	tr AoA218WG84 AoA218WG84_PUNGR	17.8 kDa class I heat shock protein-like	- 0,705911 613	0,504 06	24471,38 028	31575,02 867	0,775023 217
	tr AoA21oISS2 AoA21oISS2_PUNGR	Vesicle-associated membrane protein 714	- 0,789198 501	0,462 73	4183,1347 7	5599,792 524	0,747016 028
	tr AoA218WG85 AoA218WG85_PUNGR	Monocopper oxidase-like protein SKU5	- 0,928386 147	0,393 46	114809,4 019	142403,5 031	0,806225 967
	tr AoA218WUR8 AoA218WUR8_PUNGR	Tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase catalytic domain-containing protein	- 0,946767 105	0,382 96	14372,45 695	18740,05 562	0,766937 795
	tr AoA1ZiGAP2 AoA1ZiGAP2_PUNGR	Large ribosomal subunit protein uL14c	- 0,961363 022	0,376 01	10554,69 26	16947,44 643	0,622789 553
	tr AoA6P8BXC0 AoA6P8BXC0_PUNGR	Elongation factor Tu	- 1,045201 966	0,338 13	31309,75 665	46827,47 074	0,668619 427

Downregulated

Lio-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Lio-GraNVs	Mean all others	Fold Change Lio-GraNVs/all others
	tr AoA21oJT73 AoA21oJT73_PU NGR	Lipid transfer-like protein VAS	- 1,0511886 91	0,328 54	125632,09 45	187912,72 47	0,6685661 91
	tr AoA6P8CP12 AoA6P8CP12_PU NGR	Patellin-3-like	- 1,0530502 56	0,329 2	4135,81770 8	6290,2142 2	0,6575002 95
	tr AoA218W2L3 AoA218W2L3_P UNGR	Short-chain dehydrogenase reductase 2a-like	- 1,0814591 09	0,3192	5852,7692 57	12319,7377 5	0,4750725 52
	tr AoA218WZE7 AoA218WZE7_P UNGR	Phospholipase D (EC 3.1.4.4)	- 1,1845646 83	0,284 6	443264,14 85	603728,13 18	0,73421151 9
	tr AoA6P8CMR2 AoA6P8CMR2_P UNGR	ADP-ribosylation factor-like protein 8a	- 1,21551073 4	0,2641	9600,2280 03	14242,230 13	0,6740677 49
	tr AoA218VV18 AoA218VV18_P UNGR	Fasciclin-like arabinogalactan protein 9	- 1,2310203 08	0,264 26	10112,4355 2	14395,980 6	0,7024485 37
	tr AoA218WA16 AoA218WA16_P UNGR	V-type proton ATPase catalytic subunit A (EC 7.1.2.2) (V-ATPase 69 kDa subunit) (Vacuolar proton pump subunit alpha)	- 1,2790244 41	0,2416 9	10464,929 39	15322,992 23	0,6829559 94
	tr AoA21oHZM8 AoA21oHZM8_P UNGR	Spidroin-2-like	- 1,3406294 59	0,222 22	15556,708 88	23507,913 05	0,6617647 79
	tr AoA218XN17 AoA218XN17_P UNGR	non-specific serine/threonine protein kinase (EC 2.7.11.1)	- 1,3875876 99	0,2170 6	21754,852 67	40557,068 39	0,5364010 15
	tr AoA218VY32 AoA218VY32_P UNGR	ADP-ribosylation factor-like protein 8a	- 1,4250537 25	0,201 93	7198,5303 57	12400,031 12	0,5805251 85
	tr AoA218XIM6 AoA218XIM6_P UNGR	Aquaporin PIP2-7	- 1,4817704 97	0,1871 8	37950,158 54	79255,986 45	0,4788301 84
	tr AoA6P8DP68 AoA6P8DP68_P UNGR	Proactivator polypeptide-like 1	- 1,4858122 26	0,1961 5	33766,645 51	50158,153 89	0,6732035 15
	tr AoA218X2Zo AoA218X2Zo_P UNGR	NDR1/HIN1-like protein 10	- 1,8094293 75	0,124 06	9184,1982 69	21367,282 21	0,4298252 9
	tr AoA6P8CD72 AoA6P8CD72_P UNGR	chitinase (EC 3.2.1.14)	- 2,0280202 66	0,097 41	343004,11 2	1687402,1 6	0,2032734 82
	tr AoA6P8CI8o AoA6P8CI8o_P UNGR	chitinase (EC 3.2.1.14)	- 2,1136995 89	0,084 16	628859,26 47	2436433,5 29	0,2581064 73

Lio-GraNVs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Lio-GraNVs	Mean all others	Fold Change Lio-GraNVs/all others
Downregulated	sp G1UH28 CHIT_PUNGR	Acidic endochitinase Pun g 14, amyloplastic (EC 3.2.1.14) (Chitinase III) (Pomegranate seed chitinase) (allergen Pun g 14)	-2,11628787	0,08387	628663,3135	2437386,71	0,257925142
	tr AoA2IoI5P8 AoA2IoI5P8_PUNGR	CASP-like protein	-2,160577024	0,07398	11860,59335	30542,67113	0,388328621
	tr AoA218XAV9 AoA218XAV9_PUNGR	H(+)-exporting diphosphatase (EC 7.1.3.1)	-2,3327096	0,06167	53436,0169	96907,11417	0,551414799
	tr AoA2IoK2Z7 AoA2IoK2Z7_PUNGR	Prosaposin	-2,35512709	0,06205	70220,47252	137829,6278	0,50947299
	tr AoA218VZ43 AoA218VZ43_PUNGR	Tetraspanin -8-like	-2,904122518	0,02507	20449,59212	54119,62532	0,377859085
	tr AoA218WFS2 AoA218WFS2_PUNGR	Barwin-like	-3,101982159	0,02523	825,7628391	5597,476819	0,14752412
	tr AoA218W347 AoA218W347_PUNGR	Non-specific lipid-transfer protein	-3,348591576	0,01992	10592,90704	102712,4257	0,1031317

Pas-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Pas-GraNVs	Mean all others	Fold Change Pas-GraNVs/all others
Upregulated	tr AoA6P8CI8o AoA6P8CI8o_PUNGR	chitinase (EC 3.2.1.14)	1,789080 253	0,206 04	3556721,3 76	972502,47 31	3,6572877 44
	sp G1UH28 CHIT_PUNGR	Acidic endochitinase Pun g 14, amyloplastic (EC 3.2.1.14) (Chitinase III) (Pomegranate seed chitinase) (allergen Pun g 14)	1,7875228 95	0,206 21	3555368,7 23	974034,0 051	3,650148 46
	tr AoA218XHL8 AoA218XHL8_PUNGR	Adenosylhomocysteinase (EC 3.13.2.1)	1,784693 216	0,186 64	24496,19 882	13500,155 41	1,8145123 57
	tr AoA1ZiGAP2 AoA1ZiGAP2_PUNGR	Large ribosomal subunit protein uL14c	1,7257070 59	0,196 9	23561,994 13	10443,795 67	2,2560757 49
	tr AoA6P8CD72 AoA6P8CD72_PUNGR	chitinase (EC 3.2.1.14)	1,7171420 94	0,221 62	2561386,5 2	578210,95 67	4,429847 775
	tr AoA218W056 AoA218W056_PUNGR	Cyclin-D5-1 isoform X1	1,4072134 09	0,254 47	8904,710 693	3359,848 718	2,650330 845
	tr AoA6P8BXC0 AoA6P8BXC0_PUNGR	Elongation factor Tu	1,1613739 75	0,330 99	55918,68 075	34523,00 869	1,6197510 84
	tr AoA218WFS2 AoA218WFS2_PUNGR	Barwin-like	1,0925277 53	0,323 23	5387,3257 18	3316,6953 79	1,6243052 51
	tr AoA2IoKTL7 AoA2IoKTL7_PUNGR	Delta(24)-sterol reductase	1,080031 275	0,385 46	103849,6 537	78206,32 345	1,3278933 1
	tr AoA218W2L3 AoA218W2L3_PUNGR	Short-chain dehydrogenase reductase 2a-like	1,025367 046	0,410 47	17759,140 16	6366,552 302	2,789443 849
	tr AoA218WA16 AoA218WA16_PUNGR	V-type proton ATPase catalytic subunit A (EC 7.1.2.2) (V-ATPase 69 kDa subunit) (Vacuolar proton pump subunit alpha)	0,728300 99	0,530 31	16828,195 49	12141,359 18	1,386022 375
	tr AoA6P8E027 AoA6P8E027_PUNGR	aldehyde dehydrogenase (NAD(+)) (EC 1.2.1.3)	0,691796 635	0,537 87	49010,42 603	42487,22 837	1,1535331 42
	tr AoA218W347 AoA218W347_PUNGR	Non-specific lipid-transfer protein	0,447050 971	0,6712 2	85803,82 336	65106,967 55	1,3178900 29
	tr AoA218X5B3 AoA218X5B3_PUNGR	Protein SRC2	0,407162 015	0,710 24	37371,039 93	33310,331 65	1,1219053 69
	tr AoA2IoHZM8 AoA2IoHZM8_PUNGR	Spidroin-2-like	0,3717454 73	0,7431 8	23723,48 326	19424,525 86	1,2213159 51

Pas-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Pas-GraNVs	Mean all others	Fold Change Pas-GraNVs/all others
Upregulated	tr AoA218VY32 AoA218VY32_PUNGR	ADP-ribosylation factor-like protein 8a	0,368651521	0,74231	12380,78254	9808,905033	1,262198227
	tr AoA218WZE7 AoA218WZE7_PUNGR	Phospholipase D (EC 3.1.4.4)	0,277786113	0,80152	596338,4935	527190,9592	1,131162216
	tr AoA218VWB8 AoA218VWB8_PUNGR	CSC1-like protein HYP1	0,274536396	0,80603	46259,27436	40168,53932	1,151629488
	tr AoA218WJ03 AoA218WJ03_PUNGR	Temperature-induced lipocalin-1-like isoform X1	0,107373679	0,91974	200879,6363	192470,2054	1,04369218
Downregulated	tr AoA218WHD8 AoA218WHD8_PUNGR	GDP-mannose 3,5-epimerase 2	-0,005191916	0,9962	28119,14038	28182,11686	0,997765374
	tr AoA218WXP3 AoA218WXP3_PUNGR	Copper transport protein	-0,031048799	0,97793	22981,94866	23322,17267	0,985411994
	tr AoA210K3T5 AoA210K3T5_PUNGR	Ras-related protein Rab7	-0,069449712	0,94988	48087,83147	48987,78329	0,981629056
	tr AoA6P8DP68 AoA6P8DP68_PUNGR	Proactivator polypeptide-like 1	-0,106610429	0,9222	43246,77676	45418,08827	0,952192803
	tr AoA218WG85 AoA218WG85_PUNGR	Monocopper oxidase-like protein SKU5	-0,127727361	0,90926	127867,08	135874,664	0,941066393
	tr AoA218VZ43 AoA218VZ43_PUNGR	Tetraspanin-8-like	-0,145598817	0,89093	40946,31241	43871,26517	0,933328735
	tr AoA218WJZ8 AoA218WJZ8_PUNGR	MLP-like protein 328 isoform X2	-0,150754339	0,8924	48493,63986	51219,39025	0,946782842
	tr AoA218XAV9 AoA218XAV9_PUNGR	H(+)-exporting diphosphate (EC 7.1.3.1)	-0,18487996	0,86644	77712,3468	84768,94922	0,916754867
	tr AoA210HSF9 AoA210HSF9_PUNGR	Ras-related protein Rab7	-0,22318147	0,84223	100358,8742	108734,8264	0,922969001
	tr AoA210JGV8 AoA210JGV8_PUNGR	Phosphoprotein ECPP44	-0,223507927	0,84329	533415,4305	581708,388	0,916980813
tr AoA218W2A9 AoA218W2A9_PUNGR	Ran-binding protein 1 homolog a-like	-0,22625956	0,82957	4490,962086	4908,736908	0,914891584	

Pas-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Pas-GraNVs	Mean all others	Fold Change Pas-GraNVs/all others
Downregulated	tr AoA218XNM4 AoA218XNM4_PUNGR	Aminopeptidase (EC 3.4.11.-)	- 0,2312012 12	0,832 89	12079,468 45	13263,581 16	0,9107245 1
	tr AoA218WG84 AoA218WG84_PUNGR	17.8 kDa class I heat shock protein-like	- 0,2964234 82	0,786 81	26044,432 94	30788,502 33	0,8459142 53
	tr AoA218W2A1 AoA218W2A1_PUNGR	Cinnamoyl-CoA reductase 1-like	- 0,3155113 7	0,769 64	18244,356 35	19721,524 88	0,9250986 66
	tr AoA6P8CMR2 AoA6P8CMR2_PUNGR	ADP-ribosylation factor-like protein 8a	- 0,3338299 82	0,7634 4	11309,0517 5	13387,818 25	0,8447270 15
	tr AoA21oISS2 AoA21oISS2_PUNGR	Vesicle-associated membrane protein 714	- 0,3571236 58	0,740 29	4483,3410 88	5449,6893 66	0,8226782 83
	tr AoA218X2E3 AoA218X2E3_PUNGR	Protein SRC1	- 0,3795239 64	0,728 44	33848,803 22	39197,442 18	0,8635462 25
	tr AoA218VTL2 AoA218VTL2_PUNGR	17.3 kDa class II heat shock protein-like	- 0,3881727 23	0,7264 4	23601,212 87	29264,241 35	0,8064864 07
	tr AoA218XFU2 AoA218XFU2_PUNGR	Glycine-rich RNA-binding protein-like	- 0,4100145 93	0,699 96	71384,670 18	80431,107 74	0,8875256 38
	tr AoA21o19F5 AoA21o19F5_PUNGR	Alpha-soluble NSF attachment protein 2	- 0,4616050 58	0,686 52	84613,4114 7	101860,88 39	0,8306761 95
	tr K4JXo8 K4JXo8_PUNGR	Selenium-binding protein	- 0,4631739 83	0,6573	3947,2876 69	4558,0673 61	0,8660002 93
	tr AoA218X958 AoA218X958_PUNGR	Protein SSUH2 homolog isoform X2	- 0,51752719 6	0,6373 1	710321,38 69	835807,31 79	0,8498626 08
	tr AoA6P8EEI8 AoA6P8EEI8_PUNGR	Calcineurin B-like protein	- 0,5485648 75	0,6375 7	33074,850 33	38627,928 67	0,8562418 82
	tr AoA6P8D5R9 AoA6P8D5R9_PUNGR	IST1-like protein	- 0,5560596 74	0,6219 4	10209,157 8	12418,199 76	0,8221125 44
	tr AoA21oK2Z7 AoA21oK2Z7_PUNGR	Prosaposin	- 0,56110161 1	0,602 79	97768,001 94	124055,86 31	0,7880965 84
	tr AoA218WoZ6 AoA218WoZ6_PUNGR	GTP-binding nuclear protein	- 0,5794953 37	0,606 29	57271,009 07	67553,042 26	0,8477931 88
	tr AoA6P8DWU5 AoA6P8DWU5_PUNGR	Inhibitor of trypsin and hageman factor-like isoform X1	- 0,6443006 42	0,5742 1	30674,908 61	36147,595 97	0,8486016 23
	tr AoA21oKSF6 AoA21oKSF6_PUNGR	GRAM domain-containing protein	- 0,6784667 63	0,5214 9	44808,054 48	54398,527 92	0,8236997 62

Pas-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Pas-GraNVs	Mean all others	Fold Change Pas-GraNVs/all others
Downregulated	tr AoA21oJV44 AoA21oJV44_PU NGR	Alcohol dehydrogenase 2-like	- 0,7155382 76	0,5110 4	146298,49 16	177802,95 09	0,8228125 06
	tr AoA218WC75 AoA218WC75_P UNGR	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	- 0,7617682 3	0,5013 2	223945,47 84	271022,10 35	0,8262996 84
	tr AoA6P8D9F5 AoA6P8D9F5_P UNGR	2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent)-like	- 0,7763479 21	0,493 05	22978,492 07	29690,596 93	0,7739316 29
	tr AoA218X752 AoA218X752_PU NGR	Ubiquitin-NEDD8-like protein RUB2	- 0,7877188 12	0,504 73	1054330,0 62	1462833,7	0,7207449 91
	tr AoA218X2Z0 AoA218X2Z0_P UNGR	NDR1/HIN1-like protein	- 0,7940779 74	0,453 47	12931,424 41	19493,669 14	0,6633653 38
	tr AoA6P8CNM7 AoA6P8CNM7_P UNGR	Profilin	- 0,8045514 81	0,4913	71136,2115 9	83436,552 12	0,8525785 14
	tr AoA218XS57 AoA218XS57_PU NGR	Triosephosphate isomerase, cytosolic (EC 5.3.1.1)	- 0,8139872 15	0,4651 5	30803,40 812	37944,914 38	0,8117927 96
	tr AoA21oKPL9 AoA21oKPL9_PU NGR	Vacuolar protein sorting-associated protein 32 homolog 2-like	- 0,8170825 37	0,478 69	27144,052 52	34958,313 4	0,7764691 68
	tr AoA218VTX0 AoA218VTX0_P UNGR	glutathione transferase (EC 2.5.1.18)	- 0,8290715 24	0,452 22	176890,35 93	210757,10 23	0,8393091 26
	tr AoA218Y286 AoA218Y286_PU NGR	Actin-7	- 0,8314971 34	0,466 81	437660,98 18	542881,16 52	0,8061819 23
	tr AoA218XRA5 AoA218XRA5_P UNGR	Uncharacterized protein	- 0,8704558 19	0,464	42878,192 38	56622,960 48	0,7572580 45
	tr AoA6P8C3Z6 AoA6P8C3Z6_P UNGR	Sodium/calcium exchanger NCL-like	- 0,8781742 04	0,445 62	64511,342 48	79965,221 32	0,8067424 99
	tr AoA6P8BS00 AoA6P8BS00_P UNGR	Ras-related protein RABE1a-like	- 0,8891969 26	0,4475 6	86443,734 59	113465,871 6	0,7618478 88
	tr AoA218VUH2 AoA218VUH2_P UNGR	Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	- 0,9349242 02	0,425 32	324007,93 38	421780,73 61	0,7681904 51
	tr AoA218XGR1 AoA218XGR1_P UNGR	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	- 0,9681933 09	0,391	279200,03 68	365264,97 62	0,7643766 99
tr AoA218XIM6 AoA218XIM6_P UNGR	Aquaporin PIP2-7	- 0,9825430 52	0,358 59	45177,635 52	75642,247 96	0,5972540 05	

Pas-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Pas-GraNVs	Mean all others	Fold Change Pas-GraNVs / all others
Downregulated	tr AoA2IoJT73 AoA2IoJT73_PUNGR	Lipid transfer-like protein VAS	- 1,026769 954	0,341 94	128094,7 967	186681,3 736	0,686168 064
	tr AoA2IoKL23 AoA2IoKL23_PUNGR	5-methyltetrahydropteroyltri glutamate--homocysteine S-methyltransferase (EC 2.1.1.14)	- 1,037152 375	0,341 01	122092,0 517	150749,3 492	0,809901 02
	tr AoA218WUD0 AoA218WUD0_PUNGR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	- 1,114436 518	0,325 94	251704,0 1	359778,6 584	0,699607 951
	tr AoA6P8CQE7 AoA6P8CQE7_PUNGR	Vacuolar-sorting protein BRO1	- 1,131842 949	0,309 59	514644,3 654	901888,9 508	0,570629 416
	tr AoA218WC47 AoA218WC47_PUNGR	glutathione dehydrogenase (ascorbate) (EC 1.8.5.1)	- 1,139087 8	0,316 45	64174,53 057	81531,57 672	0,787112 591
	tr AoA218VXA5 AoA218VXA5_PUNGR	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	- 1,151805 619	0,308 76	25489,8 3335	31497,93 551	0,809254 097
	tr AoA2IoI5P8 AoA2IoI5P8_PUNGR	CASP-like protein	- 1,153213 483	0,291 39	15684,09 027	28630,9 2267	0,547802 474
	tr AoA2IoJ145 AoA2IoJ145_PUNGR	Glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	- 1,158104 198	0,316 89	47124,98 902	70139,38 274	0,671876 301
	tr AoA218XRK9 AoA218XRK9_PUNGR	Tr-type G domain-containing protein	- 1,162467 14	0,322 96	283715,7 245	372662,3 774	0,761321 082
	tr AoA218WES2 AoA218WES2_PUNGR	Major strawberry allergen Fra a 1.06-like	- 1,181961 573	0,335 81	800042, 094	1001946, 174	0,798488 098
	tr AoA6P8C8C8 AoA6P8C8C8_PUNGR	14-3-3-like protein D	- 1,184145 38	0,284 67	33541,77 642	53158,85 912	0,630972 466
	tr AoA218XV61 AoA218XV61_PUNGR	Thioredoxin	- 1,185601 567	0,275 64	3755,547 637	7729,109 037	0,485896 579
	tr AoA6P8DUZ4 AoA6P8DUZ4_PUNGR	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	- 1,187545 094	0,293 17	57849,6 8817	77657,76 267	0,744931 172
	tr AoA6P8EKS3 AoA6P8EKS3_PUNGR	Syntaxin-52-like isoform X1	- 1,221090 618	0,318 42	155097,4 572	227886,7 331	0,68059 0112
	tr AoA6P8D3Ao AoA6P8D3Ao_PUNGR	COP1-interactive protein 1-like	- 1,237110 59	0,286 31	96731,66 824	132658,8 364	0,729176 215

Pas-GraNVs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Pas-GraNVs	Mean all others	Fold Change Pas-GraNVs / all others
Downregulated	tr AoA218WUR8 AoA218WUR8_PUNGR	Tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase catalytic domain-containing protein	- 1,257787 905	0,282 28	11954,247 63	19949,16 028	0,599235 63
	tr AoA6P8D4P9 AoA6P8D4P9_PUNGR	Endo-1,31,4-beta-D-glucanase-like isoform X2	- 1,269313 359	0,281 57	22849,90 231	34209,43 788	0,667941 473
	tr AoA218XNI7 AoA218XNI7_PUNGR	non-specific serine/threonine protein kinase (EC 2.7.11.1)	- 1,273645 73	0,246 81	20741,22 349	41063,88 298	0,505096 498
	tr AoA218WGE5 AoA218WGE5_PUNGR	Uncharacterized protein LOC116196468	- 1,3019153 13	0,242 94	13219,42 65	18068,97 801	0,731608 976
	tr AoA210K2K1 AoA210K2K1_PUNGR	protein-disulfide reductase (EC 1.8.1.8)	- 1,325936 367	0,236 56	319980,6 475	1068611,7 76	0,299435 824
	tr AoA218X7W1 AoA218X7W1_PUNGR	Tr-type G domain-containing protein	- 1,338088 322	0,239 98	80415,70 774	125231,0 27	0,642138 85
	tr AoA218VV18 AoA218VV18_PUNGR	Fasciclin-like arabinogalactan protein 9	- 1,354253 51	0,228 77	9776,854 306	14563,771 21	0,6713133 68
	tr AoA210LBW5 AoA210LBW5_PUNGR	phosphoglucomutase (alpha-D-glucose-1,6-bisphosphate-dependent) (EC 5.4.2.2)	- 1,3754176 64	0,237 2	46003,48 534	63986,72 277	0,718953 61
	tr AoA218VZ38 AoA218VZ38_PUNGR	Hypersensitive-induced reaction 1 protein-like	- 1,398154 648	0,253 7	64800,49 211	99273,74 383	0,652745 526
	tr AoA210I07 AoA210I07_PUNGR	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog	- 1,4031175 66	0,216 63	33440,75 52	49243,40 218	0,679091 081
	tr AoA218W532 AoA218W532_PUNGR	NADP-dependent oxidoreductase domain-containing protein	- 1,414758 66	0,273 04	19446,70 114	28961,79 993	0,671460 379
	tr AoA218WS48 AoA218WS48_PUNGR	Phenylcoumaran benzylic ether reductase Betv6-like	- 1,421373 466	0,238 23	1260761, 97	1696410, 583	0,743193 884
	tr AoA218XID6 AoA218XID6_PUNGR	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	- 1,4511575 31	0,227 62	53210,92 307	74763,84 376	0,711720 002
	tr AoA218XM98 AoA218XM98_PUNGR	Heat shock cognate protein 80	- 1,498053 011	0,247 14	82389,71 831	129640,3 107	0,635525 462

Pas-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Pas-GraNVs	Mean all others	Fold Change Pas-GraNVs/all others
Downregulated	tr AoA218VWS1 AoA218VWS1_PUNGR	14-3-3-like protein A	- 1,5317033 87	0,224 99	50935,106 49	82604,56 883	0,6166136 72
	tr AoA218WZ93 AoA218WZ93_PUNGR	Sucrose synthase (EC 2.4.1.13)	- 1,5443241 64	0,239 95	45191,401 06	65221,772 28	0,692888 272
	tr AoA21oJo81 AoA21oJo81_PUNGR	Vesicle transport v-SNARE 13-like	- 1,6285816 63	0,203 15	59477,04 653	100632,56 33	0,5910318 15
	tr AoA6P8DEZ1 AoA6P8DEZ1_PUNGR	Syntaxin-22-like	- 1,644906 707	0,144 07	155705,01 59	294490,72 46	0,5287263 84
	tr AoA218W568 AoA218W568_PUNGR	Universal stress protein A-like protein	- 1,664473 905	0,1417 5	30570,63 071	49340,07 595	0,6195902 65
	tr AoA218X926 AoA218X926_PUNGR	Thioredoxin H1	- 1,665982 331	0,166 66	16754,458 53	27831,765 56	0,6019905 02
	tr AoA218XUB1 AoA218XUB1_PUNGR	Major allergen Pru ar 1-like	- 1,6668715 91	0,200 01	93760,72 41	137326,18 24	0,6827592 7
	tr AoA218X2E4 AoA218X2E4_PUNGR	monodehydroascorbate reductase (NADH) (EC 1.6.5.4)	- 1,6972979 43	0,133 45	61439,676 14	88821,681 86	0,6917193 51
	tr AoA218XLU8 AoA218XLU8_PUNGR	Ras-related protein RABB1c	- 1,7856495 67	0,170 4	72050,179 06	107765,45 3	0,668583 271
	tr AoA218W0I5 AoA218W0I5_PUNGR	Annexin	- 1,803580 187	0,1397 2	78202,321 7	119253,73 59	0,6557641 24
	tr AoA218XU13 AoA218XU13_PUNGR	Tobamovirus multiplication protein 2A	- 1,8141669 92	0,1241 7	85231,00 989	308392,15 34	0,2763721 74
	tr AoA21oIF97 AoA21oIF97_PUNGR	ADP-ribosylation factor	- 1,8187837 49	0,1555 2	60284,167 73	94239,835 53	0,639688 805
	tr AoA218WTZ5 AoA218WTZ5_PUNGR	Hypersensitive-induced response protein 1	- 1,874288 395	0,186 04	88862,52 971	146238,29 76	0,6076556 63
	tr AoA218WL67 AoA218WL67_PUNGR	EF-hand domain-containing protein	- 1,9244821 75	0,134 68	86508,119 47	161293,94 71	0,5363382 88
	tr AoA218XPJ6 AoA218XPJ6_PUNGR	MLP-like protein 328	- 1,9263765 63	0,1195 1	343120,93 66	494869,5 258	0,6933563 67
	tr AoA218XSW9 AoA218XSW9_PUNGR	Major allergen Pru ar 1-like	- 1,9481852 5	0,1451 5	759924,59 84	1085535,3 78	0,700045 907

Pas-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Pas-GraNVs	Mean all others	Fold Change Pas-GraNVs/all others
Downregulated	tr AoA218X9K8 AoA218X9K8_PUNGR	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	-1,952416735	0,12472	287179,9494	454740,6222	0,631524732
	tr AoA218WNT9 AoA218WNT9_PUNGR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	-1,957725984	0,09124	237095,669	452880,9202	0,523527617
	tr AoA6P8D4F3 AoA6P8D4F3_PUNGR	Enolase-phosphatase E1 isoform X1	-1,977247104	0,11765	83636,94407	135951,9626	0,615194827
	tr AoA6P8D916 AoA6P8D916_PUNGR	Glutamate decarboxylase (EC 4.1.1.15)	-1,983694234	0,12233	150078,8837	225585,3005	0,665286627
	tr AoA6P8DUE6 AoA6P8DUE6_PUNGR	Plasma membrane ATPase (EC 7.1.2.1)	-2,099243176	0,15229	1380935,348	2178041,675	0,634026136
	tr AoA6P8DJH5 AoA6P8DJH5_PUNGR	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (EC 2.7.7.9)	-2,105034759	0,14278	88583,13308	140119,8649	0,632195393
	tr K4JZ73 K4JZ73_PUNGR	Cinnamoyl-CoA reductase 1-like (Cinnamyl alcohol dehydrogenase)	-2,113868292	0,07271	10526,51741	18083,45446	0,582107662
	tr AoA2IoIGD4 AoA2IoIGD4_PUNGR	Neurofilament heavy polypeptide-like	-2,115437159	0,08621	7414,689256	12417,856	0,597098989
	tr AoA6P8BNG2 AoA6P8BNG2_PUNGR	Heat shock cognate 70 kDa protein 2	-2,15692252	0,14906	282969,3412	442244,5841	0,639848065
	tr AoA218W7C4 AoA218W7C4_PUNGR	alanine transaminase (EC 2.6.1.2)	-2,163114055	0,08129	10641,19529	22105,85949	0,48137442
	tr AoA2IoLFF4 AoA2IoLFF4_PUNGR	Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A)	-2,239931702	0,09465	18146,14192	30865,86042	0,587903323
	tr AoA218W9U0 AoA218W9U0_PUNGR	phosphopyruvate hydratase (EC 4.2.1.11)	-2,274049397	0,07469	271129,8241	479651,1455	0,565264623
	tr AoA218VVR2 AoA218VVR2_PUNGR	Tobamovirus multiplication protein 2A-like	-2,287004074	0,05609	76677,72949	148322,1093	0,516967631
	tr AoA218WA97 AoA218WA97_PUNGR	Adenosine kinase (AK) (EC 2.7.1.20) (Adenosine 5'-phosphotransferase)	-2,393011563	0,06694	183076,8528	288048,1818	0,635577186
	tr AoA218X494 AoA218X494_PUNGR	Elongation factor 1-gamma-like	-2,435637436	0,10891	21981,30785	44928,96697	0,489245788

Pas-GraN Vs	Peak Name	Protein names	t-value	p-value	Mean Pas-GraNVs	Mean all others	Fold Change Pas-GraNVs/all others
Downregulated	tr AoA6P8CP12 AoA6P8CP12_PUNGR	Patellin-3-like	- 2,440586 77	0,045 73	2517,9433 97	7099,1513 75	0,354682 308
	tr AoA218XIR3 AoA218XIR3_PUNGR	Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor	- 2,536442 073	0,077 72	32304,88 281	64309,17 49	0,502337 075
	tr AoA218VR31 AoA218VR31_PUNGR	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	- 2,5660311 41	0,037 22	164382,9 567	241225,36 55	0,6814497 16
	tr AoA218W5S4 AoA218W5S4_PUNGR	Water stress and hypersensitive response domain-containing protein	- 2,7286311 21	0,090 13	74030,68 564	141517,15 29	0,5231216 44
	tr AoA6P8EDC1 AoA6P8EDC1_PUNGR	Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	- 3,224722 481	0,015 24	9186,598 806	19153,180 66	0,479638 289
	tr AoA218WED1 AoA218WED1_PUNGR	Monosaccharide-sensing protein 2-like	- 3,386936 882	0,052 1	48430,55 078	82560,78 039	0,586604 809
	tr AoA6P8DSX8 AoA6P8DSX8_PUNGR	L-ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11)	- 3,393782 095	0,033 08	60073,34 35	111078,18 47	0,540820 357
	tr AoA218Y2I1 AoA218Y2I1_PUNGR	Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 9	- 3,605908 212	0,010 31	20638,03 735	35975,42 609	0,5736704 08
	tr AoA2IoK2C8 AoA2IoK2C8_PUNGR	Annexin	- 3,665328 509	0,029 22	85138,192 6	157815,86 85	0,539478 022

7.5. Anexo 5. Análisis *Gene Ontology* de las proteínas con diferencias significativas post-tratamiento.

Tabla suplementaria S3.

Accesion	Protein Name	Biological process	Cellular component	Molecular function
AoA6P8CP12	Patellin-3-like	cell cycle [GO:0007049]; cell division [GO:0051301]		lipid binding [GO:0008289]
AoA21oI5P8	CASP-like protein		plasma membrane [GO:0005886]	
AoA218X494	Elongation factor 1-gamma-like	response to chemical [GO:0042221]	membrane [GO:0016020]	glutathione transferase activity [GO:0004364]; translation elongation factor activity [GO:0003746]
AoA6P8CMR2	ADP-ribosylation factor-like protein 8a	anterograde axonal transport [GO:0008089]; protein transport [GO:0015031]	lysosomal membrane [GO:0005765]	GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]
AoA218X752	Ubiquitin-NEDD8-like protein RUB2	modification-dependent protein catabolic process [GO:0019941]; protein ubiquitination [GO:0016567]	cytoplasm [GO:0005737]; nucleus [GO:0005634]	mRNA binding [GO:0003729]; protein tag activity [GO:0031386]; ubiquitin protein ligase binding [GO:0031625]
AoA21oK2Z7	Prosaposin	sphingolipid metabolic process [GO:0006665]	lysosome [GO:0005764]	aspartic-type endopeptidase activity [GO:0004190]
AoA218XAV9	H(+)-exporting diphosphatase (EC 7.1.3.1)		membrane [GO:0016020]	diphosphate hydrolysis-driven proton transmembrane transporter activity [GO:0009678]; inorganic diphosphate phosphatase activity [GO:0004427]
AoA218VV18	Fasciclin-like arabinogalactan protein 9	plant-type secondary cell wall biogenesis [GO:0009834]	plasma membrane [GO:0005886]	

Accession	Protein Name	Biological process	Cellular component	Molecular function
AoA218W54	Water stress and hypersensitive response domain-containing protein	response to desiccation [GO:0009269]	cytosol [GO:0005829]	
AoA21oK2C8	Annexin	response to stress [GO:0006950]	cytoplasm [GO:0005737]	calcium ion binding [GO:0005509]; calcium-dependent phospholipid binding [GO:0005544]
AoA21oIF97	ADP-ribosylation factor	intracellular protein transport [GO:0006886]; vesicle-mediated transport [GO:0016192]	Golgi apparatus [GO:0005794]; plasma membrane [GO:0005886]	GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]
AoA218WXP3	Copper transport protein		plasma membrane [GO:0005886]	copper ion transmembrane transporter activity [GO:0005375]
AoA218WED1	Monosaccharide-sensing protein 2-like		membrane [GO:0016020]	transmembrane transporter activity [GO:0022857]
AoA21oJGV8	Phosphoprotein ECPP44	cold acclimation [GO:0009631]; response to abscisic acid [GO:0009737]; response to water deprivation [GO:0009414]	cytosol [GO:0005829]; membrane [GO:0016020]	metal ion binding [GO:0046872]
G1UH28	Acidic endochitinase Pun g 14, amyloplastic (EC 3.2.1.14) (Chitinase III) (Pomegranate seed chitinase) (allergen Pun g 14)	chitin catabolic process [GO:0006032]; polysaccharide catabolic process [GO:0000272]; seed germination [GO:0009845]; seedling development [GO:0090351]	amyloplast [GO:0009501]; extracellular region [GO:0005576]	calcium ion binding [GO:0005509]; chitinase activity [GO:0004568]
AoA6P8CI8o	chitinase (EC 3.2.1.14)	carbohydrate metabolic process [GO:0005975]	extracellular region [GO:0005576]	chitinase activity [GO:0004568]

Accession	Protein Name	Biological process	Cellular component	Molecular function
AoA218XV61	Thioredoxin		cytoplasm [GO:0005737]	protein-disulfide reductase activity [GO:0015035]
AoA218WNT9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	glucose metabolic process [GO:0006006]; glycolytic process [GO:0006096]	cytosol [GO:0005829]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity [GO:0004365]; NAD binding [GO:0051287]; NADP binding [GO:0050661]
K4JZ73	Cinnamoyl-CoA reductase 1-like (Cinnamyl alcohol dehydrogenase)			oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor [GO:0016616]
AoA218WUDO	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	glucose metabolic process [GO:0006006]; glycolytic process [GO:0006096]	cytosol [GO:0005829]	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity [GO:0004365]; NAD binding [GO:0051287]; NADP binding [GO:0050661]
AoA218XGR1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	protein folding [GO:0006457]	cytosol [GO:0005829]; intracellular membrane-bounded organelle [GO:0043231]; plasma membrane [GO:0005886]	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity [GO:0003755]
AoA6P8D4P9	Endo-1,3,1,4-beta-D-glucanase-like isoform X2			hydrolase activity [GO:0016787]
AoA218VTXo	glutathione transferase (EC 2.5.1.18)	glutathione metabolic process [GO:0006749]; toxin catabolic process [GO:0009407]	cytosol [GO:0005829]	glutathione binding [GO:0043295]; glutathione transferase activity [GO:0004364]

Accesion	Protein Name	Biological process	Cellular component	Molecular function
AoA218W015	Annexin	response to stress [GO:0006950]	cytosol [GO:0005829]	calcium ion binding [GO:0005509]; calcium-dependent phospholipid binding [GO:0005544]
AoA218Y286	Actin-7		cytoskeleton [GO:0005856]	ATP binding [GO:0005524]; hydrolase activity [GO:0016787]
AoA218XM98	Heat shock cognate protein 80	cellular response to heat [GO:0034605]; protein stabilization [GO:0050821]	cytosol [GO:0005829]; perinuclear region of cytoplasm [GO:0048471]; plasma membrane [GO:0005886]; protein-containing complex [GO:0032991]	ATP binding [GO:0005524]; ATP hydrolysis activity [GO:0016887]; ATP- dependent protein folding chaperone [GO:0140662]; unfolded protein binding [GO:0051082]
AoA218VZ43	Tetraspanin-8-like	auxin-activated signaling pathway [GO:0009734]	plasma membrane [GO:0005886]; plasmodesma [GO:0009506]	

7.6. Anexo 6. Lista de proteínas identificadas en *AlgNVs* por LC-MS/MS

Tabla suplementaria S4

Accession	Name	Nebi Blastp	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
AoAo72UM13	Heat shock cognate 70 kDa protein		chaperone cofactor-dependent protein refolding; protein refolding; Stress response	ATP binding; ATP hydrolysis activity; ATP-dependent protein folding chaperone; heat shock protein binding; protein folding chaperone	cytoplasm
AoA1S2YP37	Heat shock 70 kDa protein		Stress response	ATP binding; ATP-dependent protein folding chaperone	
AoAoL9VN25	5-methyltetrahydropteroyltri glutamate-homocysteine S-methyltransferase		methionine biosynthetic process; methylation; Amino-acid biosynthesis; Methionine biosynthesis	5-methyltetrahydropteroyltri glutamate-homocysteine S-methyltransferase activity; zinc ion binding; Methyltransferase; Transferase	
T2DLI2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		glucose metabolic process	NAD binding; NADP binding; oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor	
AoA444XPW8	Malate dehydrogenase		malate metabolic process; tricarboxylic acid cycle	L-malate dehydrogenase activity; Oxidoreductase	
AoA151R3L7	Malic enzyme		malate metabolic process	malate dehydrogenase (decarboxylating) (NAD+) activity; metal ion binding; NAD binding; oxidoreductase	
AoAoL9TGV7	Uncharacterized protein			ATP binding; ATP-dependent protein folding chaperone	endoplasmic reticulum
AoA445FIH4	phosphopyruvate hydratase		glycolytic process; glycolysis	magnesium ion binding; phosphopyruvate hydratase activity; lyase	phosphopyruvate hydratase complex
AoA396I950	Putative secoisolariciresinol dehydrogenase			oxidoreductase activity	
AoA834T6G0	nucleoside-diphosphate kinase		CTP biosynthetic process; GTP biosynthetic process; phosphorylation; UTP biosynthetic process	nucleic acid binding; nucleoside diphosphate kinase activity; zinc ion binding; Kinase; Transferase	
AoA8B8K8L9	Leucine aminopeptidase 1-like		proteolysis	manganese ion binding; metalloaminopeptidase activity; Aminopeptidase; Hydrolase; Protease	cytoplasm
P00761	Trypsin		digestion; proteolysis	metal ion binding; serine-type endopeptidase activity; Hydrolase; Protease; Serine protease	extracellular space

Accession	Name	Ncbi Blastp	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
AoA9D5B4N8	Fructose-bisphosphate aldolase		fructose 1,6-bisphosphate metabolic process; glycolytic process; Glycolysis	fructose-bisphosphate aldolase activity; Lyase	cytosol
AoA097PL79	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase family protein		nitrogen compound metabolic process	acyltransferase activity; hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds, in linear amides; Acyltransferase; Hydrolase; Transferase	
AoA0B2PNU6	Heat shock protein 83		Stress response	ATP binding; ATP hydrolysis activity; ATP-dependent protein folding chaperone; unfolded protein binding; Chaperone	
AoA151SJG3	adenosylhomocysteinase		one-carbon metabolic process; One-carbon metabolism	adenosylhomocysteinase activity; hydrolase	
AoA1J7GPD0	transaldolase		carbohydrate metabolic process; pentose-phosphate shunt	transaldolase activity	cytoplasm; membrane
AoA6A4QMS3	glycerophosphodiester phosphodiesterase		glycerol metabolic process; lipid metabolic process	glycerophosphodiester phosphodiesterase activity	
AoA6A5P8W0	Putative laccase			copper ion binding; oxidoreductase activity	
AoA834SKH2	Putative fructokinase-4		phosphorylation	kinase activity	
AoA834WNB6	Protein disulfide-isomerase			protein disulfide isomerase activity; isomerase	endoplasmic reticulum lumen
AoA834WRV7	UDP-glucose 6-dehydrogenase		UDP-glucuronate biosynthetic process	NAD binding; UDP-glucose 6-dehydrogenase activity; Oxidoreductase	
P17928	Calmodulin			calcium ion binding	
Q06197	Isocitrate dehydrogenase [NADP]		glyoxylate cycle; isocitrate metabolic process; NADP metabolic process; tricarboxylic acid cycle; Glyoxylate bypass; Tricarboxylic acid cycle	isocitrate dehydrogenase (NADP+) activity; magnesium ion binding; NAD binding; Oxidoreductase	mitochondrion
AoA072TKQ3	Glycosyltransferase			2-alkenal reductase [NAD(P)+] activity; UDP-glycosyltransferase activity; Glycosyltransferase; Transferase	
AoA0A1EUV7	Actin			ATP binding	cytoskeleton

Accession	Name	Ncbi Blastp	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
AoA6A4R691	Proteasome subunit alpha type		ubiquitin-dependent protein catabolic process	hydrolase activity	cytoplasm; nucleus; proteasome core complex, alpha-subunit complex
AoA0B2PUT2	Disease resistance response protein DRRG49-C		Plant defense	abscisic acid binding; protein phosphatase inhibitor activity; signaling receptor activity; abscisic acid-activated signaling pathway; defense response; response to biotic stimulus; Pathogenesis-related protein	
AoA0B2QDZ8	Proteasome subunit beta		proteolysis involved in protein catabolic process	threonine-type endopeptidase activity; Hydrolase	cytoplasm; nucleus; proteasome core complex
AoA0L9TFH9	ATP synthase subunit beta		ATP synthesis; Hydrogen ion transport; Ion transport; Transport	ATP binding; ATP hydrolysis activity; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism; translocase	mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, catalytic sector F(1)
AoA0L9U7B6	Calmodulin-1/11/16 protein			calcium ion binding	
AoA0L9UT98	transketolase			metal ion binding; transketolase activity; transferase	
AoA0R0IL89	Alpha-galactosidase		carbohydrate metabolic process	alpha-galactosidase activity; Glycosidase; Hydrolase	
AoA445DJL0	Lactoylglutathione lyase			lactoylglutathione lyase activity; metal ion binding; lyase	
AoA834SZE4	glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase		carbohydrate metabolic process; cell wall organization; polysaccharide catabolic process; cytoskeleton organization	glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase activity; Glycosidase; Hydrolase; beta-glucosidase activity; glucan endo-1,3-beta-glucanase activity, C-3 substituted reducing group; glucan endo-1,4-beta-glucanase activity, C-3 substituted reducing group;	
AoA1S2YP92	Xylose isomerase		D-xylose metabolic process; Carbohydrate metabolism; Xylose metabolism	metal ion binding; xylose isomerase activity; isomerase	

Accession	Name	Ncbi Blastp	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
AoA2K3LoL4	Isocitrate dehydrogenase		isocitrate metabolic process; tricarboxylic acid cycle	isocitrate dehydrogenase (NADP+) activity; metal ion binding; oxidoreductase	
AoA2K3L6D5	Actin-97-like protein			ATP binding	cytoskeleton
AoA2K3NMG4	Isoflavone reductase		lignan biosynthetic process	oxidoreductase activity	
AoA392RJA1	Uncharacterized protein				
AoA445GSC3	Fumarylacetoacetase		L-phenylalanine catabolic process; tyrosine catabolic process; Phenylalanine catabolism; Tyrosine catabolism	fumarylacetoacetase activity; metal ion binding; hydrolase	
AoA6A4PZ02	Putative thaumatin				membrane
AoA8B8JUY3	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase		UDP-glucose metabolic process	UTP:glucose-1-phosphate uridylyltransferase activity; Nucleotidyltransferase; Transferase	
AoA8B8L702	Proteasome subunit beta type-4-like isoform X2		proteolysis involved in protein catabolic process		nucleus; proteasome core complex
AoA8B8LI60	L-ascorbate oxidase homolog			copper ion binding; oxidoreductase activity	
C6TBN2	Probable aldo-keto reductase 1			aldo-keto reductase (NADP) activity; oxidoreductase	cytoplasm
O82043	Ketol-acid reductoisomerase, chloroplastic		isoleucine biosynthetic process; valine biosynthetic process; Amino-acid biosynthesis; Branched-chain amino acid biosynthesis	ketol-acid reductoisomerase activity; ketol-acid reductoisomerase activity; oxidoreductase	chloroplast
AoA444XAB7	Superoxide dismutase [Cu-Zn]			copper ion binding; superoxide dismutase activity; antioxidant; oxidoreductase	cytoplasm
Q9M4T8	Proteasome subunit alpha type-5		proteasomal protein catabolic process; proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process		cytoplasm; nucleus; proteasome core complex, alpha-subunit complex
AoA1S3UoU5	Aspartate aminotransferase		amino acid metabolic process; biosynthetic process	pyridoxal phosphate binding; transaminase activity; Aminotransferase; Transferase	
AoA072VoA2	Putative lysosomal Pro-Xaa carboxypeptidase	lysosomal Pro-X carboxypeptidase isoform X1	proteolysis	dipeptidyl-peptidase activity; serine-type carboxypeptidase activity; Carboxypeptidase; Hydrolase; Protease	
AoA072VAS3	Protein DETOXIFICATION		xenobiotic transmembrane transporter activity	antipporter activity; electron transfer activity; transmembrane transporter activity	membrane

Accession	Name	Ncbi Blastp	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
AoAo72VLZ2	GDP-D-mannose-3,5-epimerase			GDP-mannose 3,5-epimerase activity; NAD binding; Isomerase	
AoAoB2PE54	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial		tricarboxylic acid cycle	ATP binding; magnesium ion binding; succinate-CoA ligase (ADP-forming) activity; Ligase	mitochondrion
AoAoB2PEH9	Putative aldo-keto reductase 2			oxidoreductase activity	
AoAoB2PK07	12-oxophytodienoate reductase 3			12-oxophytodienoate reductase activity; FMN binding; Oxidoreductase	
AoAoB2PV57	Acetylmithine deacetylase			acetylmithine deacetylase activity; Hydrolase	
AoAoB2QN32	Bifunctional polymyxin resistance protein ArnA			UDP-glucuronate decarboxylase activity; Lyase	
AoAoB2SLN2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant iD				
AoAoL9VE11	Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin		cellular response to oxidative stress	thioredoxin peroxidase activity; Antioxidant; Oxidoreductase; Peroxidase	
AoAoL9TEU4	Pectinesterase		cell wall modification; pectin catabolic process; Cell wall biogenesis/degradation	aspartyl esterase activity; enzyme inhibitor activity; pectinesterase activity; Aspartyl esterase; Hydrolase	extracellular region
AoAoRoG6T3	Triosephosphate isomerase		chloroplast organization; glyceraldehyde-3-phosphate biosynthetic process; glycerol catabolic process; glycolytic process; multicellular organism reproduction; primary root development; triglyceride mobilization	triose-phosphate isomerase activity; isomerase	chloroplast
AoAoL9U2X4	4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase		regulation of RNA metabolic process	4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase activity; metal ion binding; oxaloacetate decarboxylase activity; ribonuclease inhibitor activity; lyase	
AoAoL9U8N2	thioredoxin-dependent peroxiredoxin			thioredoxin-dependent peroxiredoxin activity; oxidoreductase	
AoAoL9UI67	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase		protein folding	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity; Isomerase; Rotamase	

Accession	Name	Nebi Blastp	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
AoAoL9UTC9	UDP-arabinopyranose mutase		cell wall organization; plant-type cell wall biogenesis; UDP-L-arabinose metabolic process; Cell wall biogenesis/degradation	UDP-arabinopyranose mutase activity; isomerase	cytosol; Golgi apparatus
AoAoL9VQM6	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating		D-gluconate metabolic process; pentose-phosphate shunt; Gluconate utilization; Pentose shunt	NADP binding; phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating) activity; oxidoreductase hydrolase activity	
AoAoRoF394	AB hydrolase-1 domain-containing protein				
AoAoRoIK90	Serine hydroxymethyltransferase		glycine biosynthetic process from serine; tetrahydrofolate interconversion; One-carbon metabolism	glycine hydroxymethyl transferase activity; pyridoxal phosphate binding; transferase	
AoAoS3SB57	Peroxidase		hydrogen peroxide catabolic process; response to oxidative stress; Hydrogen peroxide	heme binding; lactoperoxidase activity; metal ion binding; Oxidoreductase; Peroxidase	extracellular region
AoA8B8M7J0	Annexin		response to stress	calcium ion binding; calcium ion binding; hydrolase activity	
AoA151S7M7	Beta-hexosaminidase		carbohydrate metabolic process	beta-N-acetylhexosaminidase activity; N-acetyl-beta-D-galactosaminidase activity; Glycosidase; Hydrolase	
AoA151SKS9	Monocopper oxidase-like protein SKU5			copper ion binding; L-ascorbate oxidase activity; oxidoreductase	
AoA1J7H4F6	phosphoglycerate mutase (2,3-diphosphoglycerate-independent)		glucose catabolic process; glycolytic process; glycolysis	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase activity; manganese ion binding; isomerase	cytoplasm
AoA1S2XBF4	Proline iminopeptidase		proteolysis	aminopeptidase activity; Aminopeptidase; Hydrolase; Protease	cytoplasm
AoA834X210	Beta-galactosidase		carbohydrate metabolic process	beta-galactosidase activity; Glycosidase; hydrolase	membrane
AoA1S2YFY5	Actin-depolymerizing factor 1-like		actin filament depolymerization	actin binding	actin cytoskeleton
AoA1S2Z749	Probable UDP-arabinopyranose mutase			RNA binding	

Accession	Name	Ncbi Blastp	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
AoA2Z6N5R4	Aminopeptidase		proteolysis	aminopeptidase activity; metallopeptidase activity; zinc ion binding; Hydrolase; Protease	intracellular membrane-bounded organelle; membrane
AoA392RFA2	Polyubiquitin 4-like			mRNA binding	
AoA444YKF2	Cupin type-2 domain-containing protein		carbohydrate metabolic process	isomerase activity	
AoA6A4N2P7	Putative cystathionine beta-lyase, pyridoxal phosphate-dependent transferase		biosynthetic process	lyase activity; pyridoxal phosphate binding; transferase activity	
AoA834SVC7	Thaumatococcus protein 1				
AoA834T7U1	Putative N-succinyldiaminopimelate aminotransferase DapC		biosynthetic process	pyridoxal phosphate binding; transaminase activity; Aminotransferase; Transferase	nucleus
AoA834WDT9	Class-10 pathogenesis-related protein 1-like		abscisic acid-activated signaling pathway; defense response; response to biotic stimulus	abscisic acid binding; protein phosphatase inhibitor activity; signaling receptor activity	
AoA834WF35	Kunitz-type trypsin inhibitor alpha chain-like			serine-type endopeptidase inhibitor activity; Protease inhibitor; Serine protease inhibitor	
AoA8B8K7U5	Uncharacterized protein LOC113853591			hydrolase activity	
B1Q1N8	glutathione transferase		glutathione metabolic process; response to chemical	glutathione transferase activity; transferase	
AoA8B8KRR2	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase isoform X2		proteolysis	carboxypeptidase activity; serine-type exopeptidase activity; Carboxypeptidase; Hydrolase; Protease	membrane
AoA8B8MD21	Actin-depolymerizing factor 2-like isoform X1		actin filament depolymerization	actin binding	actin cytoskeleton
AoA8B8MFQ7	Monodehydroascorbate reductase isoform X2			flavin adenine dinucleotide binding; oxidoreductase activity	
AoA9D5BB42	Glutathione S-transferase		glutathione metabolic process; response to chemical	glutathione transferase activity; transferase	cytosol
A2SY66	Vicianin hydrolase		carbohydrate catabolic process	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds; vicianin beta-glucosidase activity; Glycosidase; hydrolase	

Accession	Name	Ncbi Blastp	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
A4PU48	S-adenosylmethionine synthase		one-carbon metabolic process; S-adenosylmethionine biosynthetic process; One-carbon metabolism	ATP binding; metal ion binding; methionine adenosyltransferase activity; transferase	cytoplasm
B2LSD2	Cysteine proteinase mucunain		proteolysis	cysteine-type peptidase activity; proteinase activated receptor binding; hydrolase; protease; thiol protease	vacuole
P08927	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic		protein refolding	ATP binding; ATP-dependent protein folding chaperone; chaperone	chloroplast
P13548	V-type proton ATPase catalytic subunit A		Hydrogen ion transport; ion transport; transport	ATP binding; ATP hydrolysis activity; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism; Translocase	proton-transporting V-type ATPase, V1 domain
P16346	Bowman-Birk type wound-induced trypsin inhibitor			serine-type endopeptidase inhibitor activity; Protease inhibitor; serine Protease inhibitor	extracellular region
P25698	Elongation factor 1-alpha		translation; translational elongation	GTP binding; GTPase activity; translation elongation factor activity	cytoplasm
P31023	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial			dihydrolipoyl dehydrogenase activity; flavin adenine dinucleotide binding; oxidoreductase	glycine cleavage complex; mitochondrial matrix; mitochondrion
P35694	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2		cell wall biogenesis; xyloglucan metabolic process	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds; polysaccharide binding; xyloglucan:xyloglucosyl transferase activity; glycosidase; hydrolase; transferase	apoplast;
P38548	GTP-binding nuclear protein Ran/TC4		nucleocytoplasmic transport; protein transport	GTP binding; GTPase activity	nucleus
P46259	Tubulin alpha-1 chain		microtubule-based process	GTP binding; hydrolase activity; metal ion binding; structural constituent of cytoskeleton; hydrolase	cytoplasm; microtubule
P51851	Pyruvate decarboxylase 2			magnesium ion binding; pyruvate decarboxylase activity; thiamine pyrophosphate binding; lyase	

Accession	Name	Ncbi Blastp	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
Q41107	Inositol-3-phosphate synthase		inositol biosynthetic process; phospholipid biosynthetic process; Inositol biosynthesis; Lipid biosynthesis; Lipid metabolism; Phospholipid biosynthesis; Phospholipid metabolism	inositol-3-phosphate synthase activity; Isomerase	cytosol; nucleus
Q41649	FK506-binding protein 2		chaperone-mediated protein folding; Stress response	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity; Isomerase; Rotamase	endoplasmic reticulum lumen
Q43621	Glutathione reductase, cytosolic		cell redox homeostasis; glutathione metabolic process	flavin adenine dinucleotide binding; glutathione-disulfide reductase (NADP) activity; NADP binding; Oxidoreductase	cytoplasm
Q93YB2	Aminoaldehyde dehydrogenase 2, peroxisomal		cellular detoxification of aldehyde; glycine betaine biosynthetic process from choline	aminobutyraldehyde dehydrogenase activity; gamma-guanidinobutyraldehyde dehydrogenase activity; nucleotide binding; protein homodimerization activity; sodium ion binding; Oxidoreductase	peroxisome
Q9SM60	Phosphoglucomutase, cytoplasmic		glucose metabolic process; Carbohydrate metabolism; Glucose metabolism	magnesium ion binding; phosphoglucomutase activity; Isomerase	cytoplasm
Q9SXU1	Proteasome subunit alpha type-7		ubiquitin-dependent protein catabolic process		cytoplasm; nucleus; proteasome core complex, alpha-subunit complex
AoA072TFZ1	non-reducing end alpha-L-arabinofuranosidase		L-arabinose metabolic process	alpha-L-arabinofuranosidase activity; Hydrolase	
AoA072U4C8	L-allo-threonine aldolase-like protein		glycine biosynthetic process; threonine catabolic process	L-allo-threonine aldolase activity; Lyase	cytosol
AoA072UMK4	Gamma-aminobutyrate transaminase			pyridoxal phosphate binding; transaminase activity	
AoA072UPD2	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase		fatty acid biosynthetic process; lipid A biosynthetic process	(3R)-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase activity; (3R)-hydroxymyristoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase activity; Lyase	cytoplasm
AoA072UWX4	Small ubiquitin-related modifier		protein sumoylation; Ub1 conjugation pathway	protein tag activity; ubiquitin-like protein ligase binding	nucleus
AoA072V357	Putative tetraspanin/Peripherin	Tetraspanin-8	auxin-activated signaling pathway		plasma membrane; plasmodesma

Accession	Name	Ncbi Blastp	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
AoAo72V8V5	Shikimate/quininate hydroxycinnamoyltransferase			acyltransferase activity, transferring groups other than amino-acyl groups	
AoAo72VSL4	Vacuolar proton pump subunit B		ATP metabolic process; vacuolar acidification; Hydrogen ion transport; Ion transport; Transport	ATP binding; hydrolase activity; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism; Hydrolase	proton-transporting V-type ATPase, V1 domain
AoAoB2P2H2	Kunitz-type trypsin inhibitor KTI1			endopeptidase inhibitor activity	
AoAoB2PEo2	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial			isovaleryl-CoA dehydrogenase activity; Oxidoreductase	
AoAoB2PHW5	laccase		lignin catabolic process; Lignin degradation	copper ion binding; hydroquinone:oxygen oxidoreductase activity; Oxidoreductase	apoplast
AoAoB2PYo7	Pectin acetyltransferase		cell wall organization	hydrolase activity; Hydrolase	extracellular region
AoAoB2PY33	Putative 12-oxophytodienoate reductase 11			12-oxophytodienoate reductase activity; FMN binding; Oxidoreductase	
AoAoB2QGLo	Protein trichome birefringence-like 38 isoform B			O-acetyltransferase activity	
AoAoB2QJW1	Pyruvate kinase		phosphorylation; glycolysis	ATP binding; kinase activity; magnesium ion binding; potassium ion binding; pyruvate kinase activity; kinase; transferase	cytoplasm; intracellular membrane-bounded organelle;
AoAoB2QTY7	Dihydropyrimidine dehydrogenase (NADP(+)), chloroplastic		beta-alanine biosynthetic process	dihydropyrimidine dehydrogenase (NADP+) activity; hydrolase activity; oxidoreductase	cytoplasm
AoAoB2QU56	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha, mitochondrial		tricarboxylic acid cycle	nucleotide binding; succinate-CoA ligase (ADP-forming) activity; ligase	mitochondrion
AoAoB2RoP9	Superoxide dismutase			metal ion binding; superoxide dismutase activity; oxidoreductase	
AoAoB2R1Q9	N-carbamoylputrescine amidase		polyamine biosynthetic process	beta-ureidopropionase activity; N-carbamoylputrescine amidase activity; hydrolase	
AoAoB2RAJ5	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM5		mRNA processing; RNA splicing; mRNA splicing	RNA binding; Ribonucleoprotein	membrane; spliceosomal complex
AoAoB2S393	Programmed cell death protein 5			DNA binding	
AoAoL9TAF3	DJ-1/PfpI domain-containing protein				

Accession	Name	Ncbi Blastp	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
AoAoL9TIP2	Aromatic amino acid beta-eliminating lyase/threonine aldolase domain-containing protein		amino acid metabolic process	lyase activity	
AoAoL9TS24	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase			aldehyde dehydrogenase (NAD+) activity; oxidoreductase	
AoAoL9TWE6	Glycine cleavage system H protein		glycine decarboxylation via glycine cleavage system		glycine cleavage complex; mitochondrion
AoAoL9UA44	alanine transaminase		biosynthetic process; L-alanine catabolic process	pyridoxal phosphate binding; transaminase activity	
AoAoL9UAA1	Sucrose synthase		response to mannitol; response to water deprivation; seed maturation; starch metabolic process; sucrose metabolic process	sucrose synthase activity; Glycosyltransferase; Transferase	
AoAoL9UE93	E2 ubiquitin-conjugating enzyme		ubiquitin-dependent protein catabolic process; Ubl conjugation pathway	ATP binding; ubiquitin conjugating enzyme activity; transferase	
AoAoL9UJ75	Succinate-semialdehyde dehydrogenase		gamma-aminobutyric acid catabolic process	succinate-semialdehyde dehydrogenase (NAD+) activity; oxidoreductase	mitochondrion
AoAoL9VKN4	ribose-5-phosphate isomerase		pentose-phosphate shunt, non-oxidative branch	ribose-5-phosphate isomerase activity; isomerase	
AoAoL9VQ32	Subtilisin-like protease		proteolysis; response to symbiotic fungus	serine-type endopeptidase activity; Hydrolase; Protease; Serine protease	
AoAoL9VQH1	FAD/NAD(P)-binding domain-containing protein			flavin adenine dinucleotide binding; oxidoreductase activity	
AoA151RXL7	Beta-D-xylosidase 1		xylan catabolic process	xylan 1,4-beta-xylosidase activity; Glycosidase; Hydrolase	extracellular region
AoA151SRV9	glucose-6-phosphate 1-epimerase		carbohydrate metabolic process	carbohydrate binding; glucose-6-phosphate 1-epimerase activity; isomerase	
AoA151T252	Beta-D-xylosidase 4		xylan catabolic process	xylan 1,4-beta-xylosidase activity; Glycosidase; Hydrolase	extracellular region
AoA151TV06	RING finger and WD repeat domain-containing protein 3		interstrand cross-link repair; protein ubiquitination	ubiquitin-protein transferase activity	nucleus

Accession	Name	Ncbi Blastp	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
AoA151UEo8	Bet v I/Major latex protein domain-containing protein		abscisic acid-activated signaling pathway; defense response	abscisic acid binding; protein phosphatase inhibitor activity; signaling receptor activity	
AoA1J7FXD2	Glutathione peroxidase		response to oxidative stress	glutathione peroxidase activity; Oxidoreductase; Peroxidase	membrane
AoA1J7FZD4	Profilin			actin binding	cytoplasm; cytoskeleton
AoA1S2XZL5	Probable cysteine protease RD21B		proteolysis	cysteine-type peptidase activity; Hydrolase; protease; thiol protease	
AoA1S2Y2Yo	Cyanate hydratase		cyanate metabolic process	cyanate hydratase activity; DNA binding; lyase	
AoA1S2YJ21	Acyl-coenzyme A oxidase		fatty acid beta-oxidation	acyl-CoA oxidase activity; FAD binding	peroxisome
AoA1S2YRH4	Aldose 1-epimerase		hexose metabolic process; Carbohydrate metabolism	aldose 1-epimerase activity; carbohydrate binding; isomerase	
AoA2K3LH32	Monodehydroascorbate reductase			flavin adenine dinucleotide binding; oxidoreductase activity	
AoA2K3NEE2	peptide-methionine (S)-S-oxide reductase			peptide-methionine (S)-S-oxide reductase activity; oxidoreductase	
AoA368UHS4	Uncharacterized protein				
AoA371EC83	Thiol protease aleurain-like protein		proteolysis	cysteine-type peptidase activity; Hydrolase; Protease; Thiol protease	
AoA371F5J4	Ferredoxin		Electron transport; Transport	2 iron, 2 sulfur cluster binding; electron transfer activity; metal ion binding	chloroplast
AoA371FUF6	Anthocyanidin reductase ((2S)-flavan-3-ol-forming)				
AoA371G6H4	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase		valine catabolic process	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase activity; hydrolase	
AoA371IoSo	Dihydropyrimidinase			hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds	cytoplasm
AoA444WMX5	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase N-terminal domain-containing protein			FMN binding; oxidoreductase activity	
AoA444XZGo	Amidohydrolase 3 domain-containing protein			hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds	
AoA444Y8A4	Cupin type-1 domain-containing protein			nutrient reservoir activity; Seed storage protein; Storage protein	
AoA444YXM9	Oxalate--CoA ligase			ligase activity	

Accession	Name	Ncbi Blastp	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
AoA444ZWJ8	Homeobox-DDT domain protein RL1		Transcription; regulation of transcription by RNA polymerase II	DNA binding	nucleus
AoA445A007	Uncharacterized protein				membrane
AoA445JQG8	Eukaryotic initiation factor 4A-10 isoform A		Protein biosynthesis	ATP binding; hydrolase activity; RNA helicase activity; translation initiation factor activity; Helicase; Hydrolase; Initiation factor	
AoA4P1QU81	Uncharacterized protein				
AoA6A4PA14	Putative actinidain		proteolysis	cysteine-type peptidase activity; Hydrolase; Protease; Thiol protease	
AoA6A4QV58	Putative perakine reductase				
AoA834SR14	Fasciclin-like arabinogalactan protein 17				
AoA834SUJ5	N-acyl-aliphatic-L-amino acid amidohydrolase		amino acid metabolic process	aminoacylase activity	cytoplasm
AoA834To43	14-3-3-like protein A				
AoA834T220	Putative 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase-like 1, mitochondrial			NAD binding; NADP binding; oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor	
AoA834T4R4	Cryptdin protein-like protein				
AoA834T5W6	alanine-glyoxylate transaminase			transaminase activity; Aminotransferase; Transferase	
AoA834TBT0	fumarate hydratase		fumarate metabolic process; tricarboxylic acid cycle	fumarate hydratase activity	tricarboxylic acid cycle enzyme complex
AoA834TYU5	Chalcone-flavonone isomerase family protein		flavonoid biosynthetic process	intramolecular lyase activity	
AoA834W1J3	Stress-response A/B barrel domain-containing protein				
AoA834WBY8	Aminoacylase-1-like		amino acid metabolic process; DNA-templated transcription; Transcription; Transcription regulation	aminoacylase activity; DNA binding; DNA-binding transcription factor activity	cytoplasm; nucleus
AoA834WLL8	Alpha-xylosidase 1-like		carbohydrate metabolic process	carbohydrate binding; hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds; Glycosidase; Hydrolase	

Accession	Name	Ncbi Blastp	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
AoA834WW41	assimilatory sulfite reductase (ferredoxin)			4 iron, 4 sulfur cluster binding; heme binding; metal ion binding; sulfite reductase (ferredoxin) activity; oxidoreductase	chloroplast nucleoid
AoA834WXD5	Bifunctional aspartate aminotransferase and glutamate/aspartate-prephenate aminotransferase		biosynthetic process	pyridoxal phosphate binding; transaminase activity; Aminotransferase; Transferase	
AoA834X4Ro	Putative acylpyruvase FAHD1, mitochondrial			catalytic activity	
AoA835CFV6	Cysteine synthase		cysteine biosynthetic process from serine; Amino-acid biosynthesis; cysteine biosynthesis	cysteine synthase activity; transferase	
AoA835CG68	Protein HEADING DATE 3A-like				cytoplasm
AoA8B8JLK7	NAD(P)H-dependent 6'-deoxychalcone synthase-like			oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor	
AoA8B8KS99	Beta-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase 2		xylan catabolic process	xylan 1,4-beta-xylosidase activity; Glycosidase; Hydrolase	extracellular region
AoA8B8LLF1	Uncharacterized protein LOC113865686			calcium ion binding	
AoA8B8LUN2	Uncharacterized protein LOC113867457				membrane
AoA8B8MGN1	Uncharacterized protein LOC113873079			nitronate monooxygenase activity	
AoA9D5A2H6	NAD(P)-binding domain-containing protein			oxidoreductase activity	
I3SIA1	Enoyl reductase (ER) domain-containing protein			oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors, NAD or NADP as acceptor; zinc ion binding	
I3ToPo	Aspartyl aminopeptidase		proteolysis	aminopeptidase activity; metallopeptidase activity; zinc ion binding; Aminopeptidase; Hydrolase; Metalloprotease; Protease	
Q531A8	FCA gamma			RNA binding	
V7BK11	Uncharacterized protein		proteolysis	cysteine-type peptidase activity; Hydrolase; Protease; Thiol protease	

