ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Aly Jesús
Castillo Zamora

Tesis doctoral

Obtención, caracterización analítica y aplicación industrial de extractos bioactivos procedentes de los sectores agroalimentario y acuícola

Santiago de Compostela, 2024

Programa de doctorado en Ciencia y Tecnología Química

ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

TESIS DOCTORAL

OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA Y APLICACIÓN INDUSTRIAL DE EXTRACTOS BIOACTIVOS PROCEDENTES DE LOS SECTORES AGROALIMENTARIO Y ACUÍCOLA

Aly Jesús Castillo Zamora

Directoras: Marta Lores Aguín y Carmen María García Jares
Tutora Industrial: Marta Lores Aguín

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2024

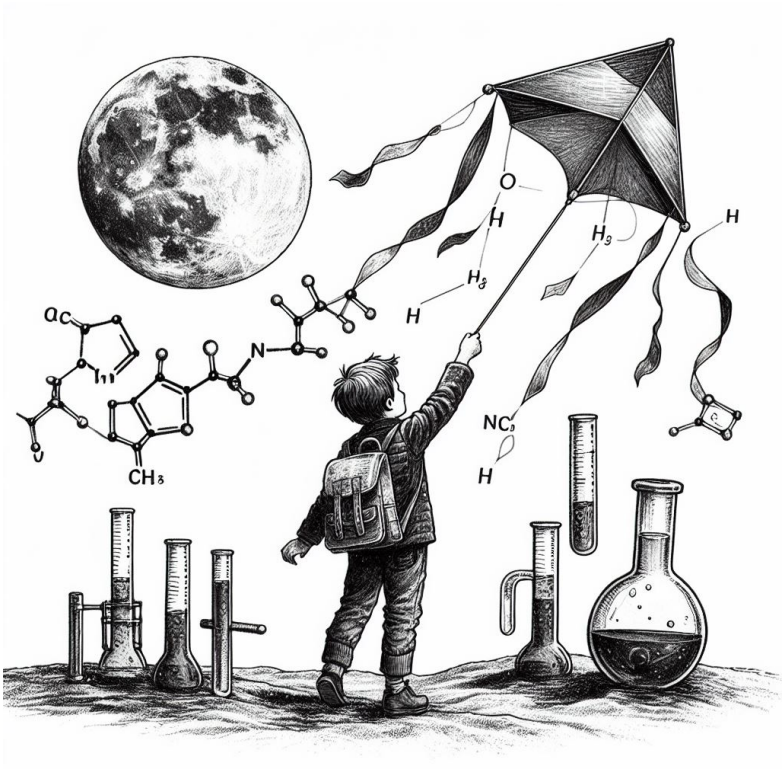
USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Hace mucho tiempo, cuando aún cabalgaba el potro pío de la infancia, solía ir a una huerta detrás de mi casa y pasarme horas enteras elevando un papagayo.

Perdedera de tiempo, ganas de hacer nada; decía mi familia, y me colmaban de reproches y se empeñaban en demostrarme la inutilidad de mi esfuerzo y la necesidad de aprender cosas útiles y ¡nunca les hice caso!

La vida, a golpes, me ha enseñado que no se hace compañía juntando soledades, ni se construyen puentes con serpentinas, ni se evitan bombardeos creando pájaros; pero, yo soy tonto definitivamente y sigo elevando el papagayo.

Hugo Fernández Oviol



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

FINANCIACIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Esta tesis doctoral no sería posible sin el apoyo financiero de las siguientes instituciones:

i-Grape Laboratory S.L.

Cross-disciplinary Research in Environmental Technologies - CRETUS (Centro de Investigación, ED431E 2018/01).

Programa Horizon 2020-Investigación y Desarrollo de la Unión Europea No. 101036768 (NeoGiANT).

Xunta de Galicia. Proyectos ED431 2020/06 y ED431 2023/04 (Ayudas para la consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas, Xunta de Galicia).

Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines - SECyTA.

Programa IACOBUS.

Esta tesis es parte de la ayuda DIN2021-011976 financiado por el MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Por suerte esta página fue una de las más complejas de escribir, ya que este trabajo recopila el apoyo de tantas personas en estos años de investigación, las cuales me es imposible resumir en pocos párrafos, siendo de por sí difícil, por la personalidad que me caracteriza, lo de ser breve. Al mismo tiempo, tengo la buena certeza que, de no existir este epígrafe, las personas involucradas en este trabajo saben lo agradecido que estoy, siendo "muchísimas gracias" una de las palabras más repetidas. De esta manera, los párrafos siguientes solo servirán para recalcar lo que espero haber trasmitido durante todas esas llamadas de madrugada y festivos, así como un espacio para el recuerdo, ya que como dice Gustavo Pereira, "los libros esperan" a nuestra visita, remembrando todo este trabajo conjunto.

En primer lugar, quiero agradecer a mis dos tutoras Marta y Carmen, por la increíble oportunidad de trabajar a su lado durante todos estos años. Aunque soy un fiel no creyente del destino, tengo que aceptar que "*se alinearon todos los planetas*" teniendo la oportunidad de conocer a Marta, la cual me hizo tomarle todo este cariño a la química como a este proyecto. Agradecido siempre por tenderme la mano desde el primer momento, y apostar por este frío ingeniero. A Carmen, por ser la voz de la calma ante nuestras personalidades frenéticas (la de Marta y la mía), por su gran aprecio y por su invaluable conocimiento que me ha brindado a lo largo de todo este trabajo.

Quiero agradecer a todo el grupo de investigación LIDSA, que ha sido mi casa, de forma más que literal, habiendo pasado la mayor parte de mi día a día dentro de sus paredes. A María Celeiro, la cual ha sido una tercera tutora, por tenerme una paz infinita, apoyándome de forma incondicional y compartiendo una multitud de cafés. A Laura, mi compañera eterna de laboratorio, por mantenerme en una perenne clase de gallego, así como por persistir en la tarea de conservarme enfocado y recordarme lo que mi inquieta memoria olvida cada día. A Diego, por ser el cómplice en nuestros inventos, chapuzas y apaños; sacando adelante cada uno de los objetivos. A Rocío, por compartir conmigo su actitud enérgica, como las palabras latinas que he podido trasmitir. A Miguel por todo el trabajo y apoyo. Y a Fran, por su hermosa personalidad y perseverancia.

Agradecido con la empresa i-Grape, por brindarme la oportunidad de trabajar desde el primer momento codo a codo. A Juan, por nuestras muchas recolecciones de bagazo, por todo el apoyo en cada lucha de convocaría donde participé, como en nuestras constantes llamadas de último momento. A David y a David, mi sincero agradecimiento tanto en el soporte en todo el marco del desarrollo ingenieril, así como sus orientaciones en la preparación de todos los proyectos donde nos involucramos.

A Alicja Rosalowska, por ser mi amiga desde el primer día. Sin duda fuiste el inicio de este camino, y sabes que siempre te estaré infinitamente agradecido.

A la profesora Ana Otero y a Simón, por transmitirme el cariño a la biología, a las algas y específicamente a la increíble *H. pluvialis.* Y gracias por ser un soporte fundamental en este trabajo.

A todo o grupo do Instituto Politécnico de Bragança. À Professora Lillian Barros e ao Centro de Investigação de Montanha. À Tiane por ser um ser humano tão maravilhoso, e ao Felipe e Mikel por serem meus grandes amigos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Grateful to the Faculty of Food Technology in Osijek. To Ante, Stela and Kruno for their mentorship and for their acceptance as one of us at PTFOS. To Kristina, Ivana and Ina for their friendship and support, and for understanding my English.

A la profesora Mirna Ruíz, por motivarme y reafirmarme que mi ruta era esta.

A la Universidad Simón Bolívar, la cual le tengo un cariño enorme, y que espero volver a ver con su hermoso Laberinto Cromovegetal.

A la Universidad de Santiago de Compostela, y específicamente al departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología por brindarme todos los recursos y espacios disponibles para la elaboración de este trabajo.

De la misma manera, quiero agradecer a nuestro grupo vecino GETEE por su apoyo fraternal, así como a Paloma por ser una gran amiga.

A esta tierra gallega que me acobijó.

A Carmen y a Santi, ya que sin ellos nada de esto hubiese sido posible.

A Andrés, Tibisay y a Amanda por ser más que todo.

A Antonio y a Juani por tratarme como uno más de la familia.

Finalmente, gracias, Carla, mi compañera de camino. Aunque sabes que soy más de acción que de palabra, y conoces mi rebeldía ante agradecimientos prescritos, te quiero y te admiro. Te agradezco tu apoyo incansable, tu alegría y ocurrencias. Gracias por sacarme del trabajo y mostrarme que hay cosas más allá de las probetas, por ser mi guía turística, y por todos los increíbles momentos. Y, sobre todo, gracias por hacerme mejor ser humano.

"Gracias… totales"

Gustavo Cerati

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS i

ABSTRACT vi

I. HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS 1

II. INTRODUCCIÓN 7

1. EXTRACTOS BIOACTIVOS 8

1.1. Introducción 8
1.2. Compuestos bioactivos 9
1.2.1. Compuestos fenólicos 9
1.2.2. Carotenoides 14

2. ALGAS 17

2.1. Introducción 17
2.2. Microalgas 17
2.2.1. *Haematococcus pluvialis* 18
2.3. Macroalgas 20
2.3.1. Algas verdes 21
2.3.2. Algas rojas 22
2.3.3. Algas pardas 23

3. EXTRACTOS BIOACTIVOS DE SUBPRODUCTOS AGROALIMENTARIOS 27

3.1. Introducción 27
3.2. Bagazo de uva 28
3.2.1. Compuestos bioactivos en el bagazo de uva 28

4. TÉCNICAS EXTRACTIVAS 32

4.1. Dispersión de Matriz en Fase Sólida (MSPD) 32
4.2. Extracción a escala mediana y a temperatura ambiente (MSAT) 34
4.2.1. Procedimiento experimental 34
4.2.2. Aplicaciones 35
4.3. Disruptor celular 36
4.3.1. Introducción 36
4.3.2. Disruptores mecánicos 37
4.4. Extracción Asistida por Ultrasonidos (UAE) 39

5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS 43

5.1. Espectroscopía de absorción molecular UV-Vis 43

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.1.1. Contenido fenólico total (TPC) 43
5.1.2. Actividad antioxidante (AA) 45
5.2. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) 47
5.2.1. Detector de matriz de diodos (DAD) 48
5.2.2. Espectrometría de masas (MS) 48
5.2.3. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS) 49
5.2.4. Espectrómetro cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) 50
5.3. Disociación inducida por colisión de banda ancha (bbCID) 50
5.3.1. Análisis dirigido (*targeted*) 52
5.4. AutoMS/MS 52
5.4.1. Análisis no dirigido (*untargeted*) 53
5.4.2. Algoritmo de identificación de compuestos *untargeted* 53
BIBLIOGRAFÍA 57

III. METODOLOGÍA 76

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 80

IV-I. SECCIÓN DE TRABAJOS PUBLICADOS 81

Capítulo 1. Métodos verdes de extracción de matrices de origen acuícola 82

1.1. Microalgas 84

1.1.1. Matrix solid-phase dispersion as a greener alternative to obtain bioactive extracts from *Haematococcus pluvialis*. Characterization by UHPLC-QTOF 84

1.1.2. Multicomponent bioactive extract from red stage *Haematococcus pluvialis* wet paste: avoiding the drying step and toxic solvents 98

1.2. Macroalgas 117

1.2.1 Bioprospecting of targeted phenolic compounds of *Dictyota dichotoma*, *Gongolaria barbata*, *Ericaria amentacea*, *Sargassum hornschuchii* and *Ellisolandia elongata* from the adriatic sea extracted by two green methods 117

Capítulo 2. Métodos verdes de extracción de matrices agroindustriales 133

2.1. Optimization of bioactives extraction from grape marc via a medium scale ambient temperature system and stability study 135

Capítulo 3. Aplicaciones de los extractos bioactivos en la industria alimentaria 148

3.1. Extractos acuícolas 150

3.1.1. The generally recognized as safe (GRAS) microalgae *Haematococcus pluvialis* (wet) as a multifunctional additive for coloring and improving the organoleptic and functional properties of food 150

IV-II. SECCIÓN DE TRABAJOS NO PUBLICADOS 165

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2. Extractos agroindustriales 166
3.2.1. Tracking *in vivo* bioconversion of polyphenols through the digestive system of swine fed a grape marc extract-enriched diet (Trabajo no publicado) 166
Capítulo 4. Escalado industrial de los extractos bioactivos (Datos no publicados) .. 195
4.1. Antecedentes 197
4.2. Ensayos preliminares 199
4.2.1. Ausencia de compuestos no deseados 199
4.2.2. Selección de disolventes 200
4.3. Optimización a escala piloto 201
4.4. Proyección a la plataforma industrial 203
4.5. Previsión de materia prima 203
4.6. Almacenamiento de materia prima 203
4.7. Escalado del proceso productivo 204
4.8. Desarrollo de un prototipo sólido 206
V. DISCUSIÓN GENERAL 209
5.1. Métodos verdes de extracción a matrices de origen acuícolas 211
5.1.1. Microalgas 211
5.1.2. Macroalgas 214
5.2. Métodos verdes de extracción a matrices agroindustriales 215
5.3. Aplicaciones de los extractos bioactivos en la industria alimentaria 216
5.3.1. Aplicaciones de extractos acuícolas 216
5.3.2. Aplicaciones de extractos agroindustriales 218
5.4. Escalado industrial de los extractos bioactivos 220
VI. CONCLUSIONS 223
ANEXO I. Lista de publicaciones 229
ANEXO II. Permiso de las revistas 233
ANEXO III. Índice de figuras y tablas 238
ANEXO IV. Autorización de la legislación ética aplicable a ensayos con muestras animales 244

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

		#
μ	Micro	Micro
~	Aproximado	Average
Δ	Diferencia	Difference
		A
AA	Actividad antioxidante	Antioxidant activity
AAPH	Diclorhidrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano	2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)
API	Ionización a presión atmosférica	Atmospheric pressure ionization
APCI	Ionización química a presión atmosférica	Atmospheric pressure chemical ionization
AutoMS/MS	Adquisición automática de masas/masas	Automatic acquisition of masses/masses
		B
bbCID	Disociación inducida por colisión de banda ancha	Broadband collision-induced dissociation
		C
CE	Energía de colisión	Collision energy
CID	Disociación inducida por colisión	Collision-induced dissociation
CUPRAC	Poder antioxidante reductor cúprico	Copper reducing antioxidant power
		D
DAD	Detector de matriz de diodos	Diode array detector
DDA	Adquisición dependiente de datos	Data dependent acquisition
DIA	Adquisición independiente de datos	Data independent acquisition
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
		E
ECD	Disociación por captura de electrones	Electron capture dissociation
EI	Ionización por electrones	Electron Ionisation
ESI	Ionización por electro spray	Electrospray ionization
ETD	Disociación por transferencia de electrones	Electron-transfer dissociation
		F
FOX	Oxidación ferrosa-naranja xilenol	Ferrous oxidation-xylenol orange
FRAP	Poder reductor/antioxidante férrico	Ferric reducing/antioxidant power
FTC	Tiocianato férrico	Ferric thiocyanate
		G
GAE	Equivalente de ácido gálico	Gallic acid equivalent
GC	Cromatografía de gases	Gas chromatography
GRAS	Generalmente reconocidos como seguros	Generally recognized as safe
		H
h	Hora	Hour
HESI	Ionización por electroespray con calor	Heated electrospray ionization

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

HORAC	Capacidad antioxidante de los radicales hidroxilo	Hydroxyl radical antioxidant capacity
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución	High performance liquid chromatography
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución	High resolution mass spectrometry
Hz	Hercio	Hertz
		I
IRMPD	Disociación de fotones múltiples por infrarrojos	Infrared multiple photon dissociation
		K
K	Kelvin	Kelvin
k	kilo	kilo
		L
LC	Cromatografía líquida	Liquid chromatography
		M
mDA	Milidalton	Milidalton
MRM	Monitoreo de reacciones múltiples	Multiple reaction monitoring
MS	Espectrometría de masas	Mass spectrometry
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem	Tandem mass spectrometry
MSAT	Extracción a mediana escala y a temperatura ambiente	Medium scale and ambient temperature
MSPD	Dispersión de matriz en fase sólida	Matrix solid-phase Dispersion
MW	Peso molecular	Molecular weight
m/z	Relación masa-carga	Mass-to-charge ratio
		O
ORAC	Capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno	Oxygen radical absorbance capacity
		P
Pa	Pascal	Pascal
PFRAP	Poder reductor de ferricianuro de potasio	Reducing power of potassium ferricyanide
pH	Potencial de hidrógeno	Hydrogen potential
PLE	Extracción líquida presurizada	Pressurized liquid extraction
ppm	Partes por millón	Parts per million
PTFE	Politetrafluoroetileno	Polytetrafluoroethylene
PRM	Monitoreo de reacciones paralelas	Monitoring of parallel reactions
		Q
Q	Cuadrupolo	Quadrupole
QqQ	Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo	Triple quadrupole mass spectrometer
QTOF	Espectrometría de masas cuadrupolar y tiempo de vuelo	Quadrupole time-of-flight mass spectrometry
		R
RSD	Diseño de superficie de respuesta	Response surface design
		S
SPME	Microextracción en fase sólida	Solid phase microextraction

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SRM	Monitorización de reacciones seleccionadas	Selected reaction monitoring
SID	Disociación inducida por superficie	Surface-induced dissociation
		T
TOF	Tiempo de vuelo	Time of flight
TPC	Contenido fenólico total	Total phenolic content
TRE	Equivalente de trolox	Trolox equivalent
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico	6-hydroxy2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
		U
UAE	Extracción asistida por ultrasonidos	Ultrasound-assisted extraction
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución	Ultra-high performance liquid chromatography
UV	Ultravioleta	Ultraviolet
UV-Vis	Ultravioleta visible	Visible ultraviolet
		W
W	Vatios	Watts

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABSTRACT

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

The main objective of this thesis focuses on obtaining bioactive extracts from food industry by-products and neglected aquaculture sources, using innovative extractive methodologies in both fields. This work was carried out with the purpose of integrating these functionalities into final applications and industrial processes. The first goal involves the adaptation and optimisation of simple extractive methodologies with minimal requirements for the generation of multicomponent extracts in aquaculture matrices, represented by micro and macroalgae, as well as by-products from the food industry such as grape marc. The second goal is the in-depth analysis of the functionalities of the extracts through the quantification of bioactivities and the characterisation of their individual profile, using chromatographic analytical methodologies, which provided a better understanding of the compounds responsible for these properties. A third goal focuses on the validation of the extracts through their application as functional additives in food and feed matrices, evaluating both the properties conferred to the final products and the metabolic responses derived from the ingestion of these extracts, through metabolomic analysis. As an integral closure of this study, a fourth goal is proposed, dedicated to the application of the extracts through the design of production lines for their generation on an industrial scale.

This work is structured in six sections. **Section I**, Justification and objectives, presents the core of the two groups of bioactive sources studied here, such as the development of the proposed guidelines for the achievement of the goals of each analysis. **Section II**, Introduction, is shown as a theoretical framework, proposing itself as an induction to the following sections through bibliographic support. **Section III**, Methodology, summarises the different techniques applied to the different matrices studied, together with the analysis instruments used in the metabolomic detection and evaluation processes. **Section IV** corresponds to the presentation of results and their discussion, setting out the objectives achieved, including the outcome of the experimental work applied in each analysis.

The development of this thesis incorporates a total of **5 published works**, a complete study in the process of submission (not published) and, as a closing work, a report documenting the application of the work developed within the framework of the "Industrial Doctorate" mention.

Chapter 1. Green extraction methods to matrices of aquaculture origin

This chapter discusses three publications focusing on the extraction of phytochemicals from aquaculture matrices, represented by microalgae, through the extraction of bioactives from the species *Haematococcus pluvialis*, and macroalgae mainly endemic to the central Adriatic Sea. In the initial study, a first application of the matrix solid-phase dispersion (MSPD) extractive technique to the microalgae *H. pluvialis* is addressed, applying high performance liquid chromatography techniques coupled to a diode array detector (HPLC-DAD) and ultra-high performance coupled to a quadrupole time-of-flight (UHPLC-QTOF) instrument. This allowed the detection of several bioactive compounds, mainly carotenoids and lipid derivatives, as well as the identification of new compounds not previously characterised in this microalga. In a second work, a novel extraction of *H. pluvialis* is proposed in the form of a wet paste, without performing common drying processes, in the search for a multicomponent extract with low energy requirements. In this context, metabolomic analysis allowed the identification of phenolic compounds of great interest not detected in the microalgae in its red state of carotenogenesis. Also, using chromatographic techniques such as HPLC-DAD and UHPLC-QTOF, a complete profile of the microalgae paste was obtained.

USC DE COMPOSTELA

In the third work, the knowledge acquired in the extractive processes from microalgae was transferred to macroalgae species, which are scarcely studied and of great interest due to their resilience in adverse environments. Thus, 5 different species were evaluated through a comparative study of traditional extractive techniques and MSPD. An extensive polyphenolic profile for these species, which had not been previously reported, was obtained by HPLC coupled to a triple quadrupole (QqQ) tandem mass spectrometer (MS/MS). In addition, an evaluation of the sustainability of the proposed methodology was carried out, showing MSPD as an environmentally friendly and low-impact alternative for obtaining bioactive extracts from these macroalgae.

Chapter 2. Green extraction methods to agro-industrial matrices

This chapter, presented in a fourth publication, explored the application of a scalable, low-energy technique known as medium-scale ambient temperature system (MSAT) as a first step in the development of a bioactive extract from white grape marc, with the aim of its industrial application. The study included the operational analysis of the methodology, through response surface design (RSD) optimisation to generate the maximum extractive volume with the least amount of processed by-product. In a second stage, an extensive analysis of different extractive solvents of the generally recognised as safe (GRAS) category was carried out, evaluating not only the bioactivities provided by each solvent and their aqueous mixtures, but also obtaining their characteristic polyphenolic profile. In addition, the stability of the extracts generated was tested through a periodic study, modifying the normal storage parameters and evaluating the polyphenolic profile, together with the bioactivities and physicochemical characteristics as a function of time.

Chapter 3. Applications of bioactive extracts in the food industry

This chapter includes a fifth publication, applying the functionalities evaluated in the first chapter of this thesis, by incorporating *H. pluvialis* microalgae paste into a food matrix. Thus, the microalgae paste is proposed as an enrichment of the functional and organoleptic properties of a food that includes basic ingredients in the confectionery industry. In this work, different analysis strategies such as gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and HPLC-DAD were used to obtain the nutritional profile provided to the food by the microalga. The functionalities obtained by *H. pluvialis* were contrasted with commercial synthetic additives by analysing the colour and texture of the fortified foods. A microbiological analysis was also developed through a periodic study of the stability of the food, both enriched with the microalga paste and the synthetic additive, together with a control group, revealing the action of the microalga paste against the bacterial growth of various strains responsible for food degradation.

The second part of this chapter is a work in process of submission (not published), which deals with the application of a bioactive extract, "e-Vitis", from white grape marc, as a functional enrichment in the diet of farm animals. The objective of this study focuses on the monitoring of phenolic compounds through the digestive process of swine as well as the metabolic actions derived from the intake of a diet rich in polyphenols, as indicators of the improvement of the health of these animals. For this purpose, a novel approach of the MSPD technique was applied to samples of gastric content, duodenum, jejunum, ileum, caecum, colon,

USC DE COMPOSTELA

faeces and urine from swine. By using high-resolution QTOF mass spectrometry, metabolomics tools and statistical analysis focused on clustering the data, the identification of multiple biomarkers that reveal the distinctive effect of e-Vitis ingestion is achieved.

Chapter 4. Industrial scale-up of bioactive extracts

This last chapter is presented in the form of an industrial report detailing the optimisation of the pilot-scale production process of the e-Vitis extract, developed in the previous chapter, and its subsequent scaling up to an industrial framework. Firstly, the feasibility of scaling up the MSAT technique is shown by expanding the bioactive properties of the extract and increasing production volumes. This is obtained through the optimisation of the critical operational parameters determined in the second chapter of this work, applying RSD taking as response the bioactive indicators total polyphenolic index and antioxidant activity. The second section shows various stages for the extrapolation of the methodology applied on a pilot scale to the industrial sector. In a schematic analysis, the stages of raw material supply, preservation and processing are developed. The integration of new production technologies is proposed as the creation of new products, specifically the development of a solid extract.

Section V, general discussion, provides a comprehensive global analysis of all the research carried out in this work.

Finally, **Section VI** presents a section of general conclusions, where the most outstanding aspects of each study are synthesised, thus providing closure for each objective addressed in the thesis.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

I. HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La realidad actual del sector agroalimentario se encuentra ante el desafío de atender demandas de producción cada vez más complejas, en un escenario marcado por la disminución progresiva de las fuentes de materias primas y suelos cultivables. Estas exigencias no se limitan únicamente a la tarea de cubrir las necesidades de las diversas líneas de producción agroalimentaria, sino que también implican la optimización del uso de los recursos disponibles, garantizando al mismo tiempo la calidad de los productos y la preservación de la salud de los campos agrícolas, las aguas y los animales involucrados. En respuesta, un enfoque tan antiguo como los problemas que se desean solucionar se muestra como una solución integral capaz de abordar múltiples aspectos. En este sentido, la adecuada gestión de los residuos para convertirlos en subproductos de alto valor añadido y la integración de fuentes renovables desatendidas de elevado potencial, las cuales requieren mínimos requisitos en su cultivo y pueden compensar las actuales fuentes agotadas, emergen como una solución viable y sostenible.

Una de las principales adversidades se encuentra en la rápida tecnificación y crecimiento de los medios de producción, lo cual contrasta con el desarrollo gradual de las tecnologías y procesos necesarios para afrontar las potenciales problemáticas derivadas de esta expansión. Por lo tanto, resulta esencial la potenciación de los estudios y análisis centrados en los procesos de reintroducción de subproductos en la cadena de valor. Es imperativo manejar esta integración utilizando técnicas tan contemporáneas como aquellas implementadas en los procesos productivos de vanguardia. El enfoque científico debe estar estrechamente ligado al proceso industrial, proporcionando una capacidad de respuesta ágil para canalizar los subproductos cerrando así el ciclo. De igual manera, los procesos de extracción y análisis deben ser capaces de potenciar al máximo las cualidades de las materias primas emergentes.

En este contexto, la presente tesis aborda tanto los procesos de revalorización de subproductos como la exploración de nuevas fuentes de materias primas de alto valor. Esto se logra desde la adaptación de las metodologías analíticas actuales y la implementación de procesos extractivos coherentes con su finalidad sostenible, hasta su aplicación, demostrando así no solo ser una propuesta potencial, sino una realidad palpable en la práctica. Así, esto es abordado a través de los siguientes objetivos:

I. Transformación del paradigma monoextractivo mediante la optimización de metodologías integrales para la obtención de compuestos bioactivos de diversos recursos acuícolas.

Se desarrolló una metodología basada en la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), una técnica sencilla de pocas etapas y de mínimos requerimientos energéticos, así como de bajos volúmenes de disolventes, para la extracción de compuestos bioactivos de diversas matrices de algas. A través de la aplicación de disolventes GRAS y medios dispersivos inocuos y biodegradables, se propuso la generación de extractos con elevado contenido en compuestos carotenoides, polifenoles y lípidos. En contraste con los principales métodos de extracción, se estableció un enfoque multiobjetivo que prioriza la generación de un extracto global en lugar de aislar analitos individuales. Este enfoque busca aprovechar la acción sinérgica de compuestos con actividades menos destacadas en términos de su función específica, pero que contribuyen a mejorar la bioactividad global del extracto. **(Sección IV, Capítulo 1, Subapartados 1.1 y 1.2)**.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

II. Optimización de una metodología para la generación de extractos bioactivos de fuentes agroindustriales y validación de su estabilidad.

Se optimizó el proceso extractivo denominado sistema a mediana escala a temperatura ambiente (MSAT), un método escalable y de bajo consumo energético. Se realizaron ajustes en los principales parámetros extractivos de esta técnica para obtener extractos polifenólicos derivados del principal subproducto de la industria vitivinícola. Se utilizaron disolventes reconocidos como seguros (GRAS) para generar extractos bioactivos, los cuales fueron cuantificados mediante medidas espectrofotométricas para determinar su contenido en polifenoles totales (TPC), actividad antioxidante (AA) y composición de azúcares. Además, se aplicó cromatografía líquida de alta resolución con detectores de masas en tándem (MS/MS) para un análisis más completo del perfil de los extractos, incluyendo la afinidad de decenas de compuestos fenólicos hacia diversos extractantes, así como su estabilidad mediante ensayos específicos **(Sección IV, Capítulo 2, Subapartado 2.1)**.

El desarrollo de este objetivo demuestra la funcionalidad de estos extractos agroindustriales y promueve el desarrollo de nuevos objetivos orientados a su aplicación en diversos campos, como el sector agroalimentario.

III. Incorporación de un proceso esquematizado para la identificación de compuestos de interés en matrices acuícolas y agroalimentarias mediante el uso de herramientas metabolómicas.

Se adaptó un algoritmo de cálculo que incorpora parámetros metabolómicos, como relaciones masa/carga de los iones detectados, espectros, abundancias isotópicas, correlaciones con familias de compuestos y comparación con bibliotecas espectrales. Mediante cromatografía líquida de alta resolución con analizadores de cuadrupolo y tiempo de vuelo (QTOF) en tándem, fueron obtenidos los datos metabolómicos analizados mediante el algoritmo propuesto, en combinación con herramientas quimiométricas, con el fin de establecer una metodología de identificación. Dicha metodología fue empleada tanto en el análisis de compuestos bioactivos presentes en microalgas como en la evaluación de las funcionalidades conferidas a animales de granja mediante la inclusión de extractos naturales derivados de subproductos del sector vitivinícola en sus piensos **(Sección IV, Capítulos 1 y 3, Subapartados 1.1 y 3.2)**.

IV. Aplicación y validación de fuentes bioactivas de origen acuícola en la mejora de las propiedades funcionales y organolépticas de productos alimentarios.

Se evaluó la aplicación de matrices acuícolas como fuente de compuestos bioactivos para mejorar la funcionalidad de los alimentos, centrándose en el enriquecimiento nutricional de carotenoides y lípidos, así como en sus propiedades organolépticas a través de la transferencia de color y mejora de sus características reológicas. Este análisis se llevó a cabo mediante la integración de diversas técnicas cromatográficas, utilizando tanto la separación por cromatografía líquida acoplada a un detector de matriz de diodos (DAD) para la detección de carotenoides y sus ésteres, como la cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (MS) para la cuantificación de cadenas lipídicas, principalmente de las familias omega-3 y omega-6. En línea con los objetivos marcados en esta tesis, se aplicó un enfoque innovador multicomponente en la aplicación directa de la biomasa húmeda de microalgas, incorporando

USC DE COMPOSTELA

todo su perfil nutricional. Por otro lado, las propiedades organolépticas y reológicas se evaluaron mediante un análisis comparativo con colorantes alimentarios sintéticos.

Además, se determinó el efecto sobre la estabilidad del alimento enriquecido con la pasta de microalga mediante un estudio periódico que incluyó análisis microbiológicos de los principales patógenos de degradación de alimentos, así como análisis de esfuerzo mecánico para verificar parámetros como la tenacidad y elasticidad de los alimentos enriquecidos. Asimismo, este objetivo se llevó a cabo siguiendo los parámetros de alimentación establecidos por la normativa europea en cuanto a la aplicación efectiva y segura de los componentes presentes en la pasta de microalga **(Sección IV, Capítulo 3, Subapartado 3.1)**.

V. Aplicación del uso de subproductos agroindustriales en la alimentación de animales de granja y validación como potencial preventivo en la resistencia a los antimicrobianos.

Se evaluó la aplicación de extractos funcionales ricos en compuestos fenólicos en la dieta de animales de granja mediante la administración de piensos enriquecidos con "e-Vitis", un extracto bioactivo derivado de subproductos de la industria vitivinícola. Este objetivo requirió, por un lado, la adecuación del extracto obtenido mediante la metodología patentada de mínimos requerimientos y condiciones de proceso a mediana escala y a temperatura ambiente (MSAT). Esta adaptación se ajustó a las concentraciones idóneas de disolvente GRAS aptas para el consumo animal, así como a una óptima palatabilidad y estructura final del pienso. Por otro lado, se llevó a cabo un estudio biológico para determinar el efecto funcional de las cadenas fenólicas a través del sistema digestivo de cerdos de engorde, utilizando la heurística metabolómica y el algoritmo de cálculo desarrollado en el marco del segundo objetivo de este trabajo.

Como pilar de esta tesis, la técnica extractiva MSPD (dispersión de matriz en fase sólida), se propuso en un nuevo enfoque integral para la extracción de compuestos bioactivos en las muestras biológicas de los animales alimentados con e-Vitis. Se demostró la aplicabilidad de esta técnica en estas matrices como un método rápido y de pocas etapas con una elevada reproducibilidad. La detección metabolómica se realizó mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a un analizador de masas en tándem con cuadrupolo y tiempo de vuelo (UHPLC-QTOF).

Además, este objetivo derivó en la recopilación de cientos de biomarcadores que generan una metodología de cuantificación de la funcionalidad proporcionada por los bioactivos contenidos en estos subproductos agrícolas sobre la alimentación animal (Sección IV, Capítulo 3, Subapartado 3.2).

VI. Desarrollo de un sistema piloto para la generación de extractos bioactivos diversos a partir de fuentes agroalimentarias

Se aplicó la metodología desarrollada a lo largo de esta tesis en un entorno industrial mediante el escalado y adaptación de los procesos extractivos en un marco piloto. Se integraron todos los elementos necesarios para la producción de extractos a gran escala, desde la recolección programada de subproductos estacionales, hasta el transporte a las instalaciones de fabricación, extracción y almacenamiento. Se llevó a cabo un enfoque ingenieril diseñando planes de proceso y tecnologías industriales compatibles con las etapas de la metodología

USC COMPOSTELA

MSAT. Además, se creó un prototipo de extracto sólido mediante el estudio de diversos equipos de secado, como liofilizadores, evaporadores y secadores por aspersión. Se respondió a las necesidades específicas de los diversos disolventes GRAS utilizados y de las matrices agroalimentarias tratadas, generando extractos estables y con un alto contenido bioactivo **(Sección IV, Capítulo 4, Subapartado 4.1)**.

Este último objetivo representa una integración entre los ámbitos académico e industrial, como parte de la categoría de Doctorado Industrial desarrollado en este trabajo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

II. INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. EXTRACTOS BIOACTIVOS

1.1. INTRODUCCIÓN

Como resultado de la actividad metabólica de las plantas se genera un abanico de compuestos que actúan de forma sinérgica para dar respuesta a sus necesidades biológicas de desarrollo, reproducción y adaptación. De forma general estos compuestos se han dividido en tres grandes bloques: metabolitos primarios, metabolitos secundarios y hormonas. Los metabolitos primarios desempeñan funciones destacadas en el crecimiento, desarrollo y reproducción de las células, así como precursores de la mayoría de los compuestos secundarios. Los metabolitos secundarios poseen una composición química más compleja, siendo generados en respuesta a diferentes formas de estrés biótico, así como para cumplir importantes tareas fisiológicas, como atraer a los polinizadores, establecer simbiosis, proporcionar componentes estructurales a las paredes celulares o como disuasores y/o repelentes de depredadores herbívoros. Las hormonas son catalogadas como reguladores del metabolismo incluyendo la función de producción de otros metabolitos.

Debido al atractivo efecto protector que ejercen los metabolitos secundarios sobre las plantas, este grupo de compuestos ha recibido un mayor interés, derivando en la exhaustiva exploración de sus capacidades farmacológicas, fungicidas, antioxidantes, biocidas, entre otras. De esta forma, el conjunto de compuestos con el potencial de aportar beneficios a la salud de los organismos vivos, constituidos por componentes extranutricionales que normalmente se encuentran en bajas cantidades en los alimentos y que ayudan a mejorar o estimular el sistema inmunológico, se denominan compuestos bioactivos. Así, son diversas las aplicaciones obtenidas al explotar las funcionalidades de estos metabolitos secundarios, ya bien sea mediante procesos de aislamiento y purificación, o mediante su extracción conjunta generando extractos bioactivos. En un enfoque comercial, dirigido hacia la diversificación de productos, se busca el aislamiento de compuestos específicos, asignando a cada nutracéutico una función particular y proporcionando un bioactivo en concentraciones elevadas que, de manera natural, se presenta en menor abundancia dentro de las matrices que lo contienen. Muchos de estos procesos de refinación derivan en suplementos enriquecidos en uno o un par de componentes de interés. A su vez, resulta antagónico que una batería de compuestos que fueron generadas para funcionar al unísono sea segmentada.

La complejidad de la interrelación entre los compuestos de cada grupo de metabolitos vegetales alcanza tal profundidad que desafía la clasificación tradicional establecida. Los metabolitos secundarios, por ejemplo, no solo demuestran habilidades reguladoras, sino que también sirven como precursores cruciales para los metabolitos primarios. Este intrincado equilibrio se revela aún más cuando la sobreexpresión de metabolitos primarios en las hojas se convierte en una estrategia efectiva de defensa química contra herbívoros. Este fenómeno de adaptación dinámica transforma a la planta en un combatiente resiliente que evoluciona en sintonía con su entorno desafiante. En contraste con la actual problemática relacionada con la adaptación de patógenos a tratamientos unifactoriales, las plantas, a lo largo de milenios de evolución, han desarrollado una estrategia única para abordar la naturaleza multifactorial de la patogénesis, atacando a los invasores mediante la combinación armoniosa de componentes estructurales y funcionales diversos. De ahí el interés en procesos extractivos que involucren el *pool* de estos analitos en extractos bioactivos que aprovechen la sinergia original contenida en la planta.

USC UNIVERSIDADE

1.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS

El término "bioactivo" se deriva de la palabra griega "*bios*" que significa "vida " y de "*activus*" que significa "energético" o que está lleno de vigor[1]. Los compuestos bioactivos son capaces de modular procesos metabólicos y demuestran propiedades positivas como efecto antioxidante, inhibición de actividades de receptores, inhibición o inducción de enzimas e inducción e inhibición de la expresión génica[2] . Los antioxidantes naturales de origen vegetal son principalmente polifenoles, como estilbenos, antocianinas, flavonoides, lignanos y ácidos fenólicos, además de carotenoides (carotenos y xantofilas), vitaminas C y vitamina E. Estos antioxidantes naturales, en particular carotenoides y polifenoles, poseen una amplia variedad de atributos biológicos, como propiedades antienvejecimiento, antiinflamatorias, antivirales, antimicrobianas y anticancerígenas[3].

1.2.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son una clase de compuestos orgánicos que se encuentran en todas las plantas como metabolitos secundarios, generados a través de rutas bioquímicas como la vía del ácido shikímico y fenilpropanoide, proporcionando fenilpropanoides, o la vía acetato/malonato generando fenólicos simples, o de ambas, produciendo así compuestos fenólicos monoméricos y poliméricos[4]. Los compuestos fenólicos naturales se distinguen según varios sistemas de clasificación, siendo la propuesta por Harbone y Simmonds, (1964) una de las más aceptadas, recopilando una decena de categorías basándose en el número de carbonos contenidos en la molécula (**Tabla 1**)[5].

Tabla 1 Clasificación de los compuestos fenólicos por Harbone y Simmonds, (1964)

Nº	Estructura	Clase	Clasificación*
1	C_6	Fenólicos simples	Clase 1 (C_6)
2	C_6-C_1	Ácidos fenólicos y compuestos relacionados	Clase 2 (C_6-C_n)
3	C_6-C_2	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos	
4	C_6-C_3	Ácidos cinámicos, aldehídos y alcoholes de cinamilo	
5	C_6-C_3	Cumarinas, isocumarinas y cromonas	
6	C_{15}	Chalconas, auronas y dihidrochalconas	Clase 3 (C_6-C_n-C_6)
7	C_{15}	Flavanos	
8	C_{15}	Flavonas	
9	C_{15}	Flavononas	
10	C_{15}	Flavonoles	
11	C_{15}	Antocianidinas	
12	C_{15}	Antocianinas	
13	C_6-C_1-C_6, C_6-C_2-C_6	Benzofenonas, xantonas y estilbenos	
14	C_6, C_{10}, C_{14}	Quinonas	Clase 2 y 3
15	C_{18}	Betacianinas	Sin clasificar
16	C_{30}	Biflavonilos	Dímeros y oligoméricos
17	Lignanos, neolignanos	Dímeros y oligómeros	
18	Ligninas	Polímeros	Fenólicos Poliméricos
19	Taninos	Oligómeros y polímeros	
20	Flobafenos	Polímeros	

*Clasificación propuesta por Tsimogiannis y Oreopoulou, (2019)[6]

USC

Por otra parte, Tsimogiannis y Oreopoulou, (2019) basándose en la propuesta de Harbone y Simmonds, han dividido los compuestos fenólicos en seis grandes grupos separados en dos principales bloques[6]. Por un lado, los tres primeros grupos comprenden los compuestos fenólicos que contienen (1) un único anillo bencénico (clase C_6), (2) un anillo bencénico acoplado a una cadena de carbono que tiene de uno a siete átomos de carbono (clase C_6-C_n) o (3) una estructura mayor derivada de la segunda clase, donde en la cadena de carbono es acoplado otro anillo bencénico (Clase C_6-C_n-C_6). Por otro lado, compuestos fenólicos de mayor complejidad son divididos en (4) dímeros fenólicos y productos oligoméricos, (5) fenólicos poliméricos, y (6) fenólicos híbridos constituidos por fenólicos acoplados a otros compuestos naturales como terpenos y lípidos.

Compuestos Fenólicos simples (C_6)

Son anillos fenólicos sustituidos poco frecuentes en las plantas, aunque grupos como: catecol, hidroquinona, resorcinol y floroglucinol han sido detectados en especies como *Salix spp*.[7], *Rhodiola sacra*[8], *Nuphar lutea*[9] y *Myrtáceas Juss*[10] respectivamente. Así también, microorganismos como microalgas han demostrado ser capaces de generar estas pequeñas pero bioactivas moléculas, como es el caso de especies como *Haematococcus pluvialis*, donde se han detectado por primera vez, en su estado rojo, concentraciones importantes de floroglucinol en el estudio mostrado en el **Capítulo 1.1 Microalgas** subapartado 1.1.2 de este trabajo.

Compuestos fenólicos C6-Cn

La clase C_6-C_n es una de las más omnipresentes, representada por los grupos C_6-C_1, C_6-C_2 y C_6-C_3. Dentro del grupo **C_6-C_1 se encuentran los ácidos fenólicos** derivados del ácido benzoico y del benzaldehído. Los derivados del ácido benzoico más abundantes son: hidroxibenzoico, vaníllico y siríngico; sucediendo de la misma forma para sus derivados aldehídos hidroxibenzaldehído, vanillina y siringaldehído[11]. Los ácidos fenólicos se presentan principalmente en forma ligada y/o adheridos a las paredes celulares de las plantas, así como en todos los grupos de alimentos, con especial intensidad en cereales, legumbres, semillas oleaginosas, frutas, verduras, bebidas a base de hierbas y el vino. A su vez, las capacidades de estos ácidos fenólicos como antioxidantes y agentes reductores son atribuidas a la disminución del riesgo de enfermedades y el bienestar[12].

Las acetofenonas y ácidos fenilacéticos (C_6-C_2)

La clase C_6-C_2 son una familia de compuestos inusuales en la naturaleza, siendo caracterizados por compuestos como 2-hidroxiacetofenona y 2-hidroxifenil ácido acético. Las acetofenonas, compuestos fenólicos derivados de L-fenilalanina, se han detectado en cornos y pétalos de azafrán[13] así como en hojas de clavo (*Syzygium aromaticum*)[14]. Los ácidos fenilacéticos, a su vez muestran un elevado potencial bioactivo, detectado en brotes de *Phaseolus mungo* (frijol negro)[15], y en plantas de importancia agrícola como *Helianthus annuus* (girasol), *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Hordeum vulgare* (cebada) , *N. tabacum* (tabaco), *P. sativum* (guisantes), *Zea mays* (maíz) y *Triticum aestivum* (trigo)[16,17]. También se ha detectado la presencia de estos ácidos fenilacéticos en plantas inferiores como en el alga parda *Undaria pinnatifida*[18] y el alga verde *Enteromorpha compressa*[19].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El grupo C_6-C_3 abarca una gran variedad de familia de compuestos como los ácidos cinámicos, aldehídos y alcoholes de cinamilo, cumarinas, isocumarinas y cromonas. Dentro de esta categoría, los ácidos cinámicos son catalogados como de mayor interés, donde el ácido cafeico y el ácido *p*-cumárico representan más del 75 % del contenido total de los ácidos cinámicos en las frutas. El ácido cafeico se encuentra en el café, el arándano, la uva, la pera, el arándano rojo, la manzana y la naranja. En el caso del ácido cumárico, las principales fuentes son las uvas, las cerezas y las bayas[20].

Fenólicos C6-Cn-C6

Una de las maneras de cómo se nos presentan los compuestos fenólicos es mediante la unión de dos anillos interconectados por diferentes tipos de cadenas carbonadas. Estas estructuras pueden acoplarse de forma lineal como en el caso de las chalconas y dihidrochalconas, o generando una estructura cerrada de pentámero acoplado a uno de los anillos bencénicos como las auronas.

A su vez, estructuras más complejas de configuración C_6-C_3-C_6 pueden crear un puente de C_3 formando un tercer anillo heterocíclico, dando lugar a **los flavonoides** (flavonas, flavononas, flavonoles, antocianidinas y antocianinas). Esta última familia de compuestos es probablemente el grupo de fenólicos más estudiado, con una distribución universal en el reino vegetal. La palabra "flavonoide" se deriva de la palabra latina "*flavus"* o amarillo, debido a que muchos flavonoides presentan un color amarillento. Sin embargo, muchos otros son blancos, rojos, azules o violetas como en el caso de las antocianinas[21]. Estos compuestos muestran un elevado potencial bioactivo, destacándose por su alto poder antioxidante y sus efectos beneficiosos en el tratamiento de diversas enfermedades como: cáncer, Alzheimer y aterosclerosis[22]. Las propiedades antiinflamatorias, antimutagénicas, antioxidantes y anticancerígenas mostradas por estos compuestos, los han posicionado como componentes esenciales en numerosas aplicaciones nutracéuticas, farmacéuticas y cosméticas[23]. En la composición de los flavonoides, se destacan diversas subclases como flavonoles, flavonas y flavanoles, entre las cuales sobresalen compuestos clave como kaempferol, rutina, quercetina, catequina y epicatequina. Asimismo, en otro subgrupo relevante, las antocianinas, encargadas de conferir colores a plantas, flores y frutos, se encuentran principalmente representadas por compuestos como cianidina, delfinidina, malvidina, pelargonidina y peonidina. Todos estos compuestos, aunque parten de una distribución común (C_6-C_3-C_6), poseen diferencias estructurales que les confieren un abanico de actividades variadas, potenciadas por interacciones de compuestos de este mismo grupo como por otros antioxidantes no flavonoides[24].

Dímeros y productos oligoméricos de condensación

La oligomerización de compuestos fenólicos es un fenómeno ubicuo en la naturaleza, con un historial de conocimiento de más de un siglo, documentado en organismos como hongos y algas, desempeñando un papel crucial en la formación de esporacarpo y paredes celulares[25]. Este proceso conduce a la formación de dímeros y derivados oligoméricos mediante el acoplamiento de cadenas fenólicas pertenecientes a las clases C_6-C_n (en particular C_6-C_1 y C_6-C_3) y C_6-C_n-C_6. Entre los compuestos de la clase C_6-C_n, destacan los dímeros del ácido gálico, que dan lugar al ácido elágico, los monolignoles que se convierten en lignanos, las cumarinas que forman biscumarina, y los ácidos cinámicos como el ácido ferúlico, que origina di- y

USC COMPOSTELA

triferúlicos. El ácido elágico, clasificado como un dímero de la forma $(C_6\text{-}C_1)_2$ es un compuesto polifenólico ampliamente presente en bayas como arándanos, moras y fresas; así también como en almendras, uvas, nueces, y sus respectivas bebidas[26]. Este ácido es uno de los compuestos fenólicos más relevantes en vinos y licores envejecidos en barricas, ejerciendo influencia no solo en el color, la astringencia y el amargor de estas bebidas, sino también en su capacidad antioxidante[27]. Es un fitoquímico ampliamente investigado, reconocido por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, neurorestauradoras e inmunomoduladoras [28].

Los lignanos, son dímeros de monolignoles que desempeñan múltiples funciones tanto en la defensa como en el desarrollo de las plantas[28]. En términos dietéticos, estos compuestos son prominentes en la linaza, que se considera una de las fuentes más abundantes de lignanos. Además de la linaza, otras fuentes alimenticias ricas en lignanos incluyen semillas oleaginosas, frutos secos, así como el aceite de oliva y ciertas bebidas como vino, cerveza, té y café[26]. Se ha documentado que los lignanos exhiben propiedades antioxidantes, antihepatotóxicas y antilipídicas peroxidantes, lo que los vuelve atractivos compuestos con propiedades funcionales[25]. Las cumarinas e isocumarinas también presentan dímeros naturales, especialmente las biscumarinas, que han sido ampliamente estudiadas en relación con sus actividades como inhibidores de enzimas[6]. El ácido ferúlico presenta dímeros y oligómeros, los cuales han sido identificados en remolacha azucarera, castañas y salvado de maíz presentando un importante efecto antioxidante en las dietas que lo contienen[29].

En las clases oligoméricas $C_6\text{-}C_n\text{-}C_6$, con un solo carbono intermedio $(C_6\text{-}C_1\text{-}C_6)$, destacan las bis-xantonas $(C_6\text{-}C_1\text{-}C_6)_2$ y los xantonolignoides $(C_6\text{-}C_1\text{-}C_6)\text{-}(C_6\text{-}C_3)$. Por otro lado, los dímeros de la forma $(C_6\text{-}C_2\text{-}C_6)_2$ incluyen estilbenoides, bisantraquinonas y diantronas. Los biflavonoides $(C_6\text{-}C_3\text{-}C_6)_2$ surgen del acoplamiento oxidativo de estructuras flavonoides y suelen tener un grupo carbonilo en C4. Aunque son poco comunes, los biflavonoides muestran actividades farmacológicas interesantes. En cuanto a los dímeros flavonoides fusionados, destacan las procianidinas de tipo A, las teaflavinas, las teanaptoquinonas y los teacitrinos, siendo estos últimos los principales componentes bioactivos del té negro.

Fenólicos poliméricos

Los polímeros fenólicos son una de las familias más amplia y compleja de abordar. Como una interpretación literal, las cadenas fenólicas poliméricas son aquellas estructuras fenólicas producto del metabolismo de las plantas que se acoplan entre sí generando compuestos de múltiples monómeros fenólicos. A su vez, Tsimogiannis y Oreopoulou, (2019), de forma asertiva, definen esta categoría como “fenólicos poliméricos” y no como “polifenoles”, ya que estos poseen una relación directa más no conmutativa. Así, los fenólicos poliméricos engloban a cadenas polifenólicas como las ligninas, no contempladas en la definición estricta de polifenoles. En este contexto, se presenta un análisis separado de la definición de polifenoles, así como los principales compuestos que lo integran.

Polifenoles

Como definición integral del concepto de compuestos fenólicos Haslam y Cai, (1994), otorgan una de las primeras clasificaciones más aceptadas, basándose en los trabajos previos de Edgar Bate-Smith, Tony Swain y Theodore White; conocida como la definición de White-Bate-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Smith-Swain-Haslam (WBSSH) [30]. Así, WBSSH recoge 4 parámetros principales para la definición correcta de polifenoles:

- Moderadamente solubles en agua

- Peso molecular de 500 a 4000 Da

- Con más de 12 grupos hidroxilos fenólicos

- Entre 5 a 7 anillos aromáticos por cada 1000 Da

A su vez, aunque acotada, esta definición se mostraba flexible, abriendo la puerta a otras estructuras fenólicas poliméricas como las ligninas. Así, una nueva propuesta, siendo en la actualidad uno de los pilares principales para la clasificación de estas estructuras polifenólicas, establecida por Stéphane Quideau *et al.*, (2011) y basándose en el trabajo de Haslam, (1998) titulado "Polifenoles prácticos"[31] fundamenta que: "*el término "polifenol" debe emplearse para definir los metabolitos secundarios de las plantas derivados exclusivamente de la(s) vía(s) fenilpropanoide(s) derivada(s) del shikimato y/o de la(s) vía(s) de los policétidos, que presentan más de un anillo fenólico y carecen de cualquier grupo funcional basado en el nitrógeno en su expresión estructural más básica"*[32]. Dentro de esta definición otorgada por Quideau, se establecen 3 clases de polifenoles "verdaderos" comprendidos por las (1) proantocianidinas, (2) los galo y elagitaninos y (3) los florotaninos.

Las proantocianidinas, también conocidas como taninos condensados, constituyen un conjunto de oligómeros y polímeros de polihidroxiflavan-3-ol enlazados mediante enlaces carbono-carbono entre subunidades de flavan-3-ol, que incluyen catequina, epicatequina, galocatequina y epigalocatequina[33]. Englobando los subgrupos: procianidinas, prodelfinidinas y profisetinidinas; las proantocianidinas están presentes en frutas, flores, semillas y cortezas de diversas plantas, como defensa contra factores estresantes bióticos y abióticos. Esta acción protectora, principalmente originada por su característica astringencia, es empleada en la industria alimentaria como aditivo en jugos de frutas, tés, bebidas y también para mejorar la vida útil de varios alimentos[34].

Los galo y elagitaninos, también llamados taninos hidrolizables, son polifenoles complejos que tienen la capacidad de precipitar proteínas e influir en el sabor de los alimentos, especialmente en la astringencia asociada con frutas que contienen altos niveles de estos taninos[35]. A diferencia de los taninos condensados, los taninos hidrolizables pueden ser descompuestos mediante tratamientos ácidos en sus componentes estructurales básicos: ácido gálico en el caso de los galotaninos y ácido elágico en los elagitaninos. Los elagitaninos se encuentran en frutos secos, vinos envejecidos en barrica y algunas bayas, y desempeñan un papel crucial en dietas que los contienen, generando efectos beneficiosos en el microbioma intestinal y mejorando la salud humana mediante la estimulación de la excreción de ácidos grasos de cadena corta y la función inmunitaria intestinal[36].

Los florotaninos son polifenoles formados por la polimerización de unidades de floroglucinol, comúnmente aislados de algas marinas, principalmente de algas pardas, aunque también se encuentran en pequeñas cantidades en algas rojas[37]. Este metabolito secundario en las algas actúa como un disuasivo para herbívoros y en la protección contra la radiación

USC DE COMPOSTELA

ultravioleta[38]. Al igual que otros compuestos fenólicos en las algas, los florotaninos exhiben diversas actividades funcionales, incluyendo propiedades anticancerígenas, antibacterianas, antidiabéticas, antioxidantes, antiinflamatorias e inhibidoras de enzimas[39]. Su actividad antioxidante se ha atribuido a la accesibilidad de los grupos hidroxilo en su estructura química y a la oligomerización de las unidades de floroglucinol.

Dentro de la clasificación de compuestos poliméricos, y más allá de los límites que definen a las cadenas polifenólicas, se encuentra el segundo biopolímero más abundante en la Tierra después de la celulosa: la lignina. La lignina está constituida por varios monómeros fenólicos, tales como el siringilo, el guaiacilo y el alcohol p-hidroxifenílico[40]. Este polímero orgánico es uno de los más abundantes en las plantas y representa la fuente renovable más rica en componentes aromáticos.

Fenólicos híbridos

La última categoría propuesta corresponde a los compuestos híbridos fenólicos, no establecida en la extensa descripción de Harbon y Simmonds, debido a que no comprenden compuestos fenólicos en sí, sino al acoplamiento de otras estructuras naturales como terpenos y lípidos con las cadenas fenólicas. Los terpenoides son compuestos orgánicos que se derivan del isopreno, y están ampliamente distribuidos en la naturaleza. A esta familia de compuestos se atribuyen diversas actividades antibacterianas, antifúngicas e incluso antivirales, que, a su vez, cuando son acoplados a grupos fenólicos, estos les confieren nuevas funcionalidades exhibiendo una amplia gama de actividades biológicas[41]. Los principales compuestos que componen estos híbridos fenólicos son el carvacrol, timol, rosmadial, epirosmanol, carnosol, rosmanol y ácido carnósico.

Por otra parte, los lípidos fenólicos pueden ser considerados como derivados de mono y dihidroxifenoles, específicamente derivados de catecol, resorcinol e hidroquinona[42]. Estos metabolitos secundarios están compuestos por un grupo fenólico principal y una cadena lateral alifática, lo que les confiere propiedades anfipáticas, es decir, presentan características tanto lipofílicas como hidrofílicas. Uno de los lípidos fenólicos más destacados en términos de actividad biológica es la benzoquinona sorgoleona, un componente principal de la raíz del sorgo, que inhibe eficazmente la fotosíntesis en las etapas de germinación de las plantas, mostrando un potencial prometedor como herbicida, convirtiéndose en uno de los aleloquímicos más estudiados[43].

1.2.2. Carotenoides

Los carotenoides, derivados del nombre latino "*Daucus carota*" que designa a la zanahoria, debido a su destacada contribución a la característica coloración naranja de esta raíz, constituyen un grupo diverso de fitoquímicos funcionales. Se componen de más de 850 compuestos conformados por pigmentos orgánicos de color amarillo hasta el rojo. Estas estructuras están definidas por polienos de 3 a 13 dobles enlaces conjugados que determinan el color del pigmento, desde el amarillo pálido (ζ-caroteno con 7 dobles enlaces), pasando por el naranja brillante (β-caroteno con 9 dobles enlaces), hasta el color rojo intenso (cantaxantina con 13 dobles enlaces), así como estructuras de anillos hidroxilados de seis carbonos en uno o ambos extremos de la molécula[44]. Los carotenoides se dividen en dos principales subgrupos: los carotenos hidrocarbonados compuestos únicamente por átomos de carbono e hidrógeno

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

como el β-caroteno y el licopeno. Y las xantofilas, que contienen átomos de oxígeno como la β-criptoxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina, fucoxantina y peridinina. Este último grupo, presenta diversos grupos funcionales: hidroxi-, ceto-, carboxi-, carbometoxi-, epoxi- y lactona; así como derivados esterificados y glucosilados, confiriéndole una amplia gama de estructuras posibles[45].

Estos pigmentos cumplen un papel crucial en las plantas al atraer polinizadores y dispersores de semillas mediante los diversos colores que proporcionan a las hojas, flores y frutos. Además, actúan como protectores contra los procesos fotooxidativos, desempeñandose como eficaces antioxidantes al neutralizar el oxígeno reactivo y los radicales peroxilo. Debido a estas funcionalidades y su lipofilicidad, los carotenoides realizan un importante papel en la protección de las membranas celulares y las lipoproteínas contra el daño oxidativo[46].

Estos pigmentos lipófilos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, presentes en plantas, algas, cianobacterias, peces, aves, levaduras, arqueas, hongos, bacterias y ciertos animales invertebrados. Sin embargo, muchos animales no sintetizan carotenoides *de novo*, por lo que dependen de su ingesta dietética o de la obtención de precursores que luego son transformados mediante reacciones metabólicas. La biosíntesis de carotenoides ha sido estudiada en diversas plantas vasculares y microorganismos, dando origen a las rutas de su producción conocidas como carotenogénesis[47].

La producción biotecnológica de carotenoides viene aumentando debido a factores como la posibilidad de utilizar sustratos de bajo costo, pequeñas áreas requeridas para su bioproducción, no estar sujeta a condiciones ambientales o composición del suelo y control de las condiciones de cultivo. Los carotenoides pueden ser biosintetizados por organismos fotosintéticos, como, por ejemplo, algas y cianobacterias y microorganismos no fotosintéticos como bacterias, hongos y levaduras[48]. Entre las cepas de microalgas unicelulares, *Dunaliella salina* y *Dunalielle bardawil* son las fuentes más comunes para la producción natural de β-caroteno, generando de un 10 a un 13 % de este carotenoide a partir del peso seco de las células; y de manera similar, *Haematococcus pluvialis* es una fuente comercialmente viable de astaxantina natural que representa entre el 80 % y el 99 % del total de sus carotenoides[49].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. ALGAS

2.1. INTRODUCCIÓN

"*Conocemos mejor la superficie de Marte que el fondo del mar*"
Silvia Earle

Definir de manera general el concepto de "alga" se presenta como una tarea tan compleja como controversial. En líneas generales, las algas han sido caracterizadas como organismos con la capacidad de llevar a cabo procesos fotosintéticos generadores de oxígeno, pero sin pertenecer a la categoría de plantas superiores (*Embryophyta*)[50]. Así, esta definición abre la puerta a considerar a las algas como una subclasificación de las plantas. En el caso específico de las algas verdes (*Chlorophyta*) y las algas rojas (*Rhodophyta*), ambas pertenecientes al dominio eucariota, podrían ser consideradas con mayor aceptación dentro del grupo de las plantas[51]. Sin embargo, estructuras como las denominadas algas verdeazuladas, representadas por organismos procariotas conocidos como cianobacterias, y capaces de realizar procesos fotosintéticos, plantean una controversia en cuanto a su clasificación como algas, siendo aún más debatible su inclusión en el reino *Plantae.*

A pesar de los desafíos para alcanzar un consenso en la ficología respecto a la clasificación de las algas, resulta evidente la complejidad de abarcar a todas ellas bajo una única definición. Es paradójico que uno de los organismos vivos más antiguos datados sea también uno de los más arduos de clasificar. Para abordar su diversidad, se han definido como una colección variada y heterogénea de organismos que incluye taxones procariotas y eucariotas no relacionados[52]. Sin embargo, ¿hasta qué punto se puede englobar esta diversidad? Clasificar a este grupo resulta una tarea complicada, difícil o incluso imposible. Esta percepción llevó al botánico Gerald Prescott en 1951 a teorizar que, aunque útil, el término "algas" ha sido aplicado de manera tan amplia a diversos grupos de plantas y ha recibido tantas interpretaciones que carece de un significado preciso[53]. Los estudios moleculares contemporáneos han confirmado que el término "algas" ya no tiene un significado filogenético o taxonómico preciso, ya que estas no pueden ser agrupadas en un único linaje evolutivo descendiente de un ancestro común[54].

En contraste, dentro del grupo de más de cincuenta mil especies denominadas algas[55], se encuentra una ordenación más precisa y estructurada. A grandes rasgos estos organismos son divididos por su coloración como algas rojas (*Rhodophyta*), algas verdes (*Chlorophyta*) y algas pardas (*Phaeophyta*). Así también, suelen clasificarse de forma primaria por su tamaño en dos grandes grupos como lo son macroalgas y microalgas.

2.2. MICROALGAS

Al igual que su clasificación mayor, la definición de microalga ha presentado múltiples cambios. Inicialmente eran definidas como un grupo diverso de organismos unicelulares que comprenden protistas eucariotas y algas verdeazuladas (cianobacterias)[56]. En este contexto, las cianobacterias se agrupaban junto a las microalgas debido a su similitud como organismos unicelulares con capacidad para llevar a cabo procesos fotosintéticos. Además, su característica coloración, resultado de la concentración de clorofilas y xantofilas, le confiere esa tonalidad distintiva, similar a la de sus homólogos eucariotas, siendo denominadas algas verdeazuladas.

No obstante, en la actualidad, las diferencias sustanciales han llevado a una revisión de esta clasificación. Las cianobacterias, al ser organismos procariontes, carentes de núcleo definido y sin la capacidad de generar compuestos complejos como los organismos eucariotas, son catalogados dentro del Reino Monera. En contraparte, sin contar a las cianobacterias, las microalgas son uno de los organismos vivos de mayor biodiversidad.

Las microalgas, con su extenso historial en la corteza terrestre, han desarrollado una notable capacidad de adaptación que supera la de otros muchos organismos vivos. A diferencia de las plantas terrestres, estos microorganismos pueden prosperar sin necesidad de un sustrato donde anclarse, permitiendo su cultivo en entornos acuáticos e incluso en condiciones adversas. En lugares con elevada alcalinidad, salinidad o en tierras consideradas no cultivables, las microalgas no solo pueden ser cultivadas, sino que también tienen la capacidad de transformar su entorno gracias a su eficiencia fotosintética. De este modo, al fijar dióxido de carbono, contribuyen significativamente a la mejora de la calidad de las aguas.

Esta facilidad de cultivo ha abierto la puerta no solo a su utilización como purificadores del ecosistema sino como un super recurso de generación de nutrientes y energía. La biomasa de estos organismos unicelulares es conocida por su capacidad de brindar diversos compuestos bioactivos como lípidos, polisacáridos, carotenoides, vitaminas y ficobiliproteínas. A su vez, aunque se desconocía el límite de su capacidad para desarrollar estructuras complejas, se ha demostrado su potencial como generadores de compuestos polifenólicos. Esto convierte a las microalgas en una fuente de propiedades tanto nutricionales como funcionales derivadas de sus ingredientes bioactivos.

Una de las principales aplicaciones de las microalgas se encuentra en el mercado de los suplementos alimenticios. Microalgas como *Chlorela spp*., *Spirulina spp*. y *Haemaetococcus spp*. han sido altamente explotadas como fuentes de compuestos carotenoides y ácidos grasos esenciales en dietas pobres o carentes de estos compuestos. En el caso de *Spirulina* su aplicación en el mundo alimenticio data de los inicios del siglo XVIII, siendo actualmente utilizada como fortificante en el mercado de jugos, leche y otras bebidas[57].

2.2.1. *Haematococcus pluvialis*

¿*Haematococcus* necesita dormir?
Ana Otero

Haematococcus pluvialis es una microalga verde unicelular de agua dulce de la familia *Haematococcaceae* y perteneciente a la clase *Chlorophyceae*. A su vez, esta microalga es ampliamente conocida e identificada por su intenso y característico color rojo. Esta dualidad colorimétrica es generada por las diferentes fases de cómo se nos presenta la microalga. Partiendo desde un tenue color verde que se intensifica con una mayor concentración de clorofila, evolucionando hacia un tono amarillo rojizo hasta alcanzar un rojo oscuro. Así este cromatismo es un indicador inherente del complejo ciclo de vida de *H. pluvialis,* el cual es resumido de forma general en 3 grandes etapas (**Figura 1**).

La primera etapa o fase flagelada ovalada verde denominada fase vegetativa presenta una estructura lábil, con una pared celular delgada que contiene principalmente clorofila y proteínas. A su vez, en esta etapa se pueden apreciar dos flagelos que les permiten nadar libremente con un solo cloroplasto que contiene pirinoide. En esta etapa la microalga se puede reproducir de

USC DE COMPOSTELA

forma asexual generando de 2 a 32 células hijas[58]. Luego debido a condiciones desfavorables para su crecimiento como estrés lumínico o inanición, la microalga se protege mediante el endurecimiento de su pared celular, así se desprende de sus dos flagelos y adquiere una forma redonda de quiste, pero en un estado inmaduro denominada palmella. En esta fase comienza el proceso de enquistamiento y la producción de compuestos carotenoides, denominado carotenogénesis, otorgándole un color naranja verdoso. Al ser mantenidas las condiciones de estrés la palmella se transforma en aplanosporas asexuales, volviéndose resistente a ambientes extremadamente hostiles. En esta etapa, las células contienen dos estructuras distintas, una vaina trilaminar gruesa y rígida y una pared celular secundaria de material resistente a la acetólisis[59]. Aquí la microalga concentra la mayor cantidad de compuestos carotenoides en su aplanospora pudiendo mantener esta estructura durante largos periodos mientras las condiciones de cultivo no sean las adecuadas para la división celular. Por otra parte, se suele establecer una cuarta etapa, donde al favorecer nuevamente las condiciones de reproducción, la aplanospora o quiste maduro germina formando zoosporas flageladas iniciando nuevamente el ciclo.

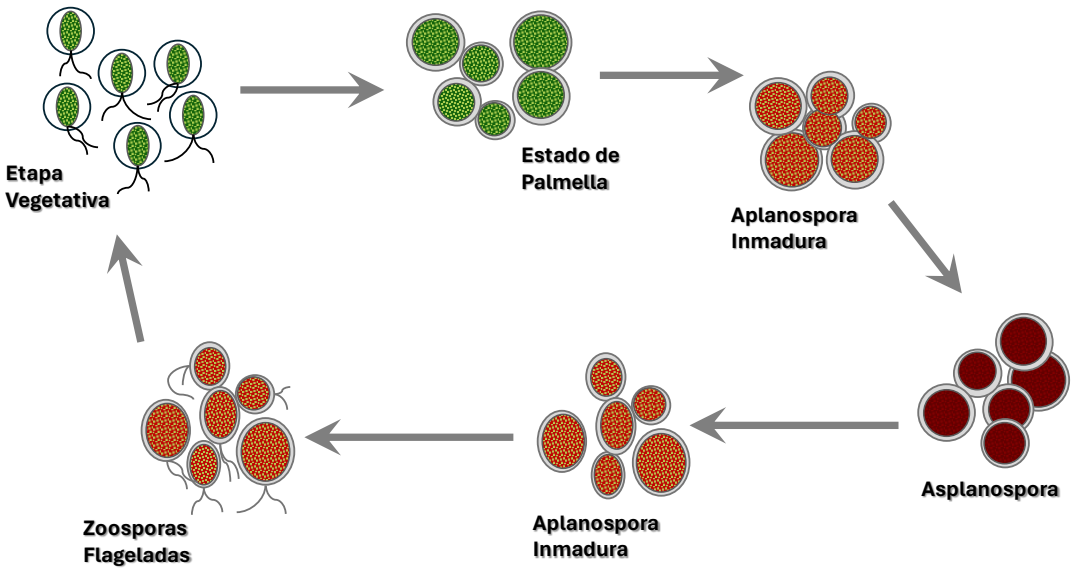


Figura 1 Ciclo celular de la microalga *Haematococcus pluvialis*

Aunque complejo, actualmente se posee una elevada compresión del ciclo de vida de *Haematococcus*, siendo el foco de numerosos trabajos. Una de las principales motivaciones es la capacidad que presenta la microalga como generadora tanto de compuestos lipídicos como principalmente compuestos carotenoides. *H. pluvialis* se muestra como uno de los organismos vivos más eficientes en la producción de astaxantina, pudiendo acumular hasta el 6 % de su masa solo en este compuesto. A su vez, debido a la facilidad de crecimiento de las microalgas, su adaptación a distintos medios y su elevada tasa de reproducción convierten a *H. pluvialis* en una fábrica atractiva de este carotenoide. Así, diversos estudios basan su foco en la optimización de los parámetros de cultivo maximizando la concentración de los compuestos obtenidos en la carotenogénesis. Principalmente modificaciones en la exposición lumínica, diferencias entre luz natural y artificial, el control de los ciclos circadianos y el nivel de irradiación otorgada; son las principales variables modificadas en la inducción hacia la concentración de astaxantina.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Asimismo, otro reto se presenta en la generación de astaxantina a partir de *H. pluvialis*, el cual es su extracción. Debido al estrés brindado para obtener una célula cargada con una concentración óptima de astaxantina, la microalga endurece su pared celular elevando la complejidad de los potenciales procesos disruptivos para la obtención de los compuestos bioactivos de su interior. Esta capa rígida compuesta principalmente de polisacáridos y biopolímeros, representando aproximadamente el 10 % (2,2 µm) del tamaño de la microalga, está comprendida por 3 capas con una elevada resistencia a tratamientos químicos, físicos y enzimáticos[60]. Estas características de su pared celular han colocado a *H. pluvialis* como una de las microalgas más robustas, siendo propuesto un orden relativo basado en la resistencia de la pared celular de la forma: *H. pluvialis* y *Scenedesmus sp*. > *Phaeodactylum tricornutum*, *Arthrospira platensis , Chloromonas nivalis* y *Dunaliella salina* > *Isochrysis galbana*[61]. De esta forma son numerosos los enfoques hacia la ruptura de la microalga, partiendo desde el secado y empleando extracciones cómo fluidos supercríticos, Soxhlet, microondas y ultrasonidos.

De manera irónica, los compuestos carotenoides contenidos en *H. pluvialis* en su forma libre poseen una elevada inestabilidad, así, las técnicas extractivas deben asegurar la ruptura sin degradar los compuestos bioactivos contenidos en ella. Igualmente, *H. pluvialis* presenta otra protección de sus compuestos bioactivos a través de la esterificación. Aunque existente de forma libre, la mayor parte de la astaxantina se encuentra unida a cadenas lipídicas, principalmente a los ácidos grasos palmítico, linoleico, linolénico y oleico. Esta combinación carotenoide y ácido graso eleva la estabilidad de los compuestos carotenoides, que debido a la naturaleza anfipática de las cadenas lipídicas brindan una mejor extracción en contacto con diversos disolventes. Por otro lado, el mercado demanda carotenoides de alta pureza siendo necesario procesos de ruptura de estos ésteres convirtiendo a la astaxantina resultante en un producto de elevado coste.

Este contexto ha impulsado la utilización directa de *H. pluvialis* en forma de pasta húmeda, evitando procesos de disrupción de alto impacto[62], así como refinación, como es abordado en el **Capítulo 1, subsección 1.2.1** de este trabajo. Esto deriva en la aplicación de la microalga de forma global, aprovechando la estabilidad de los carotenoides esterificados y modificando el enfoque de nutracéuticos refinados hacia un entendimiento sinérgico.

2.3. MACROALGAS

Las macroalgas, comúnmente conocidas como algas marinas, aunque también muy presentes en formaciones de agua dulce, son organismos fotosintéticos eucariotas diferenciados de sus parientes más pequeños, las microalgas, principalmente debido a su tamaño macroscópico. Estos organismos poseen estructuras similares a las plantas superiores, compuestos de manera general por una lámina semejante a una hoja denominada fronda, unida a un estipe o filamento delgado que la comunica con el rizoide[63]. El rizoide o punto de sujeción, ancla toda la estructura del alga que puede llegar a medir hasta decenas de metros de longitud. Las macroalgas pertenecen a uno de los tres grupos de algas eucariotas denominados *Rhodophyta* o algas rojas, *Chlorophyta* o algas verdes y *Phaeophycea*e o algas pardas. Estas tres categorías albergan más de 15000 especies, cada una con estructuras, métodos de reproducción y características generales notablemente diversas. Esta variabilidad ha generado

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

un extenso campo de estudio dedicado a comprender a fondo cada grupo, ya que cada uno representa prácticamente un universo único en sí mismo.

2.3.1. Algas verdes

Con un potencial ancestro común, las algas verdes, o por lo menos una división de este grupo, es parte de un linaje que se cree común al de las plantas superiores[64]. Se destaca una subdivisión específica, ya que las algas verdes, comúnmente denominadas *Chlorophyta* según la taxonomía contemporánea, exhiben dos divisiones distintas: clorofitas (*Chlorophyta*) y carofitas (*Charophyta*)[65]. Principalmente la división *Charophyta* con más de 4300 especies, exclusivamente de agua dulce, muestran de forma general una notable diversidad morfológica y reproductiva, poseen cubiertas extracelulares que van desde escamas hasta paredes celulares superiores similares a plantas[66,67]. Por otro lado, la división *Chlorophyta*, muestra más de 4500 especies siendo su mayoría de agua dulce (3500 especies) también incluyendo especies marinas (1500). Pero en general las algas verdes son organismos que se caracterizan por tener clorofilas a y b como principales pigmentos fotosintéticos, almidón ubicado dentro del cloroplasto como principal producto de almacenamiento y flagelos de tipo liso.

Dentro de las macroalgas verdes, especies como: *Ulva sp.*, *Caulerpa sp.*, *Enteromorpha sp.* y *Chaetomorpha sp.;* representan uno de los grupos más estudiados y explotado dentro de su categoría. La *Ulva sp.* o lechuga de mar debido a su apariencia, es una importante fuente de compuestos bioactivos que abarcan polisacáridos, compuestos fenólicos, ácidos grasos, pigmentos, minerales y vitaminas. Todos estos compuestos presentan un elevado potencial funcional que comprenden diferentes actividades como antioxidante, propiedades antiinflamatorias, salud cardiovascular, neuroprotección y mejora de la salud de la piel[68].

La *Caulerpa sp*. es uno de los organismos unicelulares más grandes existentes. Presenta de forma general una estructura ramificada, que en ciertas especies se asemeja a un racimo de uvas, siendo denominada uva de mar o caviar del mar[69]. Dentro de su principal representante, *Caulerpa racemosa*, se han detectado diversos compuestos bioactivos como cadenas polifenólicas, ácidos grasos; así como minerales esenciales y oligoelementos que han revelado su uso potencial como antioxidante, antidiabético, larvicida y antibacteriano[70,71]

Enteromorpha sp., es un alga comestible que se reproduce de manera abundante en las áreas litorales de aguas marinas costeras contaminadas y eutrofizadas. Esta alga destaca por su contenido nutricional, que incluye ácidos grasos poliinsaturados, fibra dietética, vitaminas y minerales. Entre los compuestos bioactivos presentes en *Enteromorpha* se encuentran carotenoides, clorofila, ficocianina, compuestos fenólicos y flavonoides. Estos componentes confieren al alga propiedades antioxidantes, así como beneficiosas actividades anticancerígenas, anticoagulantes y antivirales. *Enteromorpha sp.* emerge como un recurso potencialmente valioso, aprovechando su versatilidad en aplicaciones que abarcan desde la alimentación hasta la salud[72].

Chaetmorpha sp., alga espagueti o pelos rígidos, es una macroalga caracterizada por filamentos pesados no ramificados que incluye una amplia diversidad de especies con un alto contenido de compuestos bioactivos. Fitoquímicos liderados por compuestos fenólicos, flavonoides y taninos, le confieren un elevado potencial antioxidante frente al estrés oxidativo[73,74].

USC DE COMPOSTELA

2.3.2. Algas rojas

Las rodofitas, comúnmente conocidas como algas rojas, mayormente se encuentran en ambientes marinos, siendo menos de 200 de las más de 6500 especies las pertenecientes a hábitats de agua dulce. La evidencia fósil indica que las rodofitas son uno de los linajes multicelulares fundadores y grupos antiguos de eucariotas fotoautótrofos (*Archaeplastida*)[75]. Estas algas se distinguen por sus cloroplastos sin retículo endoplasmático externo, tilacoides no apilados, ausencia de flagelos en todas las etapas de su ciclo de vida, y la presencia de pigmentos ficobiliproteicos que les confieren su característico color rojo, de donde derivan su nombre[76]. El principal compuesto que le otorga el llamativo color rojo es la ficoeritrina, un complejo coloreado de la familia de las ficobiliproteínas de color rojo intenso. Este compuesto se estudia ampliamente por sus aplicaciones como colorante alimentario natural, agente antihiperglucémico, etiqueta fluorescente y antioxidante, además de su función como proteína captadora de luz[77]. Algunas especies como *Porphyra sp.* y *Palmaria palmata* son conocidas por sus aplicaciones culinarias como las características láminas nori en la preparación de rollos de sushi, o como una alternativa saludable al consumo de carne. *Porphyra sp.* (nori) se cultiva ampliamente como un importante recurso marino debido a su capacidad de almacenar proteínas (un 40 % en contenido seco, siendo superior a la soja), fibras dietéticas, ácidos grasos poliinsaturados, minerales y vitaminas. A su vez, *Porphyra sp.* es capaz de generar altas concentraciones de vitamina B12, carente en fuentes alimenticias de origen vegetal[78]. *Palmaria palmata*, conocida como dulce, es una macroalga roja ampliamente distribuida a lo largo de las costas del Atlántico. Su característico color rojo y su forma de lóbulo aplanado le han valido el apodo de "tocino del mar", utilizándose en aplicaciones alimentarias desde hace varios siglos[79,80]. Así mismo, ha demostrado ser una prometedora fuente de compuestos antioxidantes, presentando en extractos alcohólicos la capacidad de estabilizar radicales libres durante períodos prolongados. Esto la convierte en un potencial conservante natural que aporta propiedades funcionales a los alimentos[81].

A su vez, otro campo de especial interés donde son atractivas las algas rojas es en la industria cosmética. La gran capacidad de adaptación de estas algas a cambios en los diferentes tipos de radiación UV, ha generado el estudio de su funcionamiento protector y su posterior aplicación a productos cosméticos bloqueadores de rayos UV. A su vez, el mar Adriático, una de las zonas geográficas con mayor incidencia de radiación solar, alberga un vasto número de especímenes de algas rojas. Estas algas deben generar elevados mecanismos de protección ante estas condiciones inclementes que les aportan un mayor valor fotoprotector. Así, algas como *Ellisolandia elongata*, una de las más usuales en las costas adriáticas se muestra como un potencial ingrediente en aplicaciones cosméticas[82]. Esta macroalga no solo presenta una elevada tolerancia a grandes fuentes de radiación, sino que posee mayor adaptación a la acidificación de los océanos que otras algas coralinas cuya distribución se limita a ambientes más estables[83].

Ellisolandia elongata, es un alga coralina (de ahí su nombre original *Coralina elongata*) articulada, con una base crustosa y láminas flexibles divididas en unidades individuales bajo un eje central de frondas pinnadas (5–7 mm)[84]. Está compuesta de articulaciones flexibles no calcificadas (genícula) que conectan segmentos calcificados. *E. elongata* se distribuye desde el sur de España hasta Grecia y desde el Líbano hasta Argelia, sobre sustratos rocosos duros de hasta 5 m de profundidad[85]. *Ellisolandia elongata* forma hábitats intermareales visibles, conocidos como "corniches", en paredes verticales naturales expuestas a fuertes corrientes y

USC DE COMPOSTELA

olas. Sin embargo, esta especie también se encuentra en otros entornos como pozas de marea y rompeolas. Su capacidad de adaptación se debe a su alta tolerancia a las fluctuaciones de salinidad, temperatura y acidez. Esta adaptabilidad está respaldada por la morfología y la plasticidad de sus frondas, lo que hace que *Ellisolandia elongata* sea flexible y resistente al hidrodinamismo[86]. Extractos de esta macroalga han mostrado su potencial como inhibidor de hongos como *Bipolaris sorokiniana*, causante de manchas y plagas en las hojas de pastos, cultivos de cereales y maíz[87]. A su vez, su mecanismo de acción no solo se basa en propiedades antifúngicas sino también como un activador de las respuestas de defensa de las plantas.

El contenido en compuestos fenólicos por parte de *E. elongata* ha sido escasamente abordado, informando de forma general solo su composición global más no su caracterización individual. Se han determinado concentraciones de fenólicos simples, flavonoides y taninos en extractos de esta macroalga de 0,37; 0,12 y 13,33 mg/g respectivamente[88]. A su vez, la complejidad denominativa en el mundo de la ficología, donde *E. elongata* ha sido nombrada como *Corallina mediterránea*, *Corallina elongata, Corallina deshayesii* y *Corallina officinalis*, vuelve complejo concentrar en un solo identificador común el banco de datos de compuestos bioactivos, funcionalidades, distribución y aplicaciones de esta alga.

2.3.3. Algas pardas

Las algas pardas (*Phaeophyta*) reconocidas como algas vigorosas, incluyen a todo el grupo de algas gigantes, así también incorporan algas de menor tamaño, pero igualmente de gran resistencia[51]. Estas algas se caracterizan por estar compuestas por cuatro membranas que rodean el cloroplasto, dispuestas en tilacoides apilados en grupos de tres. Sus componentes principales son los polisacáridos alginato y laminarina, que conforman la estructura de la pared celular y sirven como reserva fotosintética, respectivamente[64,89]. Su denominación como algas pardas proviene de la coloración brindada por el carotenoide fucoxantina que se sobrepone a las tonalidades verdosas generadas por la clorofila. Así también algunas especies muestran esta coloración no solo por albergar elevadas cantidades de fucoxantina, sino también de varios taninos[90]. La variabilidad en la concentración de carotenoides y compuestos fenólicos en el grupo de algas pardas está influenciada por una serie de factores, siendo la especie uno de los principales determinantes. A su vez, se ha establecido una relación significativa entre la presencia de estos compuestos bioactivos y las condiciones ambientales, tanto meteorológicas como de cultivo, a las que estas resilientes algas están expuestas. Cambios en la salinidad, niveles elevados de radiación solar y condiciones climáticas adversas en los cuerpos de agua inducen la liberación de fitoquímicos por parte de estos macroorganismos, actuando como un mecanismo de protección. Como se ha mencionado anteriormente, el mar Adriático se destaca por presentar una elevada irradiación solar, veranos cálidos y secos, inviernos suaves y húmedos, y es conocido como un punto crítico en términos de múltiples amenazas climáticas y una alta vulnerabilidad al cambio climático global en curso. Además, exhibe un gradiente de salinidad debido al intercambio de masas de agua con el mar Jónico, que es más cálido y salado, así como una mayor densidad del agua durante los meses invernales debido a los fuertes vientos, y una disminución de la salinidad hacia el norte debido al contacto con múltiples ríos[91].

USC DE COMPOSTELA

Diversos análisis han revelado una correlación directa entre el aumento de la radiación solar y el incremento de compuestos bioactivos en macroalgas, especialmente polifenoles[92].

Especímenes pertenecientes al género *Sargassum* han demostrado un aumento significativo en la producción de cadenas fenólicas en respuesta a mayores temperaturas del agua, junto con una capacidad mejorada para la eliminación de radicales libres [93,94]. Dentro de las numerosas especies de la clase *Sargassum*, destaca una en particular, endémica en la región del mar Mediterráneo: *Sargassum hornschuchii*, nombrada en honor al botánico alemán Christian Friedrich Hornschuch [95]. Esta macroalga suele habitar en la zona sublitoral, a profundidades que oscilan entre los 30 y 60 metros [96].

En comparación con otras macroalgas como *Ulva linza* (algas verdes) y *Gelidium crinale* (algas rojas), los extractos de *S. hornschuchii* han revelado una mayor concentración de carotenoides y compuestos fenólicos en general. Esto confiere a la especie una capacidad antioxidante y anticoagulante superior en relación con las mencionadas[97]. Además, estudios adicionales han demostrado que los extractos de alcaloides derivados de *S. hornchuchii* actúan como inhibidores del crecimiento de *S. aureus* y exhiben efectos bactericidas contra patógenos resistentes a múltiples fármacos, como diversas cepas de *E. coli* y *S. aureus* [98].

A su vez, entre las especies que forman parte del grupo de algas pardas, que se caracterizan por su notable capacidad de adaptación y su presencia preeminente en diversas áreas del mar Adriático, se destacan las macroalgas *Dictyota dichotoma*, *Gongolaria barbata* y *Ericaria amentácea*. *D. dichotoma* destaca como una de las especies más estudiadas dentro del género *Dictyota*, gracias a sus notables habilidades de regeneración estructural inducida por daños graves, proporción de bioactivos versátiles, particularmente diterpenos, así como por su fotomorfogénesis[99]. Así, este desarrollo morfológico inducido por la luz le permite a *D. dichotoma* asegurar de manera efectiva su supervivencia en un entorno fotodinámico[100]. De la misma forma, fitoquímicos involucrados en estos procesos de adaptación podrían estar implicados en las propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antidiabéticas; que han demostrado extractos de esta alga parda[101].

Gongolaria barbata, como *Ericacaria amantacea*, pertenecían originalmente al orden taxonómico del género *Cyostera*, denominándose *Cyostea barbata* y *Cyostera amantecea*. Nuevas investigaciones ficológicas colocan a *Cyostera barbata* dentro del grupo de *Gongolaria* y *Cyostera amantecea* dentro de *Ericaria*. A su vez, al igual que *Sargassum hornschuchii*, *G. barbata* y *E. amantecea* son pertenecientes de la familia *Sargassaceae*.

Gongolaria barbata o "barbuda" del latín, debido a su apariencia filamentosa y ramificada, es una macroalga que habita principalmente en la parte norte del mar Adriático. Esta zona es caracterizada por poseer temperaturas extremas de verano e invierno, lo que le requiere a la macroalga una elevada capacidad de adaptación[102]. *C. barbata* es una importante fuente de ácidos grasos de las familias omega 3, 6 y 9; donde el ácido palmítico es su compuesto principal. De la misma forma, compuestos bioactivos como carotenoides característicos de las algas pardas, polisacáridos y conjugados polifenólicos dan potencial respuesta a sus actividades antioxidantes, antivirales, antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatorias y antitumorales[101,103].

Ericaria amentacea, del latín amentácea o "que tiene amentos" haciendo referencia a sus talos ramificados en forma de espiga. Esta macroalga parda coriácea habita principalmente en la franja infralitoral del mar Adriático. Las algas marinas que viven en la franja infralitoral, especialmente del conjunto de mares que integran el mar mediterráneo, caracterizados por escasas mareas, donde el nivel del agua del mar varía como resultado de los cambios en la

USC DE COMPOSTELA

presión barométrica y la exposición local a las olas. Estas condiciones imponen un estrés ambiental más severo, como desecación parcial y una mayor irradiación solar, en comparación con las algas que habitan en la zona intermareal, que permanecen constantemente sumergidas.

Para hacer frente a estas condiciones estresantes, *E. amentacea* produce compuestos químicos como los florotaninos [104]. Además, esta especie se destaca entre numerosas algas pardas por su capacidad para sintetizar tetrapreniltoluquinonas[105], derivados de terpenilquinonas/hidroquinonas, que conforman una familia de metabolitos secundarios con funciones relevantes en el metabolismo oxidativo, incluyendo la cadena de transporte de electrones y la fotosíntesis, y que poseen diversas propiedades farmacológicas [106].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. EXTRACTOS BIOACTIVOS DE SUBPRODUCTOS AGROALIMENTARIOS

3.1. INTRODUCCIÓN

¿Aprender de la historia, de la naturaleza o de ambas?
Pierre Desrochers

La concepción de subproducto antagónica a la de un simple residuo, y su entendimiento como un elemento reintroducible en la cadena de valor de generación de productos, no es un concepto nuevo y posiblemente tampoco nuestro. Gran parte de los procesos actuales de reutilización de subproductos se basan en lo que hoy se denomina "Biomímesis". Esta biomímesis se propone como el estudio de las formas, los procesos y los ecosistemas de la naturaleza, como inspiración en el diseño de soluciones productivas eficientes[107]. Pero este concepto, esta capacidad de inspiración del humano con la naturaleza que lo rodea, la cual no concibe el concepto de residuo, y su aplicación a su entorno cotidiano, no es una reflexión nueva. Ya en la segunda mitad del siglo XIX se comprendía bien el uso de la naturaleza como modelo para la creatividad en el cierre de ciclos[108]. La idea de establecer paralelismos entre la naturaleza y la industria, especialmente en términos de recuperación de residuos, se remonta al final de la revolución industrial. En 1851, el químico escocés Lyon Plafair, en un ensayo sobre los principios químicos en la industria manufacturera, hacía referencia a este concepto al afirmar:

"Los hombres modernos observan e investigan los fenómenos y las propiedades de cada cuerpo, con el fin de averiguar hasta qué punto puede ponerse al servicio de sus deseos. En estas investigaciones la Química ofrece una ayuda vital: ella, como una trabajadora prudente, economiza cada desecho. Esta economía de la química es sólo una imitación de lo que observamos en la química de la naturaleza."

Además, no solo en lo que hoy se reconoce como industria, sino también en las actividades productivas llevadas a cabo por el ser humano, encontramos evidencias prehistóricas de prácticas de reciclaje. Se han hallado muestras datadas hace 400.000 años de herramientas de pedernal rotas o desechadas que fueron "recicladas" para crear utensilios más pequeños y afilados con funciones específicas [109]. Esta realidad plantea la duda de Pierre Desrochers: ¿debemos aprender de la historia, de la naturaleza o de ambas?[108]. Lo que sí queda evidente es que no hay mejor residuo que el que no se genera, y que los procesos actuales deben orientarse hacia sistemas que sean capaces de cerrar sus ciclos productivos de manera eficiente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2. BAGAZO DE UVA

Tras los procesos de vinificación, el principal subproducto generado por la separación del mosto, o fermentado, de las pieles, semillas, tallos y cualquier residuo sólido de las uvas, se denomina bagazo de uva. Este bagazo representa entre 10 a 30 % de la masa total de las uvas procesadas, obteniendo en promedio 1 kg de subproducto por cada 6 L de vino. Por otro lado, las características del bagazo generado estarán supeditadas a la variedad de uva utilizada, el tipo de prensado, el producto final deseado o el tipo de vinificación. El proceso general de elaboración de vino hasta la generación del bagazo atraviesa dos etapas principales: el despalillado donde son eliminados los raspones y elementos de gran tamaño remanentes de la cosecha como hojas y ramas de la viña, y el prensado donde es fragmentada la estructura de la uva para así liberar su mosto. En este punto se genera uno de los más importantes efectos en la estructura final que presentará el bagazo. En el caso de la vinificación en blanco este proceso de prensado es combinado con una etapa de separación del mosto de los hollejos y las semillas de la uva. Esto genera un vino de color tenue, que deja un elevado contenido bioactivo remanente no extraído del bagazo. En contraste, en la vinificación en tinto, el mosto se fermenta junto con el bagazo, lo que contribuye a su intensa coloración, así como a una mayor retención de compuestos funcionales en el vino. Así, el bagazo remanente en ambos casos se destina, de forma general, a la producción de alcohol vínico mediante su destilación. Como alternativa a esta práctica convencional, este subproducto está siendo ampliamente investigado debido a su gran cantidad de compuestos funcionales con aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica [110].

3.2.1.Compuestos bioactivos en el bagazo de uva

El bagazo de uva se caracteriza por un alto contenido de agua (55-75 %), que varía según las condiciones de prensado. Su composición química incluye fibra dietética como componente principal (43-75 %), proteínas (6-15 %), azúcares, lípidos y una amplia diversidad de compuestos fenólicos[111]. Se ha informado que aproximadamente el 70 % del contenido fenólico se conserva en el bagazo de la uva después del procesamiento[112], albergando las cáscaras un contenido 15 % mayor que la pulpa[113], manteniendo una mejor retención el caso de vinificación en blanco, mientras que la fermentación y temperaturas propias de la vinificación en tinto disminuyen esta retención[114]. Por otro lado, la capacidad del bagazo por retener esta familia de compuestos ha generado el interés de su utilización como fuente de actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antifúngicas y antibacterianas[114–117].

En este sentido, el foco principal del reaprovechamiento del bagazo de la uva como fuente de compuestos funcionales se ha visto circunscrito a la extracción y aislamiento de compuestos fenólicos mediante técnicas de alto impacto y compleja escalabilidad, obteniendo analitos específicos como el resveratrol para su uso en suplementos. En contraparte, este subproducto de vinificación presenta un abanico de compuestos de acción sinérgica, con cadenas polifenólicas que muestran funcionalidades superiores a un único estilbenoide. Además, contiene ácidos grasos esenciales, principalmente presentes en las semillas del bagazo, destacando la serie omega-6 por sus efectos regulatorios en el metabolismo de las lipoproteínas humanas[118].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Compuestos Fenólicos contenidos en el bagazo de uva

El bagazo de *Vitis vinifera* destaca por su elevado contenido de compuestos fenólicos (**Figura 2**). Entre los componentes fenólicos predominantes en el bagazo de uva se encuentran las antocianinas, los flavanoles y los estilbenos. Específicamente en el caso de las uvas tintas, las antocianinas son la principal cadena fenólica representativa, presentes en la piel de la uva como: 3-O-glucósidos de malvidina, petunidina, cianidina, peonidina y delfinidina[119]. Por otra parte, el bagazo de uva blanca se caracteriza por una elevada concentración de ácidos fenólicos, flavan-3-oles y sus galatos y flavonoles y sus glucósidos. En particular, compuestos como catequina, epicatequina, procianidinas, quercetinas y kaempferol; así como el conjunto de sus derivados, corresponden a los principales compuestos en este bagazo de uva blanca[117].

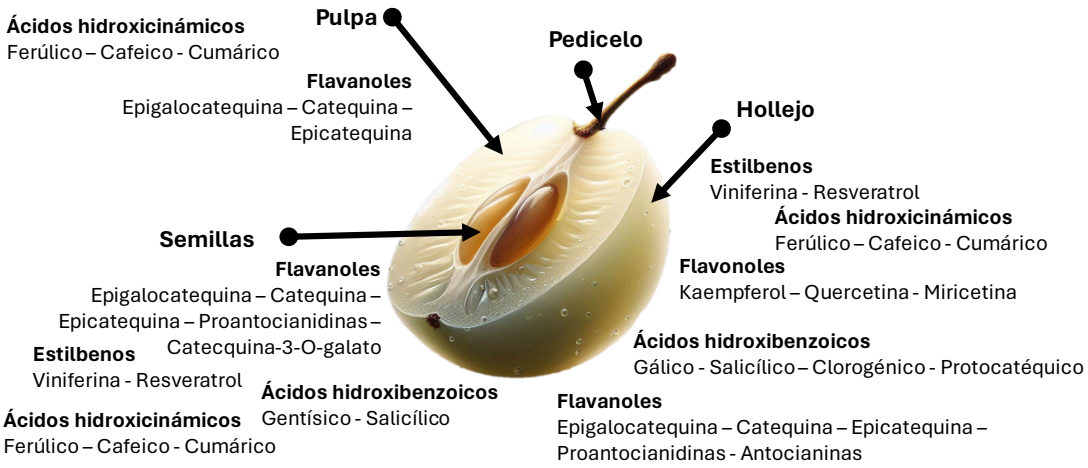


Figura 2 Distribución de los principales compuestos fenólicos en la uva de *Vitis vinifera*

En el bagazo blanco de *Vitis vinifera* se encuentran diversos compuestos fenólicos, entre los cuales se destacan el ácido gálico, el ácido caftárico, el ácido protocatéquico, las procianidinas, así como las catequinas y las quercetinas con sus derivados glucosilados[120]. Además, dentro de la clasificación de compuestos polifenólicos establecida por Quideau *et al.* (2011), y previamente abordada en la sección **1.2.1 Compuestos Fenólicos** de este trabajo, el bagazo blanco de *Vitis vinifera* es rico en proantocianidinas. Así, en los siguiente apartado se procederá a un análisis detallado de esta categoría.

Proantocianidinas

Los taninos condensados son la familia polifenólica hidrosoluble más abundante en las bayas de la vid. Estas se encuentran principalmente en la envoltura de las células hipodérmicas de la piel de la uva donde se presentan las cadenas de proantocianidinas de mayor tamaño. También se distribuyen a lo largo del tejido blando que cubre a las semillas, dentro de las vacuolas o unidas a cadenas de monosacáridos en la pared celular. Las proantocianidinas son las principales responsables de las propiedades organolépticas de la piel de la uva como de su amargor y astringencia[121]. Las semillas de uva contienen entre el 60 % del total de polifenoles de la uva y entre el 50 % y el 70 % de las procianidinas, que en gran medida permanecen en las semillas incluso después de exprimirlas[122].

USC UNIVERSIDADE

En el bagazo de uva blanca de *Vitis vinifera* se han identificado una extensa variedad de monómeros, dímeros y oligómeros que comprenden las proantocianidinas. Principalmente oligómeros de procianidinas y catequinas han mostrado valores superiores al 90 % del contenido polifenólico total del bagazo de uva blanca. A su vez, se observa mayores concentraciones de procianidinas no galoiladas que sus formas galoiladas, y una mayor concentración de dímeros B1, B2 y B3 con respecto a las también detectadas A y C[121]. Dentro del grupo de catequinas, la catequina y epicatequina son las predominantes, siendo las semillas de las uvas uno de los recursos industriales más importantes en la obtención de estos compuestos debido a su relativa abundancia y bajo costo de extracción[123].

Las proantocianidinas contenidas en el bagazo son de especial interés por su relación con potenciales efectos beneficiosos para la salud, incluyendo propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas, anticancerígenas, inmunoestimulantes, antivirales y cardioprotectoras. Ofrecen mayor protección contra el daño del estrés oxidativo que las vitaminas C, E y β-caroteno [124,125]. Han demostrado actividad antimicrobiana contra *E. coli, P. aeruginosa, Micrococcus luteus, S. aureus, Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*[126]. Se han asociado con efectos hipolipidémicos y antihipertensivos como potenciales vasodilatadores. Mejoran la secreción de insulina con efectos antihiperglucémicos, facilitando el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones [127]. Así también, contribuyen a la ecología microbiana y modulan la microbiota intestinal, siendo prometedoras para su uso como nutracéuticos[128].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. TÉCNICAS EXTRACTIVAS

4.1. DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA (MSPD)

La Dispersión de Matriz en Fase Sólida (o por sus siglas en inglés MSPD - *Matrix Solid-Phase Dispersion*), es una técnica de preparación de muestra propuesta por Barker *et al* en 1988, como una nueva alternativa a la clásica técnica de extracción en fase sólida o SPE (por sus siglas en inglés *Solid Phase Extraction*)[129]. Esta metodología surge como respuesta a las limitaciones operacionales presentadas por la SPE en la extracción de tejidos. En este tipo de muestras, previo a su introducción en columnas de SPE, son requeridos procesos de homogeneización y remoción de restos de residuos celulares. Así también, y de forma general, son necesarias etapas de eliminación de proteínas y lípidos. Estos pretratamientos son realizados con el fin de evitar el taponamiento de la columna y la sobrecarga en la fase polimérica. A su vez, estos métodos de preparación previa demandan la granulación de la muestra antes de la extracción, introduciendo un paso adicional de manipulación, aunado a las etapas posteriores de refinado, generando potenciales mermas.

De esta forma, en lugar de granular la muestra o precipitar las proteínas, la MSPD propone la mezcla de la matriz con un soporte similar a los materiales de empaquetamiento de columnas SPE y HPLC, como compuestos de polímero octadecilsilano unido a perlas de sílice (C_{18}). Este enfoque elimina la necesidad de centrifugar, precipitar las proteínas o ajustar el pH de una muestra antes de añadirla a una columna SPE. De la misma forma, los enfoques existentes previos al desarrollo de la MSPD aplicaban detergentes tensioactivos, como el dodecil sulfato sódico, que permitía con éxito acceder a los componentes celulares internos mediante la disolución de las membranas que los contienen. En contraste, este proceso, aunque efectivo, presentaba la necesidad de un postratamiento de la muestra, eliminando la presencia de dicho detergente para el correcto aislamiento de los compuestos de interés. De esta forma, "*añadiendo tejidos enteros (0.5g) al empaquetado C_{18} (2.0g) en un mortero de porcelana y moliendo suavemente el material durante 30 segundos, se obtiene una mezcla casi homogénea de tejido de membranas celulares "disueltas" en el material de empaquetamiento en fase salina*"[129]. Así se obtiene un material semiseco que puede ser introducido en una columna.

La evolución de la MSPD, marcada por los diversos avances de Barker[129–134] y las subsiguientes adaptaciones de la técnica a diversas matrices, condujo a la formulación de una definición general de esta. Así, la MSPD se muestra como una técnica de preparación y extracción directa de muestras semisólidas, sólidas y viscosas presentada por Steven Andrew Barker, Austin R. Long y Charles R. Short en 1989[134]. A pesar de que el trabajo de 1989, titulado *"Isolation of Drug Residues from Tissues by Solid Phase Dispersion*", ha sido ampliamente aceptado como el pionero en la aplicación de la MSPD, la revisión de la bibliografía contenida en este muestra de forma antagónica que esta publicación no enmarca la primera aparición de la técnica. Asimismo, su definición como MSPD y no como una adaptación de la SPE surge en un trabajo posterior.

La MSPD hizo su primera aparición durante el Sexto Simposio Bienal de la Academia Americana de Farmacología Veterinaria y Terapéutica (AAPVT) celebrado del 13 al 16 de junio de 1988, en Blacksburg, Virginia. En este evento, se presentó el trabajo titulado "*A New Approach to Tissue Residue Analyses*",[129] que formula por primera vez todo el proceso

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

involucrado para el desarrollo de la técnica MSPD. Además, en este trabajo se incluyó la primera representación gráfica descriptiva de la metodología (**Figura 3**).

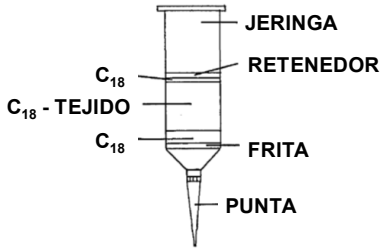


Figura 3 Diseño basado en la primera representación gráfica de la técnica extractiva Dispersión de Matriz en Fase Sólida (MSPD), realizada por Baker *et al.* (1988)

Igualmente, la posible confusión en la atribución de la primera aplicación de la MSPD al destacado trabajo realizado por Barker *et al.* en 1989 sobre el aislamiento de residuos de drogas en tejidos, se puede deber a que este último fue el primer artículo de revista que presentó lo ejemplificado un año antes en el AAPVT. En contraste, este reconocido artículo mantiene la MSPD como una modificación de la SPE, siendo acuñado posteriormente el término MSPD en el trabajo titulado "*Multiresidue Method for Isolation and Liquid Chromatographic Determination of Seven Benzimidazole Anthelmintics in Milk*" donde se presenta "un nuevo examen de esta metodología, que hemos denominado dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), para el aislamiento y la determinación por cromatografía líquida de benzimidazoles en la leche"[133].

La MSPD, inicialmente concebida para la extracción de matrices que involucraban diversos tejidos y muestras de leche, ha experimentado una notable diversificación que la ha llevado a ser extensamente aplicada en muestras alimentarias, varios tipos de plantas, algas, así como en el análisis de cosméticos y productos de cuidado personal. Las principales mejoras implementadas en esta metodología incluyen la introducción de diversos medios dispersantes como óxido de silicio, sulfatos, tierra de diatomeas, entre otros. Además, se han incorporado medios filtrantes diferentes a la frita presentada por Barker (ver Figura 1), como lana de vidrio, filtros de PTFE y diversos materiales porosos.

En la misma línea, se han diseñado diferentes tipos de cartuchos de tamaños variables para modificar la geometría en busca de mayores o menores volúmenes de extracción, dando lugar a la µ-MSPD[133]. Así, la MSPD ha presentado diversas facilidades posteriores a su invención, principalmente por el abanico de parámetros que se pueden modificar en pro de generar extractos con un mayor contenido de los analitos de interés.

Entre otros de los parámetros modificados en la MSPD, se encuentra el aumento del tiempo de residencia de los disolventes mediante la regulación de la extracción a través de válvulas en la salida del cartucho. Así, se han empleado una gran variedad de disolventes como sus mezclas hidroorgánicas. Se ha investigado el efecto generado por la modificación en los volúmenes de masa y dispersante, el tamaño de las partículas, así como los tiempos de molienda y macerado. En consecuencia, la MSPD se presenta como una técnica altamente versátil que se ha adaptado a las diversas muestras y necesidades emergentes a lo largo de los procesos extractivos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2. EXTRACCIÓN A ESCALA MEDIANA Y A TEMPERATURA AMBIENTE (MSAT)

La técnica de extracción a escala mediana y a temperatura ambiente (o por su denominación en inglés *Medium Scale Ambient Temperature* - MSAT) se presenta como un método escalable y sencillo, que incorpora condiciones estándar de temperatura y presión, para la obtención de extractos bioactivos a partir de diversas matrices orgánicas. Este enfoque se inspira en los procesos dispersivos y extractivos propuestos por Barker *et al.,* (1988), dando origen a un proceso patentado, que muestra una elevada escalabilidad hacia procesos extractivos industriales con cantidades superiores a los 20 kg.

La primera aplicación de esta técnica se refleja en la patente "Extracto polifenólico a partir de residuos de uva blanca" propuesta por Lores *et al.,* (2012)[135]. De esta forma, es mostrada la MSAT como un proceso sencillo de pocas etapas para la obtención de extractos con propiedades antioxidantes y antibacterianas a partir de residuos de uva blanca. Además, la MSAT se distingue por la aplicación de materiales no contaminantes, condiciones suaves de proceso y la eliminación integrada de los sólidos en suspensión en los eluatos obtenidos. Este enfoque integral permite la producción de extractos enriquecidos con polifenoles bioactivos de manera viable a nivel industrial. Por lo tanto, la MSAT emerge como una técnica extractiva de gran interés, especialmente en los sectores cosmético, farmacéutico y alimentario.

4.2.1.Procedimiento experimental

El proceso de obtención de extractos bioactivos mediante MSAT se divide en 5 etapas principales:

Molienda: Para la correcta disrupción y extracción de los compuestos bioactivos contenidos dentro de las membranas celulares de las diferentes matrices orgánicas, es necesario el aseguramiento de un tamaño de partícula inferior a como se nos presenta la matriz original. A su vez, el tamaño óptimo producido por la molienda se encuentra supeditado a la naturaleza de la muestra a triturar. Así, este parámetro se muestra como un claro candidato a modificar en los procesos de optimización operacionales como de calidad del proceso extractivo. De esta manera, enmarcado en el ámbito operacional, el tamaño de partícula de la matriz tiene que proveer un volumen manejable en los pasos siguientes. De la misma forma, en cuanto a la mejora del contenido bioactivo, dicha granulometría debe ser suficiente para en pasos posteriores generar una correcta disrupción, así como de permitir en los procesos extractivos eluir el extracto sin provocar obturación o caminos preferentes.

Disrupción: La etapa disruptiva implica el uso de medios abrasivos como el óxido de silicio, que se combina con la matriz orgánica y se procesa en elementos de molienda como morteros o tambores rotatorios. Dentro de los principales parámetros que impactan sobre la etapa disruptiva se encuentran el tamaño del elemento disruptivo, así como el tiempo de disrupción.

Empaquetado: El proceso extractivo se lleva a cabo en columnas compuestas por un medio poroso en su base, sobre el cual se deposita una película del dispersante utilizado en los procesos disruptivos. Es crucial que el tamaño de esta película sea suficiente para cubrir toda el área del filtro, garantizando así un prefiltrado que prevenga el taponamiento del medio poroso. Posteriormente, se introduce la mezcla matriz y dispersante de manera secuencial,

USC COMPOSTELA

asegurando una distribución homogénea que evite la compactación y la formación de espacios de luz. Finalmente, se completa el empaque con otra película de dispersante en la parte superior, que actúa como irrigador durante la aplicación del disolvente extractivo.

Macerado: Para la elución del extracto se introduce el disolvente fresco por la parte superior de la columna extractiva, manteniendo un caudal constante que mantenga una columna de líquido fija sobre la última capa del empaque. Cuando es permeada toda la configuración dentro de la columna, se procede a su extracción, o de manera alterativa, se cierra la válvula de descarga inferior para la maceración del extracto. Así, otro parámetro crucial en la concentración bioactiva del extracto es el tiempo de maceración, generando una situación de compromiso entre la duración deseada del proceso y la concentración de los compuestos de interés en el extracto final.

Extracción: Debido al aseguramiento de los bajos requerimientos de temperatura y presión, la obtención del extracto se realiza a través de un proceso de presión natural. Gracias a la geometría de la columna, la altura del disolvente, ahora extracto, genera una potencial presión positiva que impulsa el flujo de este al momento de abrir la válvula de descarga. Dependiendo de los disolventes utilizados, obteniendo viscosidades diversas, es aplicada presión de succión, requiriendo mínimos consumos energéticos con presiones no mayores a 1bar

4.2.2. Aplicaciones

La técnica MSAT ha sido aplicada por el grupo de investigación LIDSA a matrices agroalimentarias muy heterogéneas, tal como se resume en la **Tabla 2**. Su principal y primera aplicación ha sido en los subproductos de los procesos de vinificación, generando extractos bioactivos a partir del bagazo de la uva. En una línea similar, su utilidad se ha ampliado a otros orígenes agroindustriales, como la especie *Cytisus scoparius*, derivada de los restos de poda en el acondicionamiento de carreteras, así como los residuos descartados de *Vaccinium corymbosum*, generados en los grandes mercados o en las industrias de proceso de arándanos.

En lo que respecta a los disolventes extractivos, la técnica MSAT se alinea con la utilización de disolventes GRAS. Ejemplos de estos disolventes incluyen el lactato de etilo, un solvente seguro, *verde*, eficiente y potencialmente económico para la recuperación de fitoquímicos de subproductos de frutas y verduras[136]. Así también, el propilenglicol, ampliamente empleado en la industria farmacéutica debido a sus propiedades humectantes, viscosidad e inocuidad, se destaca como un extractante funcional en el contexto de la MSAT. Extractantes como el etanol y el agua, unos de los disolventes más comunes en la extracción de compuestos bioactivos de fuentes agroalimentarias, se utilizan con esta técnica.

Con respecto a las actividades, los extractos derivados de MSAT a partir de *Vitis vinifera* muestran una elevada carga polifenólica (~6000 mgGAE/L) como antioxidante (~45 mmolTRE/L). De la misma forma, presentan efecto antimicrobiano contra más de 19 cepas clínicas presentándose como un coadyuvante prometedor en la lucha contra la resistencia a los antibióticos. En el caso de los extractos obtenidos mediante MSAT a partir de los restos de poda de retama negra (*Cytisus scoparius*), se observa la generación de extractos con propiedades antimicrobianas y antibiofilm, especialmente cuando se utiliza una mezcla hidroorgánica de lactato de etilo y agua. Estos extractos se perfilan como potenciales agentes para el control del

USC DE COMPOSTELA

crecimiento y la transmisión de patógenos en la industria alimentaria. Comparados con otras metodologías de alta demanda energética como extracción líquida presurizada (PLE), los extractos de MSAT muestran resultados similares con un menor consumo de energía, destacándose como agentes antimicrobianos eficaces contra bacterias Gram positivas. Adicionalmente, los extractos de arándanos (*Vaccinium corymbosum)* obtenidos mediante la técnica MSAT exhiben efectos antibiofilm, inhibición del crecimiento y actividad bacteriostática contra 7 patógenos nosocomiales.

Tabla 2 Casos de aplicación de la técnica extractiva MSAT, matrices extraídas y principales compuestos analizados

Compuestos	Matriz	Masa (g)	Volumen (mL)	Actividad	Solvente	Año[Referencia]
Fenólicos	Bagazo de *Vitis vinifera*	1-20	500	TPC AA (DPPH) Antibacteriana	Agua Etanol	2012[135]
Fenólicos y Alcaloide	*Cytisus scoparius*	50-100	50-150	TPC AA (DPPH) Antimicrobiana	Lactato de etilo Metanol	2015[137]
Fenólicos	*Vaccinium corymbosum*	20	100	Antiadhesiva Antibiopelícula	Agua salina	2020[138]
Fenólicos	*Vaccinium corymbosum*	20-5000	100-7000	TPC Antimicrobiana Antibiopelícula	Agua salina	2021[139]
Fenólicos	Bagazo de *Vitis vinifera*	20-200	10-150	TPC AA (DPPH)	Agua Etanol Lactato de etilo Propilenglicol	2022*
Fenólicos	Bagazo de *Vitis vinifera*	200	100	TPC AA (DPPH) Antibacteriana	Agua Lactato de etilo	2023[140]
Fenólicos	*Cytisus scoparius*	200	100	TPC AA (DPPH) Antimicrobiana Antibiopelícula	Agua Lactato de etilo Propilenglicol	2023[141]

*Incluido en el Capítulo 2.1 de este trabajo.

4.3. DISRUPTOR CELULAR

4.3.1. Introducción

Uno de los principales desafíos en la extracción de compuestos bioactivos de plantas, algas o matrices agroindustriales radica en la adecuada disrupción del material. Esta debe asegurar la liberación de los analitos de interés, contenidos en su mayoría en tejidos y células, al mismo tiempo de asegurar condiciones de proceso que no alteren la composición de estos compuestos. Para abordar este problema, se han desarrollado diversos equipos conocidos como disruptores celulares, que se centran en la ruptura parcial o total de tejidos y paredes celulares, adaptándose a las necesidades específicas de cada aplicación. Estos disruptores se dividen principalmente en dos grupos: los mecánicos y los no mecánicos. En el caso de la disrupción mecánica, se rompe la membrana celular mediante fuerzas físicas de corte, siendo este método uno de los

USC DE SANTIAGO

más utilizados debido a su eficacia y costo. Por otro lado, los métodos no mecánicos implican la perforación de la célula mediante debilitamiento por medios físicos como el calor, la cavitación y las diferencias osmóticas. Así también se emplean mecanismos químicos como detergentes, medios alcalinos o disolventes altamente reactivos que solubilizan la membrana. De la misma forma, a través de la utilización de enzimas se generan procesos de lisis celular biológica, donde enzimas como lisozima, lisostafina, zimolada, celulosa, proteasa o glucana, reaccionan con los diferentes compuestos que componen la membrana rompiendo los enlaces y generando la liberación de los componentes internos.

La complejidad de los procesos disruptivos no solo se relaciona con la efectividad de la disrupción y la preservación de las propiedades de interés en la matriz, sino también con su viabilidad en términos de escalabilidad. Mientras que en los tratamientos de muestra en laboratorio, o en pequeños procesos de análisis, son factibles una amplia gama de instrumentos disruptivos, la aplicación de estos en volúmenes industriales, con mecanismos simples y de bajo costo, puede ser limitada. Matrices de interés nutracéutico, como macro y microalgas, que suelen tener una resistente pared celular, así como aplicaciones que requieren el uso de diversas enzimas costosas o detergentes no compatibles en la industria, pueden restringir aún más su aplicabilidad.

De esta forma en el siguiente apartado se resumen los métodos físicos y químicos aplicados en el campo de la investigación que poseen una elevada adaptabilidad en el campo industrial, así como que son capaces de hacer frente a fuertes membranas celulares con un impacto energético y consumo económico asumibles.

4.3.2. Disruptores mecánicos

Disruptor Celular (sistema rotor estator)

Dentro de la categoría de dispositivos mecánicos disruptivos, el disruptor rotor estator, también conocido como molino coloidal o Willems, destaca como el más utilizado para descomponer tejidos y membranas celulares a una escala menor, especialmente en el tratamiento de muestra en entornos de laboratorio. Su principio básico es simple pero efectivo. Consiste en una estructura tubular con forma de probeta o sonda, que tiene en su extremo una parte fija (estator). En esta parte fija se encuentra una estructura concéntrica giratoria (rotor), que al girar a altas velocidades succiona la muestra a través del estrecho espacio entre el rotor y el estator, generando la ruptura de la matriz mediante una combinación de turbulencia intensa y cizallamiento. El cizallamiento hidráulico y mecánico resultante se complementa en menor medida con gradientes de presión sónica y ultrasónica de alta energía. Este proceso es rápido y según la dureza de la muestra los resultados deseados suelen lograrse en un intervalo de 15 a 120 segundos[142].

Los homogeneizadores rotor-estator de tamaño de laboratorio demuestran su versatilidad al procesar muestras líquidas en un extenso rango, desde 300 µL hasta decenas de litros. La velocidad y eficacia de la homogeneización se ven notablemente influidas por el tamaño del equipo, destacando su efectividad principal en muestras líquidas con viscosidades inferiores a los 10 Pa·s.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En contraste, los homogeneizadores rotor-estator de uso industrial son variantes a escala de los modelos de laboratorio u homogeneizadores en línea. Estos dispositivos industriales incorporan un impulsor de alta velocidad multipala orientado horizontalmente y equipado con dientes en el borde. Estos dientes se encuentran alineados estrechamente con sus homólogos en el estator, proporcionando la capacidad de manejar viscosidades de hasta 50 Pa.s. Este diseño robusto y potente permite la homogeneización eficiente de muestras más viscosas, extendiendo así la aplicación de estos homogeneizadores a entornos industriales.

Variables que influyen en la eficiencia de los homogeneizadores rotor-estator

DISEÑO Y TAMAÑO DEL ROTOR-ESTATOR

La tecnología en la distribución de los canales del par rotor estator, el número de niveles de disrupción dentro de la sonda, y el tamaño de esta son factores fundamentales en la correcta dispersión de la matriz. El espacio disponible entre los diversos canales del disruptor (**Figura 4**) tienen que permitir el paso de la muestra, así como también asegurar el perfecto cizallamiento entre el rotor estator. Si los canales son muy grandes, la muestra solo se moverá libremente a través del disruptor, en caso contrario, la muestra no podrá ingresar al estator. Así también, existen equipos con más de un par rotor estator, haciendo un proceso de mayor tortuosidad para la muestra, segregando de un nivel de mayor tamaño de partícula hasta uno menor. Estos sistemas son de gran utilidad en muestras de gran dureza y tamaño.

Figura 4 Tipos de arreglos y tamaños de equipos disruptores rotor-estator

Velocidad de la punta del rotor

El tamaño de la sonda rotor-estator puede variar desde los 0.5 cm hasta unidades mucho más grandes permitiendo el procesado en lote cercanos a los 20000 L y flujo en línea aproximados de 70000 L/h. La velocidad de los rotores varía de 3000 rpm para las unidades grandes a 8000-60000 rpm para las unidades más pequeñas. En principio, la velocidad del rotor del homogeneizador debería duplicarse por cada mitad del diámetro del rotor. El parámetro de funcionamiento importante no son las revoluciones por minuto en sí, sino la velocidad de la punta del rotor, siendo un rango óptimo de 10 a 20 m/s[142].

Tamaño inicial de la muestra

El tamaño de la muestra antes de ser procesada con el homogeneizador debe ser lo suficientemente pequeño como para ser aspirado dentro del estator. Por lo tanto, las muestras a menudo deben ser pretratadas para disminuir su tamaño. Así también, algunos estatores incorporan cuchillas de corte expuestas que sobresalen de los rotores o con dientes de sierra en los estatores que trituran las muestras más grandes, eliminando el pretratamiento.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tiempo de procesamiento

El tiempo de procesamiento en los equipos rotor estator es tanto breve como constante. Se ha demostrado que en la mayoría de los casos una sobreexposición de la muestra hacia el cizallamiento de estos equipos solo genera un exceso de calor en el medio degradando la misma. Así, tiempos de corte máximos de 10 minutos han mostrado un tope en la disrupción generada por los equipos. A su vez, dependiendo de los volúmenes manejados y el tamaño de la muestra, el tiempo de residencia de la matriz en el estator debe ser optimizada.

Concentración de la muestra, volumen y viscosidad del medio

Muestras concentradas presentan un mejor desempeño en la disrupción debido a un mayor número de choques generados por la densidad de partículas en volúmenes reducidos. En contraste, muestras diluidas presentan de forma general una baja viscosidad, siendo más efectivo el proceso disruptivo mecánico generado por el par rotor estator debido a un menor esfuerzo. Así se debe buscar un balance óptimo y equipos adecuados a las concentraciones y viscosidades presentadas.

Forma del recipiente y posición del rotor-estator

Son diversos los envases empleados para los procesos disruptivos, desde instrumentos específicos para estos procesos, hasta vasos de precipitados y envases redondeados. Los recipientes específicos para homogeneización, los cuales muestran una forma cilíndrica con bordes redondeados muestran un mejor rendimiento que simple recipientes redondos. Así también, la inclusión de una camara sellada mediante una tapa o dispositivos de ajuste, muestran una menor formación de aerosol, la cual generará pérdidas de la muestra. En función de la disposición de la sonda, una distribución no concéntrica genera una mayor eficiencia. Este movimiento radial hacia el borde del envase por parte de la punta del disruptor aumenta la turbulencia del fluido, aumentando el área de impacto derivando en una disrupción más homogénea.

4.4. Extracción Asistida por Ultrasonidos (UAE)

En la extracción asistida por ultrasonidos se utilizan ondas ultrasónicas de alta frecuencia (entre 20 kHz y 100 kHz) a través de un disolvente líquido que contiene partículas sólidas. La fuerza necesaria para generar la extracción se obtiene mediante la transformación de la energía acústica en energía mecánica mediante ondas de choque equivalentes a miles de bares de presión como puntos calientes cercanos a los 5000K[143]. En esta técnica se producen enormes cantidades de microburbujas que colisionan generando un aumento en la temperatura y presión, creando una zona de cavitación que provoca cizallamiento extremo e inestabilidad. De esta forma, el esfuerzo mecánico generado contribuye a la ruptura de las paredes celulares de la muestra, facilitando así la liberación de los compuestos deseados hacia el disolvente[144]. De forma general se hace referencia a una extracción “asistida” ya que la ruptura de las membranas celulares no es generada exclusivamente por las ondas de choque, influyendo otros parámetros como la temperatura, presión, naturaleza del medio, entre otras. Así, la UAE puede clasificarse como una combinación de un proceso disruptivo mecánico y uno químico, lo que le brinda una elevada eficiencia en la extracción de diversas clases de matrices. Así, esta metodología ha sido

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

empleada en la extracción de compuestos bioactivos a partir de algas[145], plantas[146] y frutas[147]; con una elevada eficiencia.

La UAE emerge como una técnica, reconocida como una tecnología limpia que ha captado considerable interés en los últimos años gracias a sus notables ventajas en comparación con las técnicas convencionales. Estas ventajas incluyen la utilización de tiempos extractivos reducidos, bajos volúmenes de disolvente, mínimos requisitos instrumentales y bajos impactos económicos y ambientales.[148] A pesar de la abundancia de estudios a escala de laboratorio, los hallazgos extrapolados a través de plantas piloto han sido limitados. Esto se atribuye principalmente a los elevados costes de inversión para la instalación de unidades de alta potencia/amplitud [149].

Variables que influyen en la eficiencia de la extracción asistida por ultrasonidos

Tipos de ultrasonido

A nivel de laboratorio, se identifican dos diseños principales para la implementación de equipos de extracción por ultrasonidos: los baños de ultrasonidos convencionales y las sondas de ultrasonidos. Los baños de ultrasonidos son ampliamente utilizados debido a su capacidad para extraer múltiples muestras de diversos tamaños mediante la transmisión de ondas de choque en un tanque. Estos baños cuentan con un transductor ubicado en el fondo, el cual convierte la energía eléctrica en vibraciones ultrasónicas, transmitiéndolas al fluido y, finalmente, al recipiente que contiene la muestra. Este método facilita el tratamiento simultáneo de diversas muestras, tiene un costo accesible y distribuye uniformemente la energía en el recipiente y no requiere adaptaciones especiales del recipiente de reacción. En contraste requiere altos valores de frecuencia para el tratamiento de matrices de elevada dureza como algas, ya que la potencia debe ser suficiente para poder producir cavitación dentro del recipiente de extracción que se encuentra dentro del baño, lo cual no siempre es sencillo de lograr[148].

Por otro lado, las sondas de ultrasonidos, que colocan la fuente generadora de ultrasonido en contacto directo con el medio que sostiene la muestra, representan una alternativa atractiva. A diferencia de los baños de ultrasonidos, las sondas ofrecen mayor versatilidad en la modificación de parámetros como la amplitud, el tiempo y la presión, además de garantizar valores de temperatura que evitan cambios significativos en la estructura molecular. En términos generales, estos sistemas son más eficientes para irradiar el medio de reacción que los baños ultrasónicos, aunque algunos estudios indican que ambas técnicas arrojan resultados comparables. Sin embargo, la desventaja de las sondas radica en su limitación para aplicarse solo a un depósito, sin ser viable para tratar más de un tipo de muestra simultáneamente.

Potencia y frecuencia

Los parámetros potencia y frecuencia desempeñan roles cruciales en la eficacia de la extracción de compuestos bioactivos por UAE. De manera general, mayores valores de potencia, en el rango de los 200 a los 500 W muestran mejores niveles de extracción. Esto puede deberse al incremento en la amplitud de las ondas, provocando un colapso más enérgico de las burbujas de líquido, facilitando así la ruptura de las paredes celulares y acelerando la difusión de los compuestos al medio. Se han reportado valores óptimos en la obtención de licopeno a partir de tomates de 200 W de potencia y una frecuencia en el intervalo de 46 a 48 kHz[150].

USC COMPOSTELA

Sin embargo, al aumentar la potencia a valores más elevados (aproximadamente 500 W), entran en juego factores como el efecto térmico, que puede descomponer los compuestos de interés, y la formación de burbujas excesivamente grandes, que colapsan de manera más débil, resultando en una reducción de la cavitación. De manera similar, en el proceso de extracción de estilbenoides de los tallos de la uva, se obtienen resultados comparables con procedimientos convencionales de extracción mediante un sistema UAE con sonda de alta intensidad a 200 W y 24 kHz.[151]. En relación con la frecuencia de trabajo, se suele mostrar un rango más acotado, generalmente entre 20 y 50 kHz. Para la extracción de macroalgas se han aplicado valores desde los 25 hasta los 40 kHz[152]. En el caso de la extracción de grasas de productos de repostería, fenólicos de olivas, ácidos orgánicos de uvas y capsaicina de ajíes, se han utilizado frecuencias de 20, 30, 24 y 35 kHz, respectivamente[153].

Tiempo

UAE permite obtener buenos rendimientos de extracción con tiempos de procesamiento relativamente cortos (máximo 60 min), ya que tiempos más largos pueden provocar cambios indeseables en los compuestos extraídos. En este sentido, el tiempo optimizado comúnmente oscila entre 20 y 60 minutos, minimizando el consumo de energía y reduciendo la exposición de los compuestos al proceso[154].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

5.1. ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR UV-VIS

La espectroscopía UV-Vis es una técnica analítica, simple, versátil, no destructiva y económica, adecuada para un amplio espectro de compuestos orgánicos y algunas especies inorgánicas. En función de la longitud de onda, los espectrofotómetros UV-Vis miden la absorción, transmisión o reflexión de la luz que pasa a través de un medio. Las metodologías que incorporan espectrofotómetros UV-Vis son aplicables a una amplia gama de disciplinas de investigación, agricultura, agroindustriales, farmacología, entre otras. Generalmente, la espectroscopía UV-Vis se utiliza para determinar cuantitativamente concentraciones del compuesto objetivo en una disolución de acuerdo con la ley de Beer-Lambert. De esta manera, la absorbancia de diferentes analitos a longitudes de onda determinadas es relacionada directamente con su concentración en una muestra.

La espectroscopía UV-Vis se ha aplicado al análisis cualitativo y cuantitativo, así como a la determinación de estructuras como a monitorizar reacciones en una amplia gama de entornos. Se puede utilizar de manera simplificada a través de una sencilla detección, pero también de maneras muy complejas mediante el análisis continuo de reacciones y detección de compuestos. Formas más complejas incluyen el uso de detección UV-Vis en detectores para HPLC y técnicas de muestreo de recipientes de reacción (pequeña y gran escala) conectados a celdas de flujo dentro de espectrómetros UV-Vis.

Los equipos espectrofotométricos han sufrido cambios importantes desde su invención hasta la actualidad. El primer equipo comercial diseñado por Arnold O. Beckman en 1941 constaba de un instrumento robusto de acero de aproximadamente 30 cm de alto, 30 cm de ancho y 80 cm de largo, tenía un campo de trabajo de 220 a 1000 nm, lo cual se lograba intercambiando la fuente de luz estándar de tungsteno por una lampara de hidrógeno o mercurio. Contaba con celdas o cubetas de un volumen cercano a los 3mL con capacidad para colocar hasta 4 celdas. Actualmente, los equipos de medición UV-Vis cuentan con microlectores que permiten la detección de la absorción de la luz por parte de la muestra en un rango de 200 a 1000nm sin la necesidad de modificar la fuente lumínica midiendo volúmenes de 2 µL. Mediante controladores, se pueden realizar mediciones continuas de más de 90 detecciones en intervalos inferiores a 1minuto. De la misma forma, se han desarrollado medidores UV-Vis con rangos de 340 a 1000 nm portátiles con un peso inferior a los 200 g y un tamaño de 10 cm capaces de conectarse a medios electrónicos como ordenadores o móviles proporcionando una medida directa, rápida y robusta en cualquier campo de trabajo.

5.1.1.Contenido fenólico total (TPC)

El contenido fenólico total (TPC, por sus siglas en inglés: *total phenolic content*) o índice de Folin-Ciocalteu es una medida global del contenido de compuestos fenólicos en una disolución, obtenida mediante la reducción química del reactivo de Folin en un medio alcalino[155]. El reactivo de Folin, compuesto por una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolíbdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), experimenta una reducción inducida por la oxidación de los fenólicos, generando una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23})[156]. La coloración azul resultante exhibe una absorbancia máxima alrededor de 765 nm, proporcional al porcentaje de compuestos fenólicos presentes. La

respuesta de este análisis está vinculada a la cantidad de fenólicos, donde el número de grupos $^{-}$OH o grupos potencialmente oxidables regula la intensidad del color formado.

En el campo del análisis fenólico, el ensayo de Folin-Ciocalteu se aplicó inicialmente para estudiar el vino, pero desde entonces se ha convertido en el método de referencia para determinar y cuantificar compuestos fenólicos en una amplia variedad de alimentos y muestras biológicas debido a su simplicidad y reproducibilidad[157]. Así, la medición del TPC ha sido aplicado a matrices como extractos de café[158], aceite de oliva[159], semillas de uva[160], subproductos de la industria maderera[161], y hasta en matrices biológicas como sangre y orina[162].

El contenido de polifenoles totales en las muestras se expresa mediante un marco de referencia, utilizando la respuesta de un compuesto como medida para evaluar la acción global de los compuestos fenólicos. Se han utilizado estándares tales como ácido tánico, ácido gálico, catequina, tirosina, y otros. De forma general, el ácido gálico ha sido uno de los más utilizados como referencia debido a ser una estructura monomérica común en diversas cadenas fenólicas, así como ser estable en su forma seca, económico y soluble en agua. Así, son diversos los análisis que reportan el contenido fenólico de sus extractos como miligramos equivalentes de ácido gálico por litro (mgGAE/L).

La metodología de Folin-Ciocalteu depende de la oxidación selectiva de sustancias análogas que se oxidan fácilmente, contribuyendo al contenido aparente de fenólico total. Sin embargo, es crucial tener en cuenta que esta metodología puede carecer de especificidad[163]. Aunque el método de Folin-Ciocalteu ofrece resultados predecibles en una amplia gama de fenólicos, su validez puede ser afectada por otras moléculas reductoras no fenólicas[164]. Asimismo, pueden surgir interferencias de sustancias como aminas aromáticas, tocoferoles, ácidos orgánicos, reductonas, dióxido de azufre, enedioles, azúcares, y otros. Por ende, es imperativo corregir las sustancias interferentes para evitar sesgos en los resultados [165].

Así también, la metodología de Folin-Ciocalteu es sensible a modificaciones en el pH, la temperatura y el tiempo de reacción, donde las condiciones de reacción deben seleccionarse cuidadosamente para obtener resultados precisos. Como los compuestos fenólicos sólo reaccionan con el reactivo ácido de Folin en condiciones básicas, debido a que se requiere un grupo OH^{-} desprotonado en el anillo fenólico, se agrega una disolución de carbonato de sodio a la mezcla comprendida por la muestra y el reactivo. Así, es elevado su pH a aproximadamente 10 unidades, evitando la alcalinidad excesiva. Las muestras deben incubarse con el reactivo de Folin durante 30 a 120 minutos a temperatura ambiente. El color azul generado permanece constante hasta seis horas posteriores, siendo los resultados generados comparables a los obtenidos después de sólo media hora, existiendo una desviación estándar aumentada. Aunque el color puede aparecer más rápidamente a altas temperaturas el color también desaparece más rápidamente.

Es fundamental comprender que el TPC proporciona una medida global robusta que permite obtener información estimativa y comparativa de diversas muestras de manera rápida y económica. Sin embargo, para objetivos más amplios que requieran un análisis detallado del perfil polifenólico, así como de las interacciones y modificaciones resultantes de diversos parámetros extractivos, se necesitarán metodologías más especializadas y enfocadas en esos objetivos específicos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.1.2. Actividad antioxidante (AA)

En general, se define un antioxidante como una entidad molecular, iónica o radical relativamente estable capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas [166]. Desde una perspectiva macroscópica, la actividad antioxidante se refiere a cualquier sustancia que, en concentraciones relativamente bajas en comparación con el sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente su oxidación [167]. En la industria alimentaria, los antioxidantes se emplean ampliamente para contrarrestar el daño oxidativo en los productos alimenticios. Estos compuestos disminuyen la velocidad de la oxidación al interactuar con los radicales libres, formando especies menos reactivas y peligrosas [168]. Muchos antioxidantes de interés son de origen vegetal, pertenecientes a compuestos fenólicos y polifenólicos, carotenoides y vitaminas antioxidantes, entre otros. Por consiguiente, diversos ensayos se centran en la obtención de estos compuestos bioactivos de diversas fuentes agroindustriales para su aplicación como estabilizadores de radicales libres.

La heterogeneidad de los compuestos antioxidantes requiere la adaptación de diferentes métodos para su cuantificación, según las propiedades de las sustancias químicas. En este sentido, los ensayos de antioxidantes se basan comúnmente en la transferencia de electrones, evaluando la capacidad de un antioxidante para reducir un oxidante, lo cual se manifiesta en un cambio de color durante la reacción de reducción. La intensidad de este cambio cromático se correlaciona con la concentración de antioxidantes presentes en la muestra. Entre los métodos más utilizados se encuentran el ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), FOX (oxidación ferrosa-naranja xilenol), FTC (tiocianato férrico), FRAP (poder reductor/antioxidante férrico), PFRAP (poder reductor de ferricianuro de potasio) y CUPRAC (poder antioxidante reductor cúprico). Destacan especialmente los ensayos ABTS y DPPH debido a su amplia aplicabilidad y presencia en numerosos estudios, lo que facilita la comparación con futuras investigaciones gracias a la disponibilidad de información extensa recopilada bajo estas técnicas.

Ensayo del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

El ensayo de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) es uno de los ensayos colorimétricos más populares para estimar la capacidad de eliminación de radicales libres a partir de extractos de plantas y diversos bioactivos. Este método es preciso, fácil de realizar y económico, proporciona una evaluación de la actividad general de los antioxidantes y se basa en un radical estable y sintético (DPPH)[169]. El radical libre DPPH es un radical de nitrógeno orgánico de larga vida con un color púrpura intenso. Cuando una disolución de DPPH se mezcla con un antioxidante, su color cambia del morado al amarillo de la hidracina correspondiente. La capacidad reductora de los antioxidantes frente al DPPH se puede evaluar monitoreando la disminución de su absorbancia a 515–528 nm. Los resultados se expresan como IC50 o cómo % de eliminación de $DPPH^{\bullet}$ a una concentración fija de antioxidante para todas las muestras[170].

Aspectos en consideración para la aplicación de método DPPH

Las ventajas primordiales en la utilización del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo en la determinación de la actividad antioxidante radican en su rápida reactividad, estabilizándose en un intervalo de 10 a 30 minutos, y en su sencilla preparación y aplicación, sin necesidad de

USC DE COMPOSTELA

reactivos adicionales o procedimientos de ajuste de alcalinidad previos. Además, el DPPH, como reactivo comercial de bajo costo, permanece estable en estado sólido durante períodos prolongados cuando se mantiene refrigerado, y exhibe estabilidad en forma diluida hasta una semana después de su preparación.

No obstante, esta metodología presenta ciertas restricciones en su aplicación. La solubilidad del DPPH, principalmente en medios orgánicos, especialmente alcohólicos, constituye una restricción, ya que no es directamente soluble en agua[171]. Aunque se aplica a diversas muestras acuosas, su solubilidad limitada en agua puede dar lugar a precipitación, ocasionando interferencias en las medidas de absorbancia. De la misma forma, muestras con un elevado contenido lipídico o emulsiones tienden a generar precipitado por su baja solubilidad en el medio alcohólico donde es diluido el reactivo de DPPH.

La estructura voluminosa del radical DPPH pude dificultar su interacción con eliminadores de radicales, resultando en falsos negativos. Este impedimento estérico provoca que moléculas de gran tamaño reaccionen lentamente o incluso sean inertes a pesar de poseer capacidad antioxidante.

Otro aspecto crucial es el rango de absorción espectrofotométrico de las muestras en las que se aplica la metodología. Compuestos bioactivos como carotenoides y antocianinas, con alto potencial antioxidante, muestran una absorbancia significativa en el rango de 500 a 600 nm, limitando la aplicabilidad del DPPH debido a la interferencia de la absorción de estos compuestos. Para abordar esto, se realizan diversas diluciones de la muestra para inhibir la interferencia, Sin embargo, una dilución excesiva debajo del umbral de inhibición de reactivo de DPPH vuelve compleja su aplicación a estos compuestos.

Ensayo del radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS)

La técnica ABTS se basa en un proceso oxidativo que conduce a la formación del cromóforo catiónico radical estable de coloración verde azulada conocido como $ABTS^{\bullet+}$. Este radical se genera al hacer reaccionar la sal de ABTS con un agente oxidante fuerte. En una primera aplicación, fue utilizado el ABTS como un método de referencia en procesos oxidativos mediante el uso de peroxidasas con H_2O_2, para producir el radical $ABTS^{\bullet+}$[172]. En contraste, en su aplicación como indicador de la actividad antioxidante, fue utilizada la metamioglobina junto con H_2O_2 para generar el radical ferrilmioglobina, el cual reaccionó con ABTS para originar $ABTS^{\bullet+}$[173]. Recientemente, se han implementado diversas estrategias para la generación de $ABTS^{\bullet+}$, que incluyen la reacción con dióxido de manganeso[174], diclorhidrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH)[174], y una de las más utilizadas, el persulfato de potasio[175].

La propuesta del ABTS como indicador de reacciones de oxidación-reducción fue presentada por Wolfenden y Willson en 1982, a través de la investigación de radicales-cationes como cromógenos de referencia en estudios cinéticos de transferencia de un electrón[172]. La combinación de ABTS con peroxidasas y H_2O_2 revela una absorción máxima del radical $ABTS^{\bullet+}$ a 415 nm. Este fenómeno posiciona al ABTS como un marcador destacado en el análisis de reacciones de transferencia de electrones, donde un radical libre actúa como oxidante de un electrón. Por otro lado, la aplicación de una metodología para la determinación de la actividad antioxidante mediante el radical $ABTS^{\bullet+}$ es atribuida a Miller *et al.,* (1993), en su

USC DE COMPOSTELA

estudio de la capacidad antioxidante total de fluidos corporales y soluciones farmacológicas[173]. Así, es mostrada la combinación de la sal de ABTS con metamioglobina como peroxidasa, en presencia de H_2O_2, generando el radical $ABTS^{\bullet+}$ con máximos de absorción a 650, 734 y 820 nm. En presencia de reductores antioxidantes y donantes de hidrógeno, la absorbancia de este catión radical decrece en una medida relacionada con la capacidad antioxidante del fluido añadido (en ausencia de compuestos interferentes). Esta técnica demuestra un alto potencial al ofrecer tres zonas espectrales separadas por aproximadamente 80 nm, las cuales están distantes de la mayoría del rango de absorción de compuestos naturales que suelen absorber en las zonas ultravioleta (200-400 nm) y visible en el rango de 400-600 nm.

Consideraciones relevantes para la aplicación del método ABTS

ABTS es una metodología robusta y rápida para la medición de la actividad antioxidantes de diversas disoluciones. A su vez, es un proceso sencillo el cual solo requiere la formación del catión, y posterior mezcla con la muestra a análisis. La sal ABTS es soluble en agua y puede ser diluida en diferentes disolventes orgánicos siendo compatible con un gran número de matrices. De la misma forma, al presentar 4 máximos de absorción espectral puede adaptarse a potenciales interferencias en el rango de 400 a 800 nm. Así también, los resultados del ensayo ABTS son comparables a los obtenidos con la metodología de DPPH, ya que ambos radicales reaccionan con la misma estequiometría con el análogo de la vitamina E soluble en agua, Trolox[176].

En contraste, la metodología ABTS requiere la preparación del catión en un proceso que por lo general conlleva a una reacción lenta entre 12 a 16 horas, lo que limita su aplicación directa. A su vez, $ABTS^{\bullet+}$ no es un compuesto presente en sistemas biológicos, representando una fuente no fisiológica de radicales, pudiendo no ser lo suficientemente representativo en el análisis de extractos naturales. Sin embargo, mediante un análisis comparativo de las diferentes metodologías para la medición de la actividad antioxidante como DPPH, FRAP, capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC) y Capacidad antioxidante de los radicales hidroxilo (HORAC); ABTS ha mostrado la menor cantidad de inconvenientes en el momento de su aplicación [171].

5.2. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es una técnica de separación muy utilizada debido a su gran versatilidad, ya que cubre un amplio espectro de aplicaciones, con rapidez y con excelentes resultados, siendo además un muy buen método analítico cuantitativo. Mediante HPLC se separan los componentes de una mezcla, en base a la migración diferencial de los mismos, en un sistema que consta de dos fases, una móvil, que fluye continuamente en una determinada dirección, y otra estacionaria, que permanece fija. Se realiza en columna y por sus características particulares se ha convertido en una de las de mayor rendimiento y eficacia. Un detector, colocado a la salida de la columna, proporciona un registro continuo del eluato, por lo que permite obtener un cromatograma, que se utiliza para identificar y cuantificar los componentes de la muestra.

USC DE COMPOSTELA

La cromatografia de reparto ha llegado a ser el tipo de cromatografia de líquidos más ampliamente utilizada. En cromatografia de reparto, los soportes para casi todos los rellenos

con fases unidas químicamente se preparan con sílice rígida o composiciones constituidas básicamente por sílice. Estos sólidos están formados por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, con diámetros de 3, 5 o 10 μm. Los recubrimientos de fase enlazada más utilizados son los siloxanos, que se forman por reacción de la superficie hidrolizada con un organoclorosilano. Los rellenos de fase enlazada se clasifican como de fase inversa cuando el recubrimiento unido químicamente tiene un carácter no polar, y de fase normal cuando el recubrimiento contiene grupos funcionales polares. Tal vez las tres cuartas partes de toda la cromatografla de líquidos de alta resolución se llevan a cabo normalmente con rellenos de fase inversa. Por lo general, el grupo R del siloxano en estos recubrimientos es una cadena C8 (n-octilo) o una cadena C18 (n-octadecilo). En la mayoría de las aplicaciones de la cromatografia en fase inversa, la elución se lleva a cabo con una fase móvil de elevada polaridad como es el caso de una disolución acuosa conteniendo concentraciones diversas de disolventes como metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano[177].

5.2.1. Detector de matriz de diodos (DAD)

El Detector de Matriz de Diodos (DAD), también conocido como serie de diodos o de fotodiodos (PDA), es un tipo de detector común en HPLC para analizar compuestos en una muestra. Este detector es una mejora del detector de absorbancia UV-Visible convencional. La principal característica del DAD es que utiliza una matriz de diodos fotoemisores dispuestos en serie en lugar de un solo detector. Cada diodo en la matriz cubre una región específica del espectro ultravioleta y visible. Esto permite al DAD medir la absorción de luz a diferentes longitudes de onda simultáneamente, lo que brinda información detallada sobre la composición de la muestra.

En la disposición de una matriz de diodos, múltiples diodos sensibles a la luz están colocados uno al lado del otro. Para obtener información espectral, la luz se dirige hacia la matriz de modo que cada diodo reciba solo un rango estrecho específico de longitudes de onda. Luego, la información espectral se convierte en una coordenada espacial y se registra simultáneamente en todo el espectro accesible[178]. La matriz de diodos se destaca como la opción más fácil y rápida para detectar y cuantificar componentes activos, ya que proporciona información cromatográfica detallada basada en espectros completos recopilados en un amplio rango de longitudes de onda. En contraste, cuando se llevan a cabo análisis de compuestos conocidos, también se puede utilizar la detección en una longitud de onda UV específica.

5.2.2.Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas se presenta como una técnica analítica robusta, empleada para la identificación y cuantificación de analitos mediante la relación masa-carga (m/z) de iones generados a partir de una muestra. Esta metodología destaca por su alta especificidad y precisión en la determinación de masas atómicas, proporcionando información detallada sobre la composición elemental y estructura química. El principio fundamental de la espectrometría de masas radica en la generación de iones a partir de compuestos, ya sean inorgánicos u orgánicos. Estos iones se separan según su relación masa-carga (m/z) y se detectan cualitativa y cuantitativamente en función de sus respectivas m/z y abundancia en un espectrómetro.

USC DE COMPOSTELA

Un espectrómetro de masas consta de una fuente de iones, un analizador de masas y un detector que funcionan en condiciones de alto vacío. El analito puede ionizarse térmicamente,

por campos eléctricos o por impacto de electrones, iones o fotones energéticos. Los iones pueden ser átomos ionizados individuales, grupos, moléculas o sus fragmentos o asociados. La separación de iones se efectúa mediante campos eléctricos o magnéticos estáticos o dinámicos[179]. Se presentan diversos métodos de ionización a presión atmosférica (API) destacando la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la ionización química por electroespray (ESI).

La transferencia de especies iónicas de la disolución a la fase gaseosa mediante ESI es realizada mediante la dispersión de gotas cargadas y finamente pulverizadas, seguida de la evaporación del disolvente y expulsión de iones contenidos en las gotas. Este proceso se lleva a cabo a través un tubo a alto voltaje en relación con la cámara circundante. La aplicación de un gas nebulizador como nitrógeno mejora el caudal de muestra, donde las gotas cargadas generadas en la punta de un electroespray son dirigidas hacia el analizador del espectrómetro de masas, donde se reducen de tamaño mediante evaporación, permitiendo la expulsión de iones a la fase gaseosa. Los iones emitidos son adquiridos por un selector y acelerados hacia el analizador de masas para el análisis posterior de la masa molecular y la medición de la intensidad de los iones[180].

La actualidad de la espectrometría de masas brinda diversas herramientas para obtener información detallada acerca de una muestra. La integración de analizadores, conocida como espectrometría de masas en tándem (MS/MS), eleva la selectividad y sensibilidad de la detección. Asimismo, enfoques más innovadores como la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) posibilitan la determinación del peso molecular y la fórmula química de un analito, convirtiéndola en la principal plataforma para la elaboración de perfiles químicos, la metabolómica y el control de calidad de productos naturales vegetales[181]. Este enfoque acopla descomposiciones de iones inducidas por colisión (CID), interacciones con electrones (ECD), transferencias de electrones (ETD), interacciones con fotones (IRMPD) y disociaciones en superficie (SID), entre otras; ofreciendo mediciones de masa precisas y proporcionando información minuciosa sobre la estructura molecular y su composición[182].

5.2.3.Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

Cuando los iones viajan a través de un campo magnético o eléctrico, su movimiento se ve afectado por su relación m/z y este es el principio fundamental de la separación de iones en MS. Lo más habitual es un analizador de masas cuadrupolar. En tal sistema, un conjunto de 4 varillas metálicas paralelas se mantiene a una distancia uniforme. A cada par de varillas opuestas se les aplica voltajes específicos, lo que conduce a la creación de un campo eléctrico entre ellas. Este campo eléctrico resultante hace que los iones avancen con un movimiento oscilatorio dentro del analizador de masas. La amplitud de oscilación tiene una relación única con la relación m/z y puede controlarse cambiando el voltaje en el cuadrupolo en un valor establecido. El voltaje se puede configurar de modo que las amplitudes de oscilación para las relaciones m/z requeridas sean estables sin golpear las varillas cuadrupolares llegando al detector. Por otro lado, se filtran las amplitudes oscilatorias de los no deseados, desviándolos hacia las paredes del cuadrupolo donde se neutralizan y no logran llegar al detector[180].

Un sistema típico de espectrometría de masas en tándem consta de tres cuadrupolos dispuestos de forma lineal denominado "triple cuadrupolo". El ion analito de interés (ion precursor) es seleccionado en masa por el primer cuadrupolo (Q1) y se le permite colisionar

USC COMPOSTELA

con un gas en una segunda celda de colisión de cuadrupolo (Q2), donde los iones precursores se activan y sufren una mayor fragmentación. Este proceso se conoce como disociación inducida por colisión (CID). Los iones producto resultantes de la CID están relacionados con la estructura molecular de los iones precursores y pueden controlarse mediante un tercer analizador de masas cuadrupolo (Q3) que proporciona información estructural de los iones moleculares. Este sistema en tándem se denomina comúnmente MS/MS.

5.2.4.Espectrómetro cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF)

El QTOF es un dispositivo de análisis híbrido que integra las tecnologías cuadrupolo (Q) y tiempo de vuelo (TOF). Su diseño se asemeja al de un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, con la particularidad de que el tercer cuadrupolo ha sido sustituido por un tubo de tiempo de vuelo. Al igual que un triple cuadrupolo, el primer segmento Q1 opera como un selector de masas, filtrando iones específicos según su relación m/z. El Q2 o segundo cuadrupolo induce la fragmentación de los iones en un ambiente de gas neutro actuando como una celda de colisión. Tanto Q1 como Q2 pueden operar en modo de radiofrecuencia donde todos los iones son transmitidos sin provocar su fragmentación. Posterior a su paso por el cuadrupolo, los iones se aceleran hacia la región del modulador de iones del analizador del TOF para ser impulsados a través de un tubo de deriva mediante un potencial de alto voltaje a una frecuencia aproximada de 7-10 kHz. A su vez, resulta común la incorporación de un reflector el cual modifica la trayectoria de los iones, reflejándolos de nuevo a través de regiones libres de campo. La corrección efectuada por el reflector desempeña un papel dual; por un lado, asegura la llegada simultánea al detector de iones con la misma relación m/z, y de manera análoga, contribuye al aumento de la longitud de la trayectoria de vuelo, mejorando de esta manera la resolución. La medida del tiempo de vuelo es registrada en microsegundos siendo correlacionada con la relación m/z del ion detectado.

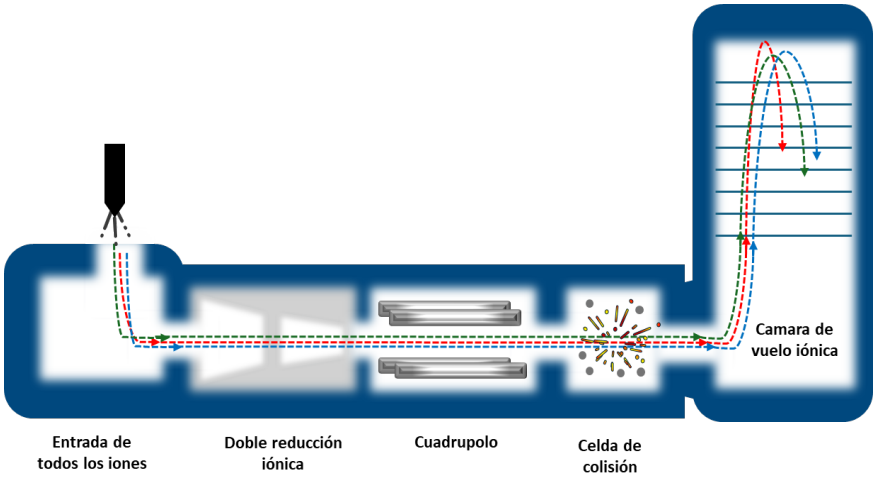


Figura 5 Descripción de las etapas de un cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF)

5.3. DISOCIACIÓN INDUCIDA POR COLISIÓN DE BANDA ANCHA (BBCID)

La técnica de disociación inducida por colisión de banda ancha bbCID es una alternativa al enfoque convencional de adquisición independiente de datos (DIA)[183]. El principio clave de esta técnica se basa en la fragmentación simultánea de todos los iones precursores (**Figura 6**) mediante la alternancia de dos energías de colisión (CE) diferentes, una baja (~4 eV) y otra alta (~25 eV) lo que permite la generación de barridos MS para todos los iones precursores y

sus fragmentos a lo largo de todo el rango de masas[184]. Este modo proporciona una alta sensibilidad de MS, lo que permite la determinación y cuantificación de compuestos marcadores (*target*) incluso de baja concentración[185]. En contraste con el método convencional, bbCID implica la fragmentación de todos los iones originales sin un aislamiento preliminar, lo que elimina la necesidad de la modificación continua de la frecuencia de escaneo.

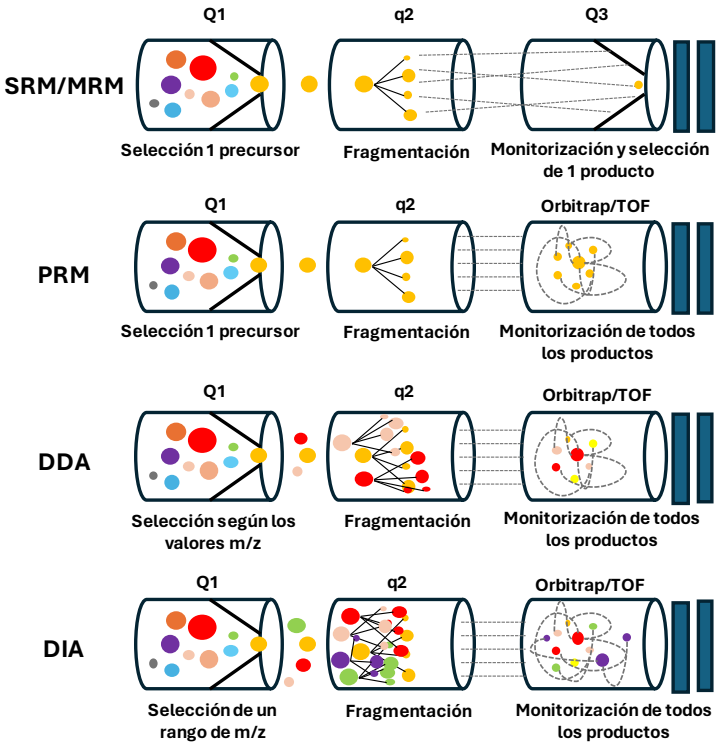


Figura 6 Comparación de modos de adquisición SRM/MRM, PRM, DDA y DIA (basada en la imagen de [186])

Una ventaja crucial de la adquisición mediante bbCID radica en la capacidad de almacenar todo el barrido MS del rango m/z seleccionado. Esto posibilita la referencia a cualquier ion dentro de ese intervalo en etapas posteriores de la adquisición. En comparación con metodologías como el monitoreo selectivo de reacciones múltiples (SRM/MRM), monitoreo de reacciones paralelas (PRM), adquisición dependiente de datos (DDA) y adquisición independiente de datos (DIA), las barreras generadas por el proceso de filtrado en el primer cuadrupolo limitan el tratamiento del perfil de la muestra al filtro seleccionado. Aunque las metodologías dirigidas SRM/MRM y PRM exhiben una notable sensibilidad, selectividad y reproducibilidad, su cobertura se ve restringida debido a su enfoque específico en un grupo selecto de iones y sus fragmentos, establecidos antes del proceso de adquisición. En DDA, todos los iones del producto son monitoreados, pero la selección basada en la intensidad de los iones de precursores presenta cierta aleatoriedad, con el riesgo de submuestreo[186]. Además, su precisión y reproducibilidad a menudo son inferiores a las de los métodos más específicos. En DIA, la ambigüedad en la selección de iones en el primer cuadrupolo se resuelve al seleccionar grupos de m/z y fragmentar todos los iones precursores dentro de una ventana de aislamiento en el Q2. No obstante, la técnica DIA requiere la definición cuidadosa de cribados para pequeños segmentos de iones, los cuales deben optimizarse y definirse según la naturaleza específica de las muestras para evitar inframediciones. En este contexto, bbCID se presenta como una alternativa poderosa para el análisis, permitiendo el paso libre de iones para su

posterior fragmentación y asignación de productos con sus respectivos precursores mediante su doble energía de alta y baja ionización.

5.3.1. Análisis dirigido (*targeted*)

El análisis dirigido o *targeted* se basa en la identificación y/o cuantificación de grupos definidos de analitos contenidos en una muestra o en un conjunto de estas. Así, previo a la detección de los compuestos de interés, se genera una base de datos con compuestos de referencia, optimizando parámetros de detección, como energías de ionización, temperatura, tiempos de retención en la fase estacionaria, como la composición de las fases móviles; en pro de una mejor resolución y reproducibilidad de los compuestos de interés. De la misma forma, este análisis implica la preselección de parámetros de filtrado, donde se seleccionan uno o varios grupos de iones precursores y productos esperados. Después de la detección, el conjunto de analitos se compara con la base de datos experimental, centrándose en parámetros como tiempos de retención y relaciones entre ion precursor e ion producto. En diferentes metodologías de detección, como SRM/MRM, PRM, DDA, y DIA, se puede observar claramente la restricción del análisis objetivo, como se ejemplifica en el filtrado generado en Q1. En el caso de la técnica bbCID, este cribado en Q1 no se genera, lo que hace más abstracta la definición de "objetivo", estableciéndose una condición de pseudotargeted en la identificación. Así, bbCID combina la ventaja del análisis no dirigido al obtener datos de múltiples analitos sin conocimiento previo, con una reproducción, sensibilidad y reproducibilidad más cercana a los métodos targeted propiamente dichos.

5.4. AUTOMS/MS

La técnica de adquisición automática de masas/masas (AutoMS/MS), se basa en un algoritmo aplicado a la adquisición dependiente de datos (DDA). En esta adquisición se distinguen los picos de los analitos del fondo, y mediante barridos sucesivos MS se obtienen las intensidades de los precursores, lo que establece de forma automática la tasa de adquisición MS/MS. Así, se combinan en un solo análisis procesos automáticos de ciclos MS con escaneos MS/MS programados por el algoritmo[187]. Esta retroalimentación brindada por el escaneo previo MS elimina el factor estocástico limitante principal de la metodología DDA. Sin embargo, no todos los analitos detectados mediante escaneo MS se fragmentarán y darán una señal espectral MS/MS, por lo que se prefiere la fragmentación de los compuestos más abundantes, o aquellos con altas capacidades de ionización, a la de los analitos menos concentrados[188]. En contraste, gracias al elevado poder de resolución, precisión de masa y capacidad de medición de espectro completo; por parte de la detección AutoMS/MS, es posible detectar casi todos los compuestos que se ionizan.

La principal aplicación del algoritmo de detección automático de masas se basa en la identificación no dirigida o "*untargeted*". La capacidad de AutoMS/MS para realizar un screening global, emparejando iones producto y precursores en un escaneo continuo, genera una huella dactilar de cada muestra analizada. Este perfil identificativo generado es construido mediante diferentes criterios de identificación derivados de su elevada exactitud. La cantidad de datos recopilados de esta forma puede ser a menudo abrumadora, por lo que se necesitan herramientas de masas precisas (es decir, bases de datos, filtros isotópicos y software de perfiles de masas) para desentrañar la identificación de pequeñas moléculas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.1. Análisis no dirigido (*untargeted*)

El análisis no dirigido o "*untargeted*" es aquel enfocado a la identificación y clasificación de analitos desconocidos en una muestra o en un conjunto de muestras. Este enfoque, comúnmente utilizado en estudios de metabolómica, prescinde a priori del conocimiento previo sobre los componentes de las muestras[189]. Los metabolitos, separados mediante cromatografía, son detectados mediante MS de barrido completo. Los datos resultantes se procesan a través de softwares que proporcionan información sobre el tiempo de retención, la relación m/z y la proporción de cada analito; sometidos de forma posterior a un análisis estadístico.

La diversidad de mecanismos de detección, herramientas estadísticas y software de tratamiento de datos, empleados en el análisis no dirigido, torna compleja la definición de un criterio único de identificación inequívoca. De forma general, se establecieron ciertos criterios ordenados para la correcta identificación de compuestos desconocidos generando así un algoritmo de identificación.

Como etapa previa y alternativa al algoritmo de identificación se presenta un cribado fino y complementario al algoritmo de selección AutoMS/MS. Este último, establecido para una preselección gruesa de los iones a detectar, puede generar una elevada cantidad de compuestos no esenciales en los procesos de caracterización. De esta manera, se establecen filtros de segmentación de datos definidos por la intensidad de los compuestos, el intervalo de adquisición, como la reproducción del analito en diferentes análisis de la misma muestra o en un grupo de ellas. Los parámetros intensidad e intervalo de análisis son factores elementales seleccionados de acuerdo con los conocimientos empíricos, las características del equipo de detección y del método cromatográfico empleado. La eliminación eficiente de compuestos no reproducibles en un conjunto de inyecciones dentro de un mismo análisis, así como su presencia en grupos específicos de muestras, se presenta como un factor clave de mayor complejidad. Al llevar a cabo esta etapa previa de manera eficiente, se logra una reducción significativa en la carga de cribado durante las fases posteriores del algoritmo de identificación.

5.4.2. Algoritmo de identificación de compuestos *untargeted*

1. Relación exacta masa carga Δm/z (mDa)

La primera etapa del algoritmo de identificación se establece a través de la comparación de la masa exacta del ion obtenido por la detección en AutoMS/MS y un diverso grupo de estructuras moleculares propuesto por la biblioteca molecular. Para restringir automáticamente el número de estructuras posibles, es necesaria la aplicación de reglas para seleccionar las fórmulas moleculares más probables y químicamente correctas. Así, muchos algoritmos de predicción de estructuras se basan en reglas heurísticas delimitadas por: (1) restricciones para el número de elementos, (2) reglas químicas LEWIS y SENIOR, (3) patrones isotópicos, (4) relaciones hidrógeno/carbono, (5) proporción de elementos de nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre versus carbono, (6) probabilidades de proporción de elementos y (7) presencia de compuestos trimetilsililados cuando es aplicado un paso previo de derivatización[190].

USC DE COMPOSTELA

Así, luego de delimitar el número de candidatos posible, se escogen aquellos que respeten una tolerancia establecida entre la masa exacta experimental y la propuesta denominada Δm/z

y expresada en ppm o mDa. Dentro de los rangos más comunes se establece como valor límite un Δm/z inferior a los 5 ppm[191–193].

2. Patrón isotópico

El patrón isotópico desempeña un papel fundamental al prever las masas y las proporciones de los isótopos en una fórmula dada. Para calcular las proporciones, se utiliza la abundancia natural observada de cada elemento en la fórmula, convolucionando estas abundancias naturales para prever las proporciones isotópicas. Una forma de cuantificar estas similitudes isotópicas es mediante el cuadrado medio relativo de la diferencia entre un espectro de masas experimental y el patrón isotópico teórico de una fórmula molecular específica, conocido como mSigma[194]. En este contexto, a medida que el valor de mSigma aumenta, se observa una disparidad creciente entre los espectros teóricos y experimentales. Es importante señalar que no hay un valor único de mSigma que refleje de manera general la calidad de la identificación, ya que esto depende en gran medida de la intensidad de la fragmentación del ion y la resolución en la generación del espectro de masas correspondiente. No obstante, se ha establecido un límite superior general de mSigma igual a 50[195,196].

3. Análisis de la fragmentación in silico

Dentro del proceso de identificación, la complejidad no solo radica en encontrar la estructura molecular exacta que corresponda a un cierto analito, sino también en considerar su distribución estructural, que puede dar lugar a múltiples isómeros o reordenamientos, otorgando más de un nombre a dicha fórmula. Diversos softwares comparan la fragmentación experimental de la molécula con múltiples estructuras almacenadas en bibliotecas espectrales obtenidas mediante algoritmos de predicción[197]. Esta comparación no debe confundirse con una correspondencia directa con espectros másicos de referencia, obtenidos a través de experimentación previa con fuentes de detección, parámetros de ionización y métodos cromatográficos específicos. En este contexto, se evalúa la probabilidad de que la estructura propuesta genere los diferentes fragmentos predichos, mediante puntuaciones de similitud como mSigma o desviación en ppm. Se han establecido valores de tolerancia *in silico* análogos a los presentados en los puntos anteriores, siendo inferiores a 5 ppm y 50 mSigma.

4. Ubicación en el plano topográfico y redes de comparación

El plano topográfico se refiere a una representación bidimensional construida mediante los ejes de tiempo de retención y relación masa-carga. En este plano, se distribuyen todos los analitos detectados por el algoritmo AutoMS/MS, identificando la intensidad de cada uno a través de un código de colores o el tamaño de su representación. Esta representación facilita la detección rápida de compuestos de mayor y menor intensidad y la distribución de la polaridad y la densidad de analitos en diferentes secciones del plano. Como herramienta de validación, el plano topográfico contrasta el analito con el conjunto total de compuestos, comprobando si puede ser categorizado en un grupo previamente establecido, basándose en semejanzas estructurales que resultan en tiempos de retención y valores másicos similares.

Siguiendo la misma premisa, diversas herramientas estadísticas contrastan los espectros másicos de nuestro analito con el banco de analitos de la muestra o conjunto de ellas. De manera análoga al mapa topográfico, se realiza un análisis comparativo a través de redes que conectan

USC DE COMPOSTELA

nuestro analito con otros previamente identificados. Si el grupo de referencia pertenece a la misma familia de compuestos que contiene nuestra propuesta de identificación, se fortalece la validez de la propuesta.

5. Identificación

Los procesos de identificación, desde los puntos 1 hasta 4, son etapas que solo toman en cuenta una identificación sin objetivo propiamente dicha. Aunque los pasos 3 y 4 dependen de la generación de un banco de datos, estos se generan mediante el procesamiento previo de la muestra o mediante la predicción estadística de la fragmentación de diversas moléculas. Estas etapas pueden complementarse con una visión pseudo-untargeted, utilizando bibliotecas comerciales de analitos infusionados en el equipo de detección, bases de datos generales de compuestos o librerías espectrales. Sin embargo, completar las cuatro etapas del algoritmo proporciona información suficiente para asignar correctamente la identificación del analito en el análisis.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

BIBLIOGRAFÍA

[1] Shrinet K, Singh RK, Chaurasia AK, Tripathi A, Kumar A. Bioactive compounds and their future therapeutic applications. Natural Bioactive Compounds: Technological Advancements. Elsevier 2021:337–62. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820655-3.00017-3.

[2] Carbonell-Capella JM, Buniowska M, Barba FJ, Esteve MJ, Frígola A. Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. Comprehensive reviews in food science and food safety 2014;13:155–71. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12049.

[3] Samtiya M, Aluko RE, Dhewa T, Moreno-Rojas JM. Potential Health Benefits of Plant Food-Derived Bioactive Components: An Overview. Foods 2021;10. https://doi.org/10.3390/foods10040839.

[4] Lattanzio V. Phenolic compounds: Introduction. Natural Products. Springer 2013:1543–80. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_57.

[5] Harborne JB, Simmonds NW. The natural distribution of phenolic aglycones. Biochemistry of Phenolic Compounds. Academic Press 1964:77–128.

[6] Tsimogiannis D, Oreopoulou V. Classification of Phenolic Compounds in Plants. Polyphenols in Plants. Academic Press 2019:263–84. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00026-8.

[7] Knuth S, Abdelsalam R, Khayyal M, Schweda F, Heilmann J, Kees M, *et al.* Catechol is a bioactive metabolite of Willow bark. Planta Medica 2013;79:SL49. https://doi.org/10.1055/S-0033-1351875.

[8] Pizzimenti S, Muzio G, Barrera G, Giner RM, Ríos JL, Máñez S. Antioxidant Activity of Natural Hydroquinones. Antioxidants 2022;11:343. https://doi.org/10.3390/antiox11020343.

[9] Sütfeld R, Petereit F, Nahrstedt A. Resorcinol in exudates of *Nuphar lutea*. Journal of Chemical Ecology 1996;22:2221–31. https://doi.org/10.1007/BF02029542.

[10] Celaj O, Durán AG, Cennamo P, Scognamiglio M, Fiorentino A, Esposito A, *et al.* Phloroglucinols from Myrtaceae: attractive targets for structural characterization, biological properties and synthetic procedures. Phytochemistry Reviews 2020;20:259–99. https://doi.org/10.1007/S11101-020-09697-2.

[11] Vincente AR, Manganaris GA, Ortiz CM, Sozzi GO, Crisosto CH. Nutritional Quality of Fruits and Vegetables. Postharvest Handling: A Systems Approach. Academic Press 2014:69–122. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408137-6.00005-3.

[12] Chandrasekara A. Phenolic acids. Encyclopedia of Food Chemistry, Elsevier 2018:535–45. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22395-0.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[13] Popović-Djordjević JB, Katanić Stanković JS, Mihailović V, Akram M. Biochemistry and metabolism. Saffron. Academic Press 2021:1–40. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821219-6.00001-4.

[14] Charoonratana T. Composition of clove (*Syzygium aromaticum*) buds. Clove (*Syzygium Aromaticum*): Chemistry, Functionality and Applications. Academic Press 2022:11–35. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85177-0.00004-5.

[15] Isogai Y, Okamoto T, Koizumi T, Isogai Y, Okamoto T, Koizumi T. Studies on Plant Growth Regulators. I., Isolation of Indole-3-acetamide, 2-Phenylacetamide, and Indole-3-carboxaldehyde from Etiolated Seedlings of Phaseolus. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 1967;15:151–8. https://doi.org/10.1248/CPB.15.151.

[16] Wightman F, Lighty DL. Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in the shoots of higher plants. Physiologia Plantarum 1982;55:17–24. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1982.tb00278.x.

[17] Cook SD. An Historical Review of Phenylacetic Acid. Plant and Cell Physiology. 2019;60:243–54. https://doi.org/10.1093/pcp/pcz004.

[18] Abe H, Uchiyama M, Sato R. Isolation of Phenylacetic Acid and Its p-Hydroxy Derivative as Auxin-like Substances from *Undaria pinnatifida*. Agricultural and Biological Chemistry 1974;38:897–8. https://doi.org/10.1080/00021369.1974.10861257.

[19] Fries L, Āberg S. Morphogenetic Effects of Phenylacetic and p-OH-Phenylacetic Acid on the Green Alga *Enteromorpha compressa* (L.) GREV. in Axenic Culture. Zeitschrift Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 1978;88:383–8. https://doi.org/10.1016/s0044-328x(78)80253-0.

[20] Vuolo MM, Lima VS, Maróstica Junior MR. Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications. Woodhead Publishing 2019:33–50. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814774-0.00002-5.

[21] Principles of herbal pharmacology. Principles and Practice of Phytotherapy. Churchill Livingstone 2013:17–82. https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06992-5.00002-5.

[22] Atrahimovich D, Avni D, Khatib S. Flavonoids-Macromolecules Interactions in Human Diseases with Focus on Alzheimer, Atherosclerosis and Cancer. Antioxidants 2021;10:1–16. https://doi.org/10.3390/antiox10030423.

[23] Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. Journal of Nutritional Science 2016;5:1–15. https://doi.org/10.1017/jns.2016.41.

[24] Li D, Sun-Waterhouse D, Wang Y, Qiao X, Chen Y, Li F. Interactions of some common flavonoid antioxidants. Encyclopedia of Food Chemistry 2018:644–9. https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.21509-6.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[25] Liu S, Li X, Chen B, Ouyang X, Xie Y, Chen D. Phytophenol Dimerization Reaction: From Basic Rules to Diastereoselectivity and Beyond. Molecules 2022;27. https://doi.org/10.3390/molecules27154842.

[26] Vattem DA, Shetty K. Biological functionality of ellagic acid: a review. Journal of Food Biochemistry 2005;29:234–66. https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2005.00031.x.

[27] Amarowicz R, Janiak M. Hydrolysable tannins. Encyclopedia of Food Chemistry. Elsevier 2018:337–43. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21771-X.

[28] Dkhar P, Sharma R. Beneficial effects of nutraceuticals in healthy brain aging. Nutraceuticals in Brain Health and Beyond. Academic Press 2020:125–39. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820593-8.00009-4.

[29] Garcia-Conesa MT, Plumb GW, Kroon PA, Wallace G, Williamson G. Antioxidant properties of ferulic acid dimers. Redox Report 1997;3:239–44. https://doi.org/10.1080/13510002.1997.11747116.

[30] Haslam E, Cai Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. Natural Product Reports 1994;11:41–66. https://doi.org/10.1039/NP9941100041.

[31] Haslam E. Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge University Press 1998.

[32] Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. Angewandte Chemie International Edition 2011;50:586–621. https://doi.org/10.1002/ANIE.201000044.

[33] Huang Q, Liu X, Zhao G, Hu T, Wang Y. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. Animal Nutrition 2018;4:137–50. https://doi.org/10.1016/J.ANINU.2017.09.004.

[34] Rauf A, Imran M, Abu-Izneid T, Iahtisham-Ul-Haq, Patel S, Pan X, *et al.* Proanthocyanidins: A comprehensive review. Biomedicine & Pharmacotherapy 2019;116:108999. https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.108999.

[35] García-Villalba R, González-Sarrías A, Giménez-Bastida JA, Selma M V., Espín JC, Tomás-Barberán FA. Metabolism of Dietary (Poly)phenols by the Gut Microbiota. Comprehensive Gut Microbiota 2022;3:149–75. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819265-8.00091-7.

[36] Nazzaro F, Fratianni F, De Feo V, Battistelli A, Da Cruz AG, Coppola R. Polyphenols, the new frontiers of prebiotics. Advances in Food and Nutrition Research. Elsevier 2020;94:35–89. https://doi.org/10.1016/BS.AFNR.2020.06.002.

[37] Charoensiddhi S, Abraham RE, Su P, Zhang W. Seaweed and seaweed-derived metabolites as prebiotics. Advances in Food and Nutrition Research. Elsevier 2020;91:97–156. https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.10.001.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[38] Singh IP, Sidana J. Phlorotannins. Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals. Woodhead Publishing 2013:181–204. https://doi.org/10.1533/9780857098689.1.181.

[39] Kanatt SR. Antioxidants from the red algae *Kappaphycus alvarezii*. Marine Antioxidants: Preparations, Syntheses, and Applications. Academic Press 2022:457–72. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95086-2.00001-1.

[40] Margarida Martins M, Carvalheiro F, Gírio F. An overview of lignin pathways of valorization: from isolation to refining and conversion into value-added products. Biomass Conversion and Biorefinery 2022;14:3183–207. https://doi.org/10.1007/S13399-022-02701-Z.

[41] Ergüden B. Phenol group of terpenoids is crucial for antibacterial activity upon ion leakage. Letters in Applied Microbiology 2021;73:438–45. https://doi.org/10.1111/LAM.13529.

[42] Stasiuk M, Kozubek A. Biological activity of phenolic lipids. Cellular and Molecular Life Sciences 2010;67:841–60. https://doi.org/10.1007/S00018-009-0193-1.

[43] Hadacek F. Phenolic Lipids in Plants: Functional Diversity of. Encyclopedia of Lipidomics. Springer 2017:1–4. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7864-1_136-1.

[44] Deng GF, Xu XR, Li S, Li F, Wu S, Li H Bin. Natural Antioxidants In Foods. Phytochemicals: Occurrence in Nature, Health Effects and Antioxidant Properties. Academic Press 2003:335–42. https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00472-5.

[45] Kaczor A, Baranska M, Czamara K. Carotenoids. Nutrition: Therapy, Spectroscopy and Technology. Wiley 2016:1–13. https://doi.org/10.1002/9781118622223.CH1.

[46] Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. Molecular Aspects of Medicine 2003;24:345–51. https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X.

[47] Bhatt T, Patel K. Carotenoids: Potent to Prevent Diseases Review. Natural Products and Bioprospecting 2020;10:109–17. https://doi.org/10.1007/S13659-020-00244-2.

[48] Mezzomo N, Ferreira SRS. Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: A review. Journal of Chemistry 2016;2016. https://doi.org/10.1155/2016/3164312.

[49] Gebregziabher BS, Gebremeskel H, Debesa B, Ayalneh D, Mitiku T, Wendwessen T, *et al.* Carotenoids: Dietary sources, health functions, biofortification, marketing trend and affecting factors – A review. Journal of Agriculture and Food Research 2023;14:100834. https://doi.org/10.1016/J.JAFR.2023.100834.

[50] Raven JA, Giordano M. Algae. Current Biology 2014;24:R590–5. https://doi.org/10.1016/J.CUB.2014.05.039.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[51] Chapman RL. Algae: The world's most important "plants"-an introduction. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change 2013;18:5–12. https://doi.org/10.1007/S11027-010-9255-9.

[52] Wehr JD, Sheath RG, Kociolek JP. Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification. Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification 2015:1–1050. https://doi.org/10.1016/C2010-0-66664-8.

[53] Prescott G. Algae of the western Great Lakes area. WM. C. Brown Company Publishers 1951.

[54] Wehr J, Janse van Vuuren S. Algae and Cyanobacteria Communities. Wetzel's Limnology: Lake and River Ecosystems, Academic Press 2024:463–510. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822701-5.00017-3.

[55] Guiry MD. How many species of algae are there? Journal of Phycology 2012;48:1057–63. https://doi.org/10.1111/J.1529-8817.2012.01222.X.

[56] Day JG, Benson EE, Fleck RA. In vitro culture and conservation of microalgae: Applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 1999;35:127–36. https://doi.org/10.1007/S11627-999-0022-0.

[57] Ferreira de Oliveira AP, Bragotto APA. Microalgae-based products: Food and public health. Future Foods 2022;6:100157. https://doi.org/10.1016/J.FUFO.2022.100157.

[58] Oslan SNH, Shoparwe NF, Yusoff AH, Rahim AA, Chang CS, Tan JS, *et al.* A Review on *Haematococcus pluvialis* Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin. Biomolecules 2021;11:1–15. https://doi.org/10.3390/BIOM11020256.

[59] Niizawa I, Espinaco BY, Zorrilla SE, Sihufe GA. Astaxanthin production by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis*: A success story. Global Perspectives on Astaxanthin: From Industrial Production to Food, Health, and Pharmaceutical Applications. Academic Press 2021:71–89. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823304-7.00005-2.

[60] Kim B, Youn Lee S, Lakshmi Narasimhan A, Kim S, Oh YK. Cell disruption and astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis*: Recent advances. Bioresource Technology 2022;343:126124. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.126124.

[61] Nitsos C, Filali R, Taidi B, Lemaire J. Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review. Biotechnology Advances 2020;45:107650. https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2020.107650.

[62] Aye Myint A, Hariyanto P, Irshad M, Ruqian C, Wulandari S, Eui Hong M, *et al.* Strategy for high-yield astaxanthin recovery directly from wet *Haematococcus pluvialis*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

without pretreatment. Bioresource Technology 2022;346:126616. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.126616.

[63] Littler MM, Littler DS. Algae-macro. Encyclopedia of Earth Sciences Series. Springer 2011;Part 2:30–8. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2639-2_36.

[64] Wehr JD, Sheath RG. Introduction to freshwater algae. Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification. Academic Press 2003:1–9. https://doi.org/10.1016/B978-012741550-5/50002-7.

[65] Pliński M 1943-, Surosz W, Złoch I. Chlorophytes and Charophytes from the Gulf of Gdansk and sourrounding waters (the Southern Baltic Sea) : a key to identification of the species. Gdańsk University Press 2022.

[66] Stiger-Pouvreau V, Bourgougnon N, Deslandes E. Carbohydrates From Seaweeds. Seaweed in Health and Disease Prevention. Academic Press 2016:223–74. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802772-1.00008-7.

[67] Guiry MD. How many species of algae are there? A reprise. Four kingdoms, 14 phyla, 63 classes and still growing. J Phycol 2024. https://doi.org/10.1111/JPY.13431.

[68] Putra NR, Fajriah S, Qomariyah L, Dewi AS, Rizkiyah DN, Irianto I, *et al.* Exploring the potential of *Ulva Lactuca*: Emerging extraction methods, bioactive compounds, and health applications – A perspective review. South African Journal of Chemical Engineering 2024;47:233–45. https://doi.org/10.1016/J.SAJCE.2023.11.017.

[69] Stuthmann LE, Du HT, Brix da Costa B, Kunzmann A, Springer K. Sea grape (*Caulerpa lentillifera*) aquaculture in Van Phong Bay, Viet Nam: Evaluation of the post-harvest quality. Journal of Applied Phycology 2023;1:1–12. https://doi.org/10.1007/S10811-023-03030-Y.

[70] Aroyehun AQB, Razak SA, Palaniveloo K, Nagappan T, Rahmah NSN, Jin GW, *et al.* Bioprospecting Cultivated Tropical Green Algae, *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh: A Perspective on Nutritional Properties, Antioxidative Capacity and Anti-Diabetic Potential. Foods 2020;9. https://doi.org/10.3390/FOODS9091313.

[71] Nagaraj SR, Osborne JW. Bioactive compounds from *Caulerpa racemosa* as a potent larvicidal and antibacterial agent. Front Biol 2014;9:300–5. https://doi.org/10.1007/S11515-014-1312-4.

[72] Swathi N, Kumar AG, Parthasarathy V, Sankarganesh P. Isolation of *Enteromorpha* species and analyzing its crude extract for the determination of in vitro antioxidant and antibacterial activities. Biomass Conversion and Biorefinery 2022;14:3753–62. https://doi.org/10.1007/S13399-022-02591-1.

[73] Stabili L, Acquaviva MI, Angilé F, Cavallo RA, Cecere E, Del Coco L, *et al.* Screening of *Chaetomorpha linum* Lipidic Extract as a New Potential Source of Bioactive Compounds. Marine Drugs 2019;17:313. https://doi.org/10.3390/MD17060313.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[74] Haq SH, Al-Ruwaished G, Al-Mutlaq MA, Naji SA, Al-Mogren M, Al-Rashed S, *et al.* Antioxidant, Anticancer Activity and Phytochemical Analysis of Green Algae, *Chaetomorpha* Collected from the Arabian Gulf. Scientific Reports 2019;9. https://doi.org/10.1038/S41598-019-55309-1.

[75] Minhas A, Kaur B, Kaur J. Genomics of algae: Its challenges and applications. Pan-Genomics: Applications, Challenges, and Future Prospects. Academic Press 2020:261–83. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817076-2.00013-5.

[76] Sheath RG, Vis ML. Red Algae. Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification. Academic Press 2015:237–64. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385876-4.00005-0.

[77] Mohamed Hatha AA, Sumayya NS. Antioxidants from marine cyanobacteria. Marine Antioxidants: Preparations, Syntheses, and Applications. Academic Press 2023:119–31. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95086-2.00010-2.

[78] Bito T, Teng F, Watanabe F. Bioactive Compounds of Edible Purple Laver *Porphyra sp*. (Nori). Journal of Agricultural and Food Chemistry 2017;65:10685–92. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.7B04688.

[79] Stévant P, Schmedes PS, Le Gall L, Wegeberg S, Dumay J, Rebours C. Concise review of the red macroalga dulse, *Palmaria palmata* (L.) Weber & Mohr. Journal of Applied Phycology 2023;35:523–50. https://doi.org/10.1007/S10811-022-02899-5.

[80] Bourgougnon N, Burlot AS, Jacquin AG. Algae for global sustainability? Advances in Botanical Research. Elsevier 2021;100:145–212. https://doi.org/10.1016/BS.ABR.2021.01.003.

[81] Yuan Y V., Bone DE, Carrington MF. Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro. Food Chemistry 2005;91:485–94. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2004.04.039.

[82] Schneider G, Figueroa FL, Vega J, Chaves P, Álvarez-Gómez F, Korbee N, *et al.* Photoprotection properties of marine photosynthetic organisms grown in high ultraviolet exposure areas: Cosmeceutical applications. Algal Research 2020;49:101956. https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2020.101956.

[83] Egilsdottir H, Olafsson J, Martin S. Photosynthesis and calcification in the articulated coralline alga *Ellisolandia elongata* (Corallinales, Rhodophyta) from intertidal rock pools. European Journal of Phycology 2016;51:59–70. https://doi.org/10.1080/09670262.2015.1101165.

[84] Ragazzola F, Marchini A, Adani M, Bordone A, Castelli A, Cerrati G, *et al.* An intertidal life: Combined effects of acidification and winter heatwaves on a coralline alga (*Ellisolandia elongata*) and its associated invertebrate community. Marine Environmental Research 2021;169. https://doi.org/10.1016/J.MARENVRES.2021.105342.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[85] El Haïkali B, Bensoussan N, Romano JC, Bousquet V. Estimation of photosynthesis and calcification rates of *Corallina elongata* Ellis and Solander, 1786, by measurements of dissolved oxygen, pH and total alkalinity. Scientia Marina 2004;68:45–56. https://doi.org/10.3989/SCIMAR.2004.68N145.

[86] Ragazzola F, Raiteri G, Fabbri P, Scafè M, Florio M, Nannini M, *et al.* Structural integrity of *Ellisolandia elongata* reefs: A mechanical approach to compare tensile strengths in natural and controlled environments. Marine Ecology 2017;38. https://doi.org/10.1111/MAEC.12455.

[87] Bouhraoua J, Lakhdar F, Mabrouki S, Assobhei O, Etahiri S. Fungal Growth Inhibition of *Bipolaris sorokiniana* Causal Agent of Wheat Diseases and Activating Defense Systems of Plants Using Algae Extracts. Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries 2023;27:1093–113.

[88] Mohy El-Din SM, El-Ahwany AMD. Bioactivity and phytochemical constituents of marine red seaweeds (*Jania rubens, Corallina mediterranea and Pterocladia capillacea*). Journal of Taibah University for Science 2016;10:471–84. https://doi.org/10.1016/J.JTUSCI.2015.06.004.

[89] Willerth S. Natural biomaterials for engineering neural tissue from stem cells. Engineering Neural Tissue from Stem Cells. Academic Press 2017:89–125. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811385-1.00005-4.

[90] Wehr JD. Brown algae. Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification. Academic Press 2003:757–73. https://doi.org/10.1016/B978-012741550-5/50023-4.

[91] Tojčić I, Denamiel C, Vilibić I. Kilometer-scale trends, variability, and extremes of the Adriatic far-future climate (RCP 8.5, 2070−2100). Frontiers in Marine Science 2024;11:1329020. https://doi.org/10.3389/FMARS.2024.1329020.

[92] Polo LK, Chow F. Physiological performance by growth rate, pigment and protein content of the brown seaweed *Sargassum filipendula* (Ochrophyta: Fucales) induced by moderate UV radiation exposure in the laboratory. Scientia Marina 2020;84:59–70. https://doi.org/10.3989/SCIMAR.04982.22A.

[93] Zavodnik N. Studies on phenolic content of some brown algae from Adriatic sea. International Seaweed Symposium (Xth): Proceedings. Göteborg 1980:543–8. https://doi.org/10.1515/9783110865271-071.

[94] 12th International Phycological Congress. Phycologia 2021;60:1–153. https://doi.org/10.1080/00318884.2021.1922050.

[95] Gledhill D. The nature of the problem. A rose: by any name?. The Names of Plants. Cambridge 2008;4.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[96] Thibaut T, Blanfuné A, Verlaque M, Boudouresque CF, Ruitton S. The *Sargassum conundrum*: very rare, threatened or locally extinct in the NW Mediterranean and still lacking protection. Hydrobiologia 2016;781:3–23. https://doi.org/10.1007/S10750-015-2580-Y.

[97] Mohy El-Din SM, Alagawany NI. Phytochemical Constituents and Anticoagulation Property of Marine Algae *Gelidium crinale, Sargassum hornschuchii* and *Ulva linza*. Thalassas: An International Journal of Marine Sciences 2019;35:381–97. https://doi.org/10.1007/S41208-019-00142-6.

[98] Alghazeer R, Azwai S, Garbaj AM, Amr A, Elghmasi S, Sidati M, *et al.* Alkaloids Rich Extracts from Brown Algae Against Multidrug-Resistant Bacteria by Distinctive Mode of Action. Arabian Journal for Science and Engineering 2022;47:179–88. https://doi.org/10.1007/S13369-021-05592-W.

[99] Obando JMC, dos Santos TC, Bernardes M, Nascimento N, Villaça RC, Teixeira VL, *et al.* Chemical variation and analysis of diterpenes from seaweed *Dictyota menstrualis* under controlled conditions. Algal Research 2022;62:102637. https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2022.102637.

[100] Montgomery BL. Seeing new light: recent insights into the occurrence and regulation of chromatic acclimation in cyanobacteria. Current Opinion in Plant Biology 2017;37:18–23. https://doi.org/10.1016/J.PBI.2017.03.009.

[101] Imran M, Iqbal A, Badshah SL, Sher AA, Ullah H, Ayaz M, *et al.* Chemical and Nutritional Profiling of the Seaweed *Dictyota dichotoma* and Evaluation of Its Antioxidant, Antimicrobial and Hypoglycemic Potentials. Marine Drugs 2023;21. https://doi.org/10.3390/MD21050273.

[102] Iveša L, Bilajac A, Gljušćić E, Najdek M. *Gongolaria barbata* forest in the shallow lagoon on the southern Istrian Coast (northern Adriatic Sea). Botanica Marina 2022;65:255–68. https://doi.org/10.1515/BOT-2022-0021.

[103] Trikka F, Israel P, Koukaras K, Argiriou A. Biochemical characterization of eight Greek algae as candidate species for local seaweed cultivation. Botanica Marina 2021;64:313–26. https://doi.org/10.1515/BOT-2021-0006.

[104] Mannino A, Vaglica V, Oddo E. Seasonal variation in total phenolic content of *Dictyopteris polypodioides (Dictyotaceae)* and *Cystoseira amentacea* (*Sargassaceae*) from the Sicilian coast. Flora Mediterranea 2014;24:39–50. https://doi.org/10.7320/FlMedit24.039.

[105] García PA, Hernández AP, San Feliciano A, Castro MAA. Bioactive prenyl- and terpenyl-quinones/Hydroquinones of marine origin. Marine Drugs 2018;16. https://doi.org/10.3390/md16090292.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[106] Kosanić M, Ranković B, Stanojković T. Biological potential of marine macroalgae of the genus *Cystoseira*. Acta Biologica Hungarica 2015;66:374–84. https://doi.org/10.1556/018.66.2015.4.2.

[107] Ajayi TO. Biomimicry: the nexus for achieving sustainability in the people-process-planet relationship. Heliyon 2023;9:e16180. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16180.

[108] Desrochers P. Learning from history or from nature or both?: recycling networks and their metaphors in early industrialisation. Progress in Industrial Ecology 2005;2:19–34. https://doi.org/10.1504/PIE.2005.006777.

[109] Efrati B, Barkai R, Cesaro SN, Venditti F. Function, life histories, and biographies of Lower Paleolithic patinated flint tools from Late Acheulian Revadim, Israel. Scientific Reports 2022;12:1–21. https://doi.org/10.1038/s41598-022-06823-2.

[110] Lavelli V, Gallotti F, Pedrali D. Application of compounds from grape processing by-products: Formulation of dietary fiber and encapsulated bioactive compounds. Food Waste Recovery: Processing Technologies, Industrial Techniques, and Applications, Academic Press 2020:355–66. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820563-1.00010-X.

[111] Moreno AD, Ballesteros M, Negro MJ. Biorefineries for the valorization of food processing waste. The Interaction of Food Industry and Environment, Academic Press; 2020:155–90. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816449-5.00005-9.

[112] Beres C, Costa GNS, Cabezudo I, da Silva-James NK, Teles ASC, Cruz APG, *et al.* Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. Waste Management 2017;68:581–94. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017.

[113] Socas-Rodríguez B, Álvarez-Rivera G, Valdés A, Ibáñez E, Cifuentes A. Food by-products and food wastes: are they safe enough for their valorization? Trends in Food Science & Technology 2021;114:133–47. https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.05.002.

[114] Olejar KJ, Ricci A, Swift S, Zujovic Z, Gordon KC, Fedrizzi B, *et al.* Characterization of an antioxidant and antimicrobial extract from cool climate, white grape marc. Antioxidants 2019;8. https://doi.org/10.3390/antiox8070232.

[115] Bocsan IC, Măgureanu DC, Pop RM, Levai AM, Macovei Ștefan O, Pătrașca IM, *et al.* Antioxidant and Anti-Inflammatory Actions of Polyphenols from Red and White Grape Pomace in Ischemic Heart Diseases. Biomedicines 2022;10. https://doi.org/10.3390/biomedicines10102337.

[116] Özkan G, Sagdiç O, Baydar NG, Kurumahmutoglu Z. Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. Journal of the Science of Food and Agriculture 2004;84:1807–11. https://doi.org/10.1002/JSFA.1901.

[117] Rama J-LR, Mallo N, Biddau M, Fernandes F, De Miguel T, Sheiner L, *et al.* Exploring the powerful phytoarsenal of white grape marc against bacteria and parasites causing

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

significant diseases. Environmental Science and Pollution Research 2021;28:2470-278 https://doi.org/10.1007/s11356-019-07472-1.

[118] Caponio GR, Minervini F, Tamma G, Gambacorta G, De Angelis M. Promising Application of Grape Pomace and Its Agri-Food Valorization: Source of Bioactive Molecules with Beneficial Effects. Sustainability 2023;15:9075. https://doi.org/10.3390/SU15119075.

[119] Castellanos-Gallo L, Ballinas-Casarrubias L, Espinoza-Hicks JC, Hernández-Ochoa LR, Muñoz-Castellanos LN, Zermeño-Ortega MR, *et al.* Grape Pomace Valorization by Extraction of Phenolic Polymeric Pigments: A Review. Processes 2022;10:469. https://doi.org/10.3390/PR10030469.

[120] Alvarez-Casas M, Pájaro M, Lores M, Garcia-Jares C. Characterization of grape marcs from native and foreign white varieties grown in northwestern Spain by their polyphenolic composition and antioxidant activity. European Food Research and Technology 2016;242:655–65. https://doi.org/10.1007/S00217-015-2573-0.

[121] Teixeira A, Eiras-Dias J, Castellarin SD, Gerós H. Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. International Journal of Molecular Sciences 2013;14:18711–39. https://doi.org/10.3390/IJMS140918711.

[122] García-Marino M, Rivas-Gonzalo JC, Ibáñez E, García-Moreno C. Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. Analytica Chimica Acta 2006;563:44–50. https://doi.org/10.1016/J.ACA.2005.10.054.

[123] Silvan JM, Gutiérrez-Docio A, Moreno-Fernandez S, Alarcón-Cavero T, Prodanov M, Martinez-Rodriguez AJ. Procyanidin-Rich Extract from Grape Seeds as a Putative Tool against *Helicobacter pylori*. Foods 2020;9:1370. https://doi.org/10.3390/FOODS9101370.

[124] Niedzwiecki A, Roomi MW, Kalinovsky T, Rath M. Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. Nutrients 2016;8. https://doi.org/10.3390/NU8090552.

[125] Han X, Shen T, Lou H. Dietary polyphenols and their biological significance. International Journal of Molecular Sciences 2007;8:950–88. https://doi.org/10.3390/I8090950.

[126] Ghouila Z, Laurent S, Boutry S, Vander Elst L, Nateche F, Muller RN, *et al.* Antioxidant, antibacterial and cell toxicity effects of polyphenols *Fromahmeur bouamer* grape seed extracts. Journal of Fundamental and Applied Sciences 2017;9:392. https://doi.org/10.4314/JFAS.V9I1.24.

[127] Martinez-Micaelo N, González-Abuín N, Ardèvol A, Pinent M, Blay MT. Procyanidins and inflammation: Molecular targets and health implications. BioFactors 2012;38:257–65. https://doi.org/10.1002/BIOF.1019.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[128] Unusan N. Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry. Journal of Functional Foods 2020;67:103861. https://doi.org/10.1016/J.JFF.2020.103861.

[129] Barker SA, Long AR, Short CR. A New Approach to Tissue Residue Analyses. Proceedings of the 6th Biennial Symposium of the American Academy of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 1988: 55–6.

[130] Barker SA, Hsieh LC, Short CR. Methodology for the analysis of fenbendazole and its metabolites in plasma, urine, feces, and tissue homogenates. Analytical Biochemistry 1986;155:112–8. https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90234-4.

[131] Long AR, Hsieh LC, Malbrough MS, Short CR, Barker SA. Matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and liquid chromatographic determination of five benzimidazole anthelmintics in pork muscle tissue. Journal of Food Composition and Analysis 1990;3:20–6. https://doi.org/10.1016/0889-1575(90)90005-7.

[132] Long AR, Hsieh LC, Malbrough MS, Short CR, Barker SA, Bello AC. Method for the Isolation and Liquid Chromatographic Determination of Chloramphenicol in Milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1990;38:427–9. https://doi.org/10.1021/JF00092A019

[133] Long AR, Hsieh LC, Malbrough MS, Short CR, Barker SA. Multiresidue Method for Isolation and Liquid Chromatographic Determination of Seven Benzimidazole Anthelmintics in Milk. Journal of Association of Official Analytical Chemists 1989;72:739–41. https://doi.org/10.1093/JAOAC/72.5.739.

[134] Barker SA, Long AR, Short CR. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. Journal of Chromatography A 1989;475:353–61. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)89689-8.

[135] Aguín ML, Jares CG, Casas MA, Llompart M. Extracto polifenólico a partir de residuos de uva blanca, Patent Number: 2443547B2 Oficina Española de Patentes y Marcas, Spain, 2012:1–18.

[136] Kua YL, Gan S, Morris A, Ng HK. Ethyl lactate as a potential green solvent to extract hydrophilic (polar) and lipophilic (non-polar) phytonutrients simultaneously from fruit and vegetable by-products. Sustainable Chemistry and Pharmacy 2016;4:21–31. https://doi.org/10.1016/J.SCP.2016.07.003.

[137] Lores M, Pájaro M, Álvarez-Casas M, Domínguez J, García-Jares C. Use of ethyl lactate to extract bioactive compounds from *Cytisus scoparius*: Comparison of pressurized liquid extraction and medium scale ambient temperature systems. Talanta 2015;140:134–42. https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2015.03.034.

[138] Gato E, Rosalowska A, Martínez-Guitián M, Lores M, Bou G, Pérez A. Anti-adhesive activity of a *Vaccinium corymbosum* polyphenolic extract targeting intestinal

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

colonization by *Klebsiella pneumoniae*. Biomedicine & Pharmacotherapy 2020;132:110885. https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110885.

[139] Gato E, Perez A, Rosalowska A, Celeiro M, Bou G, Lores M. Multicomponent polyphenolic extracts from *vaccinium corymbosum* at lab and pilot scale. Characterization and effectivity against nosocomial pathogens. Plants 2021;10:2801. https://doi.org/10.3390/PLANTS10122801.

[140] Manso T, Lores M, Rama JLR, Villarino RA, Calvo LG, Castillo A, *et al.* Antibacterial Activity against Clinical Strains of a Natural Polyphenolic Extract from Albariño White Grape Marc. Pharmaceuticals 2023;16. https://doi.org/10.3390/PH16070950.

[141] Calvo LG, Castillo A, Villarino RA, Rama JLR, Abril AG, de Miguel T. Study of the Antibacterial Activity of Rich Polyphenolic Extracts Obtained from *Cytisus scoparius* against Foodborne Pathogens. Antibiotics 2023;12:1645. https://doi.org/10.3390/antibiotics12111645.

[142] Seetharam R, Sharma SK. Purification and analysis of recombinant proteins. Bioprocess technology 1991;12:3-315.

[143] Mussatto SI. Generating Biomedical Polyphenolic Compounds from Spent Coffee or Silverskin. Coffee in Health and Disease Prevention. Academic Press 2015:93–106. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00011-5.

[144] Azelee NIW, Noor NM, Rasid ZIA, Suhaimi SH, Salamun N, Jasman SM, *et al.* Marine waste for nutraceutical and cosmeceutical production. Valorization of Wastes for Sustainable Development 2023:241–72. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95417-4.00010-X.

[145] García-Oms S, Sánchez-Bonet D, Belda-Antolí M, Padrón-Sanz C, Lloris-Carsi JM, Cejalvo-Lapeña D. Optimisation of a green ultrasound-assisted extraction (UAE) methodology for obtaining maximum antioxidant activity from red algae and determination of the co-extracted compounds. Journal of Applied Phycology 2023:1–12. https://doi.org/10.1007/S10811-023-03157-Y.

[146] Rubio L, Valiño M del C, Expósito MJ, Lores M, Garcia-Jares C. Sourcing New Ingredients for Organic Cosmetics: Phytochemicals of *Filipendula vulgaris* Flower Extracts. Cosmetics 2022;9:132. https://doi.org/10.3390/COSMETICS9060132.

[147] Skoko AMG, Šarkanj B, Lores M, Celeiro M, Babojelić MS, Kamenjak D, *et al.* Identification and Quantification of Polyphenols in Croatian Traditional Apple Varieties. Plants 2022;11:3540–3540. https://doi.org/10.3390/PLANTS11243540.

[148] Carreira-Casais A, Otero P, Garcia-Perez P, Garcia-Oliveira P, Pereira AG, Carpena M, *et al.* Benefits and Drawbacks of Ultrasound-Assisted Extraction for the Recovery of Bioactive Compounds from Marine Algae. International Journal of Environmental Research and Public Health 2021;18:9153. https://doi.org/10.3390/IJERPH18179153.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[149] Thilakarathna RCN, Siow LF, Tang TK, Lee YY. A review on application of ultrasound and ultrasound assisted technology for seed oil extraction. Journal of Food Science and Technology 2023;60:1222–36. https://doi.org/10.1007/S13197-022-05359-7.

[150] Liao J, Zheng N, Qu B. An Improved Ultrasonic-Assisted Extraction Method by Optimizing the Ultrasonic Frequency for Enhancing the Extraction Efficiency of Lycopene from Tomatoes. Food Analytical Methods 2016;9:2288–98. https://doi.org/10.1007/S12161-016-0419-4.

[151] Piñeiro Z, Guerrero RF, Fernández-Marin MI, Cantos-Villar E, Palma M. Ultrasound-assisted extraction of stilbenoids from grape stems. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2013;61:12549–56. https://doi.org/10.1021/JF4030129.

[152] Nguyen LN, Vu MT, Vu HP, Mohammed JAH, Pathak N, Nghiem LD, *et al.* Seaweed carrageenans: Productions and applications. Algae-Based Biomaterials for Sustainable Development 2022:67–80. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-96142-4.00001-4.

[153] Pingret D, Fabiano-Tixier AS, Chemat F. Accelerated Methods for Sample Preparation in Food. Comprehensive Sampling and Sample Preparation 2012:441–55. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00143-5.

[154] Carreira-Casais A, Carpena M, Pereira AG, Chamorro F, Soria-Lopez A, Perez PG, *et al.* Critical Variables Influencing the Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds—A Review. Chemistry Proceedings 2021;5:50. https://doi.org/10.3390/CSAC2021-10562.

[155] Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. American Journal of Enology and Viticulture 1965;16:144-158 https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144.

[156] Olmo-García L, Monasterio RP, Bajoub A, Carrasco-Pancorbo A. Analytical Strategies for Determining Polyphenols in Foods and Biological Samples. Dietary Polyphenols 2020:85–128. https://doi.org/10.1002/9781119563754.CH3.

[157] Pérez M, Dominguez-López I, Lamuela-Raventós RM. The Chemistry Behind the Folin-Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2023;71:17543–53. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.3C04022.

[158] Olechno E, Puścion-Jakubik A, Markiewicz-żukowska R, Socha K. Impact of Brewing Methods on Total Phenolic Content (TPC) in Various Types of Coffee. Molecules 2020;25. https://doi.org/10.3390/MOLECULES25225274.

[159] Figueiredo-González M, Olmo-García L, Reboredo-Rodríguez P, Serrano-García I, Leuyacc-Del Carpio G, Cancho-grande B, *et al.* Singular Olive Oils from a Recently Discovered Spanish North-Western Cultivar: An Exhaustive 3-Year Study of Their Chemical Composition and In-Vitro Antidiabetic Potential. Antioxidants 2022;11. https://doi.org/10.3390/ANTIOX11071233.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[160] Garcia-Jares C, Vazquez A, Lamas JP, Pajaro M, Alvarez-Casas M, Lores M. Antioxidant White Grape Seed Phenolics: Pressurized Liquid Extracts from Different Varieties. Antioxidants 2015;4:737–49. https://doi.org/10.3390/ANTIOX4040737.

[161] Celeiro M, Lamas JP, Arcas R, Lores M. Wood processing industry by-products as a source of natural bioactive compounds. Energy & Environment 2020;32:981–1001. https://doi.org/10.1177/0958305X20919939.

[162] Dominguez-López I, Pérez M, Lamuela-Raventós RM, Dominguez-lópez inés, lamuela-Raventós RM. Total (poly)phenol analysis by the Folin-Ciocalteu assay as an anti-inflammatory biomarker in biological samples. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2023. https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2220031.

[163] Chen LY, Cheng CW, Liang JY. Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. Food Chemistry 2015;170:10–5. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.08.038.

[164] Rover MR, Brown RC. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 2013;104:366–71. https://doi.org/10.1016/j.jaap.2013.06.011.

[165] Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005;53:4290–302. https://doi.org/10.1021/JF0502698.

[166] Pinchuk I, Shoval H, Dotan Y, Lichtenberg D. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. Chemistry and Physics of Lipids 2012;165:638–47. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2012.05.003.

[167] Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005;53:1841–56. https://doi.org/10.1021/JF030723C.

[168] Garg A, Sharma R, Dey P, Kumar A. Food auto-oxidation: An overview. Antioxidants Effects in Health. Elsevier 2022:43–68. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819096-8.00013-6.

[169] Gonçalves AC, Bento C, Jesus F, Alves G, Silva LR. Sweet Cherry Phenolic Compounds: Identification, Characterization, and Health Benefits. Studies in Natural Products Chemistry 2018;59:31–78. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00002-5.

[170] Xiao F, Xu T, Lu B, Liu R. Guidelines for antioxidant assays for food components. Food Frontiers 2020;1:60–9. https://doi.org/10.1002/FFT2.10.

[171] Echegaray N, Pateiro M, Munekata PES, Lorenzo JM, Chabani Z, Farag MA, *et al.* Measurement of Antioxidant Capacity of Meat and Meat Products: Methods and

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Applications. Molecules 2021;26:3880. https://doi.org/10.3390/MOLECULES26133880.

[172] Wolfenden BS, Willson RL. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of ono-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2′-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2 1982:805–12. https://doi.org/10.1039/P29820000805.

[173] Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. Clinical Science 1993;84:407–12. https://doi.org/10.1042/CS0840407.

[174] Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. FEBS Letters 1996;384:240–2. https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00323-7.

[175] Rojas J, Buitrago A. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Biosynthesized by Plants and Its Relationship With Prevention of Neurodegenerative Diseases. Bioactive Compounds. Woodhead Publishing 2019:3–31. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00001-3.

[176] Dorsey BM, Jones MA. Healthy components of coffee processing by-products. Handbook of Coffee Processing By-Products. Academic Press 2017:27–62. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811290-8.00002-5.

[177] Skoog DA. Fundamentos de quimica analitica. Reverté 2008.

[178] Scheer H. Diode array detection in liquid chromatography. Methods Enzymol. Elsevier 1995;246:749–58. https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)46032-2.

[179] Gross JH. Mass Spectrometry. Springer 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54398-7.

[180] Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, *et al.* Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. Clinical Biochemist Reviews 2003;24:3.

[181] Alvarez-Rivera G, Ballesteros-Vivas D, Parada-Alfonso F, Ibañez E, Cifuentes A. Recent applications of high resolution mass spectrometry for the characterization of plant natural products. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2019;112:87–101. https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2019.01.002.

[182] Giorgi G. Mass spectrometry and high resolution mass spectrometry: An overview. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. Springer 2017:89–101. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1113-3_5.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[183] Dubrovskii Y, Krivul'ko T, Gavrilenko L, Solovyev N. Targeted proteomics for the analysis of cultural heritage: application of broadband collision-induced dissociation mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2022;414:1723–37. https://doi.org/10.1007/S00216-021-03805-7.

[184] Tzachristas A, Dasenaki ME, Aalizadeh R, Thomaidis NS, Proestos C. Development of a Wine Metabolomics Approach for the Authenticity Assessment of Selected Greek Red Wines. Molecules 2021;26:2837. https://doi.org/10.3390/MOLECULES26102837.

[185] Dasenaki ME, Drakopoulou SK, Aalizadeh R, Thomaidis NS. Targeted and Untargeted Metabolomics as an Enhanced Tool for the Detection of Pomegranate Juice Adulteration. Foods 2019;8:212. https://doi.org/10.3390/FOODS8060212.

[186] Li J, Smith LS, Zhu HJ. Data-independent acquisition (DIA): an emerging proteomics technology for analysis of drug-metabolizing enzymes and transporters. Drug Discovery Today: Technologies 2021;39:49. https://doi.org/10.1016/J.DDTEC.2021.06.006.

[187] Liu H, Yang L, Khainovski N, Dong M, Hall SC, Fisher SJ, *et al.* Automated iterative MS/MS acquisition: A tool for improving efficiency of protein identification using a LC-MALDI MS workflow. Analytical Chemistry 2011;83:6286–93. https://doi.org/10.1021/AC200911V.

[188] Calderón-Santiago M, Priego-Capote F, Luque De Castro MD. Enhanced detection and identification in metabolomics by use of LC-MS/MS untargeted analysis in combination with gas-phase fractionation. Analytical Chemistry 2014;86:7558–65. https://doi.org/10.1021/AC501353N.

[189] Chen S, Kong H, Lu X, Li Y, Yin P, Zeng Z, *et al.* Pseudotargeted metabolomics method and its application in serum biomarker discovery for hepatocellular carcinoma based on ultra high-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry. Analytical Chemistry 2013;85:8326–33. https://doi.org/10.1021/AC4016787.

[190] Kind T, Fiehn O. Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. BMC Bioinformatics 2007;8:1–20. https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-105.

[191] Roca M, Pérez-Gálvez A. Absolute chlorophyll composition of commercial green food colorants and coloring foodstuff by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS: Copper chlorophyllins. Food Chemistry 2024;436:137728. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2023.137728.

[192] Ríos JJ, Roca M, Pérez-Gálvez A. Systematic HPLC/ESI-high resolution-qTOF-MS methodology for metabolomic studies in nonfluorescent chlorophyll catabolites pathway. Journal of Analytical Methods in Chemistry 2015;2015. https://doi.org/10.1155/2015/490627.

[193] Ding D, He X, Agarry IE, Wang Y, Zhou F, Li Y, *et al.* Profile of Human Milk Phospholipids at Different Lactation Stages with UPLC/Q-TOF-MS: Characterization,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Distribution, and Differences. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2023;71:6326–37. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.2C07512.

[194] Thiele H, McLeod G, Niemitz M, Kühn T. Structure verification of small molecules using mass spectrometry and NMR spectroscopy. Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly 2011;142:717–30. https://doi.org/10.1007/S00706-011-0486-6.

[195] Ul Haq F, Ali A, Akhtar N, Aziz N, Khan MN, Ahmad M, *et al.* A high-throughput method for dereplication and assessment of metabolite distribution in Salvia species using LC-MS/MS. Journal of Advanced Research 2020;24:79–90. https://doi.org/10.1016/J.JARE.2020.02.001.

[196] Pelander A, Decker P, Baessmann C, Ojanperä I. Evaluation of a high resolving power time-of-flight mass spectrometer for drug analysis in terms of resolving power and acquisition rate. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 2011;22:379–85. https://doi.org/10.1007/S13361-010-0046-Z.

[197] Blaženović I, Kind T, Ji J, Fiehn O. Software Tools and Approaches for Compound Identification of LC-MS/MS Data in Metabolomics. Metabolites 2018;8:31. https://doi.org/10.3390/METABO8020031.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

III.METODOLOGÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

El enfoque principal del desarrollo metodológico de esta tesis se centró en la aplicación de técnicas simples, de pocas etapas, con bajo impacto energético y consumo reducido de materias primas; cónsonas con la finalidad de la aplicación de los extractos aquí generados, a la par de brindar una vía efectiva en la obtención de compuestos bioactivos. Asimismo, a lo largo de los distintos ensayos, se ajustaron estos procedimientos con miras a su implementación industrial, perfilándose así como metodologías escalables con potencial aplicativo en este entorno.

Como herramienta de validación, se llevaron a cabo estudios comparativos con técnicas convencionales en el ámbito de la extracción de fitoquímicos a partir de plantas y matrices agrícolas. De este modo, se sometieron a prueba las alternativas metodológicas propuestas en diversos contextos de análisis, evaluando su eficacia en la ejecución de los procesos, la facilidad de implementación y escalabilidad, así como su impacto en términos de consumo energético, uso de materias primas y generación de residuos asociados a su aplicación.

Como técnica inicial para el abordaje de la caracterización de todas las matrices estudiadas fue aplicada la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD). En el ámbito acuícola la técnica fue contrastada para la extracción de compuestos bioactivos a partir de microalgas con disruptor celular mecánico ultrasónico de alta presión. Para la extracción desde macroalgas, la MSPD fue contrastada con la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) mediante procesos extractivos secuenciales. En el caso de los residuos agroindustriales fue aplicada la metodología escalable de extracción a mediana escala y a temperatura ambiente (MSAT) como paso intermedio a métodos extractivos en el sector industrial. En el estudio de la aplicación de los extractos de bagazo como enriquecedores de pienso de animales de granja, se aplica nuevamente la técnica MSPD en un enfoque novedoso en la extracción de muestras biológicas de origen animal líquidas y semisólidas; así como en diferentes muestras de la alimentación de estos animales.

En los procesos industriales, para la generación del extracto derivado del bagazo de uva blanca, se aplicaron procesos de reconcentración de extractos naturales mediante equipos piloto de evaporación, así como liofilizadoras y secadores por aspersión, en el desarrollo de prototipos de extractos sólidos.

En cuanto a la caracterización analítica, se emplearon diversas técnicas de detección y caracterización de las muestras generadas. Para la cuantificación de los principales índices bioactivos, se utilizaron equipos espectrofotométricos UV-Vis tradicionales y de microplacas. Para la caracterización de los extractos, se aplicaron técnicas cromatográficas, tales como cromatografía de gases (GC) acoplada a detectores de masas (MS), principalmente para la detección de compuestos lipídicos, y cromatografía líquida (LC) acoplada a cromatografía de masas en tándem (MS/MS) para la cuantificación de compuestos fenólicos. Además, se emplearon técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acopladas a detectores de redes de diodos (DAD), principalmente para la cuantificación de compuestos carotenoides, así como cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) en combinación con espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) acoplando un detector cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF), tanto para la cuantificación de fitoquímicos como para el análisis no dirigido de diversas muestras. Como parte de la aplicación alimentaria de los extractos, se emplearon métodos fisicoquímicos de evaluación, principalmente instrumentos reológicos para medir parámetros como la tenacidad y la elasticidad de los alimentos, así como para la medición del color y el contenido y actividad de agua. Además, se aplicaron metodologías para detectar el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

crecimiento patogénico en los alimentos mediante análisis microbiológicos de diversas cepas, como *Bacillus cereus*, y unidades formadoras de colonias.

El banco de resultados generado fue tratado mediante diversas metodologías de procesamiento de datos, tanto herramientas quimiométricas incluyendo softwares estadísticos, desarrollo de algoritmos de identificación y validación, así como bases datos acopladas a procesamiento de inteligencia artificial.

.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

IV-I. SECCIÓN DE TRABAJOS PUBLICADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo 1. Métodos verdes de extracción de matrices de origen acuícola

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En la competencia por la generación de compuestos bioactivos, los procesos sintéticos se perfilan, en diversos ámbitos, como la opción preferente debido a su baja demanda de espacio para la producción y elevada selectividad, lograda mediante la optimización de rutas de síntesis hacia compuestos específicos con larga vida útil. Sin embargo, estos procesos suelen incorporar complejas rutas de síntesis que utilizan recursos petroquímicos no renovables, así como disolventes altamente tóxicos y residuos difíciles de eliminar. Por otro lado, las rutas alternativas que implican la generación sostenible de extractos bioactivos a partir de fuentes renovables enfrentan desafíos significativos, como los costos elevados asociados con la extracción y el aislamiento de los analitos de interés, así como una selectividad generalmente reducida. Por otro lado, nuevos enfoques y tecnologías aplicadas a fuentes naturales para la obtención de bioactivos convierten esta alternativa en una propuesta más viable.

En este contexto, las algas se destacan como una opción promisoria debido a su capacidad para albergar una amplia gama de compuestos bioactivos, tanto en su forma macroscópica como microscópica. Además, las algas exhiben adaptaciones versátiles que les permiten prosperar en entornos no cultivables para especies superiores, lo que las convierte en una fuente rica y accesible de compuestos bioactivos.

A continuación, se presentan tres publicaciones relacionadas con la obtención de compuestos bioactivos a partir de micro y macroalgas, así como métodos alternativos de extracción y análisis de su perfil bioactivo.

En el primer trabajo, se describe una primera aplicación de la técnica MSPD en la extracción de compuestos carotenoides y ácidos grasos a partir de la microalga *H. pluvialis* liofilizada. La técnica propuesta es comparada con métodos tradicionales de disrupción para este tipo de matrices unicelulares. Utilizando disolventes extractivos GRAS, se logra obtener un extracto multiobjetivo que contiene carotenoides esterificados de alta estabilidad, compuestos lipídicos no previamente detectados en esta microalga, y ácidos grasos esenciales.

En un segundo enfoque, se presenta un estudio sobre la extracción de *H. pluvialis* en forma de pasta húmeda, eliminando la etapa de secado comúnmente utilizada en su procesamiento. Esta alternativa reduce los costos asociados al proceso de liofilizado y produce un extracto con un contenido acuoso significativo, eliminando la necesidad de hidratación en el proceso extractivo posterior. Se identifican compuestos de mayor polaridad, como cadenas fenólicas no previamente detectadas en esta microalga, así como compuestos lipídicos anfotéricos y una variedad de carotenoides y ácidos grasos.

Como tercer apartado, se aborda una publicación enfocada a la extracción de compuestos bioactivos a partir de macroalgas. Partiendo de la previa aplicación de la MSPD a las fuertes células de las microalgas, la técnica es adecuada a 5 variedades de macroalgas del Adriático obteniendo extractos bioactivos con una elevada presencia de cadenas fenólicas. Los análisis aquí obtenidos son contrastados con métodos tradicionales de extracción como extracción asistida por ultrasonidos, evaluando la eficiencia extractiva mediante la caracterización del perfil polifenólico por cromatografía líquida acoplada a detector de masas en tándem (MS/MS) como su *grado de verdor* evaluando parámetros de consumo y requerimientos energéticos necesarios para la extracción

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A continuación, se procede a presentar los trabajos publicados.

1.1. MICROALGAS

1.1.1. Matrix solid-phase dispersion as a greener alternative to obtain bioactive extracts from *Haematococcus pluvialis*. Characterization by UHPLC-QTOF

Aly Castillo, Simón Pereira, Ana Otero, Sarah Fiol, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores

RSC Advances, 10 (2020), 27995
ISSN: 2046-2069, Royal Society of Chemistry (RSC)
DOI: 10.1039/D0RA04378H

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RSC Advances

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Check for updates

Cite this: *RSC Adv.*, 2020, **10**, 27995

Matrix solid-phase dispersion as a greener alternative to obtain bioactive extracts from *Haematococcus pluvialis*. Characterization by UHPLC-QToF†

Aly Castillo, *[a] Simón Pereira, [b] Ana Otero, [c] Sarah Fiol, [d] Carmen Garcia-Jares [a] and Marta Lores [a]

So far, research on the microalga *Haematococcus pluvialis* has been focused mainly on the exploitation of its high astaxanthin content, leaving aside the use of other bioactive compounds present. This study is focused on obtaining and characterizing extracts enriched in bioactive compounds from this microalga red aplanospores. This is performed by means of Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) extraction process, in an environmentally friendly way with low energy consumption and GRAS solvents. The effects of extraction parameters, particularly the extraction solvents (ethanol, ethyl lactate and water) are studied, in order to obtain maximum recovery of the main antioxidant compounds of interest (carotenoids, fatty acids and derivatives). Characterization of extracts is carried out by HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography Diode Array Detector) and UHPLC-QToF (Ultra High-Performance Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight). The results show that MSPD produced extracts with higher bioactive compound recoveries than conventional cell disruption extractions. At the same time, a novel untargeted characterization for this species is performed, identifying compounds not previously dated in *H. pluvialis*, which include 10-phenyldecanoic acid and the -oxo and -hydroxy derivatives of palmitic acid. This approach, first applied to a freshwater microalgae, characterized by rigid and resistant aplanospores, provided a synergistic and sustainable extract, giving a broader focus on the use of this microalga.

Received 16th May 2020
Accepted 16th July 2020

DOI: 10.1039/d0ra04378h

rsc.li/rsc-advances

Introduction

The microalga *Haematococcus pluvialis* is one of the most abundant and commercially produced freshwater species.[1] The market for this microalga is mainly focused on the generation of biomass for the production of carotenoids, more specifically astaxanthin.[2] It is estimated that world production of this microalga reaches 1000 tons per year just to obtain this carotenoid.[3] Laboratory cultures of *H. pluvialis*, in contrast to any other microalgae species, do not possess distinctive cultivation characteristics, but their large-scale production focused only on obtaining astaxanthin is a challenging task, mainly due to diversity of environmental and operational factors that affect the accumulation of this compound.[4] At the same time, astaxanthin produced by extracting biomass from microalgae only accounts for 1% of the world carotenoid market, since the processes of preparing synthetic astaxanthin leads to lower costs and higher production volumes.[5] In this context, the search for other compounds of interest that enable a greater use of biomass has been increased, in turn enriching the bioactive power of astaxanthin-rich biomass in a synergic way.[6]

In contrast to the 5% astaxanthin content that *H. pluvialis* can store, the lipid content can reach approximately 35% of dry weight, with a high amount of fatty acids of the omega-3 and omega-6 series.[7,8] In contrast, the potential content of *H. pluvialis* as a source of fatty acids has generated great interest in recent years, having a significant impact on the nutraceutical sector.[9] To isolate these bioactive compounds from microalgae, extraction is the first key step, and the need to select the most appropriate extraction methodology is evident.[10] Recently, accelerated and compressed fluid-based extraction techniques

[a]CRETUS Institute, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela, Spain. E-mail: marta.lores@usc.es; carmen.garcia.jares@usc.es; alyjesus.castillo.zamora@usc.es; Tel: +34-881-814379

[b]Astaco Technologies B.V., Remmingweg 2-4, 1332 BE Almere, The Netherlands. E-mail: simon@astaco-technologies.com

[c]Aquiculture and Biotechnology (AQUABIOTECH), Department of Microbiology and Parasitology, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela, Spain. E-mail: anamaria.otero@usc.es

[d]CRETUS Institute, Department of Soil Science and Agricultural Chemistry, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela, Spain. E-mail: sarah.fiol@usc.es

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0ra04378h

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

such as Accelerated Solvent Extraction (ASE), Ultrasound-Microwave Assisted Extraction (UMAE), Pressurized Liquid Extraction (PLE) and Supercritical Antisolvent Fractionation (SAF), have gained considerable interest in the extraction of bioactive substances from algae.[11–13] Many of these techniques are efficient on a small scale, not being widely applied in the industrial field due to their high energy requirements.[14] In addition, there is currently a limited understanding of the key variables that affect the performance of these extraction processes.[15] In turn, the solvents used in these techniques focus only on the extraction of carotenoids, without taking into account the solubilisation of other bioactive compounds.

Matrix solid-phase dispersion (MSPD) is a simple, fast, fairly straightforward and sustainable technique for extracting compounds from a wide variety of complex samples.[16] The versatility and flexibility of MSPD allows this process to be applied to an extensive range of analytes isolated from an also wide range of matrices.[17] In addition, scale-up processes based on similar principles as this technique have been patented and applied to biological matrices in search of bioactive compounds, showing excellent results in the generation of extracts on an industrial scale.[18] At present, no information has been found about the application of MSPD in search of bioactive compounds in freshwater microalgae. Only one study has reported the use of this technique in seawater microalgae species (*Isochrysis zhangjiangensis* and *Nannochloropsis oculata*) with a simple disruption due to the non-existence of a very hard aplanospore, showing acceptable reproducibility, recovery, extraction efficiency and lower solvent consumption in relation to conventional extraction techniques such as ultrasonic extraction for three carotenoids.[19] In line with these processes, generally recognized as safe (GRAS) solvents such as food-grade ethanol or water are used, being compatible with nutraceutical applications.[12,13,20,21] In addition, ethyl lactate has recently gained much attention in the extraction of bioactive compounds.[22] This organic solvent, while being suitable for consumption, shows an excellent affinity for carotenoid compounds as well as for various fatty acids.[23]

Therefore, the present work aims to obtain bioactive extracts, with a high content of carotenoid compounds fatty acids, and derivatives from red stage aplanospores of the microalga *H. pluvialis*, using the scalable extraction method MSPD, in combination with green organic solvents and metabolomic techniques of characterization, giving a broader and more sustainable use focus to this microbiological matrix.

Materials and methods

Reagents and materials

The solvents used for the extraction process were absolute food grade ethanol (above 99.8%) provided by VWR (Leicestershire, England), ethyl lactate supplied by Fluka Analytical (Steinheim, Germany) and Ultrapure water MS-grade from Scharlab (Barcelona, Spain). For MSPD extraction, sand was used as a dispersant medium with an average particle size of 2×10^2 to 3×10^2 μm Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Spain). For mobile phase preparation in HPLC-DAD and UHPLC-QToF-MS/MS, MS-grade methanol obtained by Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany) and formic acid obtained by Merck (Darmstadt, Germany) were used. The astaxanthin standard was provided by Biosynth Carbosynth (Berkshire, United Kingdom), β-carotene was supplied by ThermoFisher (Kandel, Germany) and zeaxanthin and lutein were supplied by Extrasynthese (Genay, France).

Standard solutions were prepared in ethanol. The extraction processes and preparation of standards were carried out in a red-light room, in a dry environment. Standards and extracts were stored in amber glass containers, sealed with paraffinic material and kept in a dark and controlled environment at −20 °C. Reagents and samples were stored in different places to avoid cross-contamination.

Red stage *Haematococcus pluvialis* biomass

Freeze-dried red stage *H. pluvialis* biomass was kindly donated by Astaco Technologies B.V. (The Netherlands). General details of the *H. pluvialis* production process are described by Pereira.[2] In summary, cultures of *H. pluvialis* were carried out in 150 L industrial scale flat-plate photobioreactors (optical path of 50 mm) following a two-stage approach where green and red cells were produced separately. Once green vegetative-stage cells reached a certain density, the culture parameters were changed in order to favour inductive conditions, triggering astaxanthin accumulation by the microalgae. Inductive conditions included nitrate depletion, CO_2 availability and a continuous irradiance of 750 μmol photon m^{-2} s^{-1} produced by LED light sources with a mixed light composition of red and blue wavelengths. Astaxanthin-rich (~5% dry cell weight) microalgal biomass was harvested by centrifugation on the seventh day after the onset of inductive conditions and it was stored frozen at −28 °C prior to lyophilization, which was carried out in the dark until a powdered biomass with a moisture content below 5% in weight was achieved.

Matrix solid-phase dispersion extraction MSPD

Initially, the whole extraction process was carried out in a dark room, only under the incidence of red light, in an environment with an average temperature of 21 °C. The lyophilized *H. pluvialis* biomass, after being removed from storage at −20 °C, was tempered and weighed in the different sample sizes presented in this work. The microalga was disrupted with 0.8 g of sand in a glazed porcelain mortar to reduce porosity and avoid loss of material (Fig. 1). The hand of the mortar also contains a glazed tip to avoid porosity and passage of material. The sample was added to the dispersing medium and disrupted for 5 min, until a homogeneous paste was obtained, with an oily appearance as a result of the breakage of the cell when its content was released. This mixture was transferred to a MSPD column, which initially contains a layer of glass wool and 0.2 g of sand as a filter medium. Finally, to avoid the creation of preferential paths by the solvent, another layer of glass wool was placed on top that works as a fluid disperser. The extract was obtained by adding the solvent to the bed, controlling the discharge flow by means of a regulating valve. Extracts are stored in amber vials at −20 °C to avoid degradation.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2020

Cell disruption method

For the extraction of bioactive compounds by means of the cell disruption, an established aliquot of the corresponding solvent (ethanol, water, or ethyl lactate) was transferred into a test tube. Then, the lyophilized *H. pluvialis* powder was tempered and weighed. All this mixture was placed in an external cold bath without contact with the sample, in order to maintain the temperature in the disruption process. The cell disruptor used was a basic mechanical dispersion instrument, which incorporates a high performance IKA T25 rotor-stator system at 24 000 rpm. The equipment was inserted into the test tube in such a way that there was a space of 1 cm between the bottom of the tube and the rotor-stator system of the disruptor. The disruption is carried out in 15 min, the maximum effective time of the equipment. The sample was then centrifuged for 10 min, and subsequently decanted and stored in amber vials at −20 °C.

High performance liquid chromatography diode array detector HPLC-DAD

HPLC-DAD chromatographic study was carried out using a Jasco AS-4100 chromatograph with a PU-4180 quaternary pump, an AS-4150 autosampler, a Kinetex chromatographic column 5 μm C18-100 Å (4.6 mm × 150 mm, 2.6 μm) (Phenomenex, Torrance, USA), and a MD-4010 PDA diode detector. The mobile phase consisted of a 1% formic acid solution in water (A) and in methanol (B). Thus, with a constant temperature of 50 °C and a flow of 1 mL min^{-1}, a proportion of 25% of (A) in 75% of (B) is established during 5 min, then it is taken by a progressive ramp up to 100% (B) in 10 min, and hold 20 min. UV-Vis spectra were acquired from 250 nm to 520 nm to determine the maxima absorption of the identified compounds. The samples were filtered by 0.22 μm polytetrafluoroethylene (PTFE) filters before being injected.

Ultra high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-QToF)

Targeted and untargeted analysis of the compounds were carried out in an Elute UHPLC 1300 coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometry (QToF) Compact Instrument (Bruker Daltonics). Column ThermoScientific HypersilGold aQ (1.9 μm, 100 mm × 2.1 mm) was kept at a constant temperature of 40 °C. Mobile phase consisted of 4 mM formic acid in water (A) and methanol (B). The acquisition run takes 15 min with a flow rate of 0.25 mL min^{-1}. Gradient method starts in 95% (A)/5% (B) for 0.4 min, lineally goes to 35% (B) in 0.1 min, and to 100% (B) in 7 min, hold for 5 min. Then, return to the initial conditions until reaching 15 min.

Electrospray ionization (ESI) acquisition was performed with the Auto MS/MS method both in negative and positive modes, detecting mainly pseudo-molecular ions $[M - H]^-$ and $[M + H]^+$ respectively, with presence of ions with water loss as $[M - H_2O + H]^+$ and sodium adducts $[M + Na]^+$, using a voltage ramp from 10 to 105 eV, with spectra rate of 8 Hz and mass filtering from 20 to 1000 *m*/*z*, with a total cycle time range equal to 1s. All acquisitions were obtained using the Compass HyStar software and processed using the DataAnalysis Version 5.1 (Build 201.2.4019) and MetaboScape Compass Version 4.0.4 (Build 19) software, applying algorithms based on intensity, isotope profile and mass error; to process the hundreds of compounds acquired. In MetaboScape software, the identification tool SmartFormula was used, which provides possible molecular structures of the acquired analytes by means of their exact mass and isotopic profile (checking the analyte in all the samples tested and all the adducts identified); as well as the tools compound Crawler and MetFrag, which perform searches in the main online databases of chemical compounds (PubChem, ChEBI and ChemSpider), as well as the *in silico* fragmentation of the compounds chosen as possible candidates.[24,25]

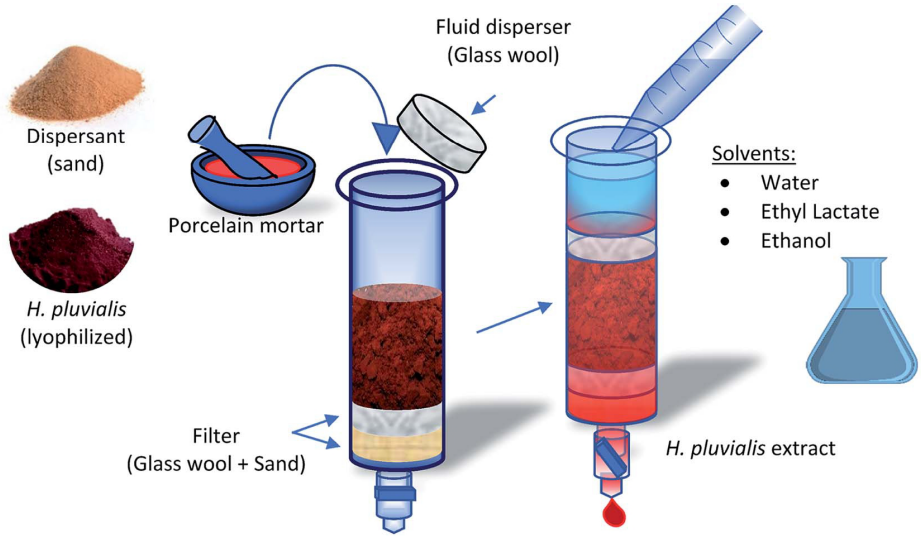


Fig. 1 Scheme of the extraction process using the MSPD technique applied to red stage biomass of the microalga *H. pluvialis*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 1 Extraction parameters for comparison of MSPD and cell disruption processes in the recovery of bioactive compounds

Technique	Disruption time (min)	Extraction volume (mL)	Sample size (g)
MSPD	5	5, 10[a]	0.1, 0.2, 0.4
Cell disruption	15	5, 10[a]	0.1, 0.2, 0.4

[a] Only for a mass of 0.2 g.

Results and discussion

Comparison of two extraction methods (MSPD and cell disruption)

Extractions of red *H. pluvialis* aplanospores were carried out using MSPD in contrast to traditional extraction procedures, such as the use of a cell disruptor, in order to test the efficiency of the proposed method. To perform an analysis under the same guidelines, food grade ethanol as extraction solvent, and the same lyophilized microalgal biomass were used. With the purpose of evaluate the response generated with the applied methods (MSPD and cell disruption) by the modification of the extraction parameters, the different sample sizes, extraction volumes and disruption times used are summarized in Table 1. The disruption time is the only parameter that differs between the methods. Rotor-stator systems like the cell disruptor can only offer a maximum disruption time of 15 minutes due to heat generation. After this time, the system only provides heat to the medium. In this way, disruption is carried out in the maximum time offered by the equipment (15 min) by immersion in an ice bath to avoid heating of the sample.

To reliably demonstrate the disruption of the particles, a detailed analysis of the results was carried out using a microscope. Fig. 2 illustrates comparative images of the transformation process of the microalga from its base state. The images Fig. 2a (10×) and Fig. 2b (40×) show the initial state (before disruption) of the biomass of red stage *H. pluvialis* aplanospores. Here the microalga presents a mature profile with a rigid, resistant, and well defined pseudo-spherical cell wall, characteristic of aplanospores.[26] Moreover, the potential bioactive compounds are inefficiently available, making their extraction by primary contact with the solvent difficult. In contrast, Fig. 2c and d detail a set of cells fractured by the cell disruptor, showing a small group that still keep their cell wall closed, losing rigidity and presenting a gelatinous morphology, which generates a more labile matrix, being its cytoplasmic content very accessible to solvents.

Due to the disruption step in the MSPD process (Fig. 2e), all cells have a gelatinous structure where their contents have largely been drained without the addition of solvents. This first point of comparison reveals that the MSPD method initially generates a disruption qualitatively comparable to the contrasted method. After performing the whole MSPD process, no cell or cell wall remains visible (Fig. 2f). This is due to the intrinsic filtration process of the extractive method. The image indicates the obtaining of a homogeneous solution that, as it will be seen later, contains the bioactive compounds of interest.

In order to quantitatively determine the extraction efficiency, the main carotenoid compounds contained in *H. pluvialis* are used as markers. "Astaxanthin formed the major proportion of carotenoids in *H. pluvialis* red aplanospores followed by violaxanthin, free astaxanthin, lutein, zeaxanthin, α-carotene, and β-carotene".[27] Thus, astaxanthin, zeaxanthin, lutein and β-carotene were chosen as markers of this microalga to determine the relative percentages of recovery by the two extractive methods. The carotenoid profile was evaluated by means of HPLC-DAD, injecting standards dissolved in ethanol to obtain comparable retention times (R_t) and spectra.

Fig. S1† shows the overlaid chromatograms of the selected carotenoids extracted by MSPD and their respective standards using ethanol as solvent. Zeaxanthin and lutein have isomeric structures presenting very similar retention times and absorption spectra, thus following data were calculated as the contribution of both.

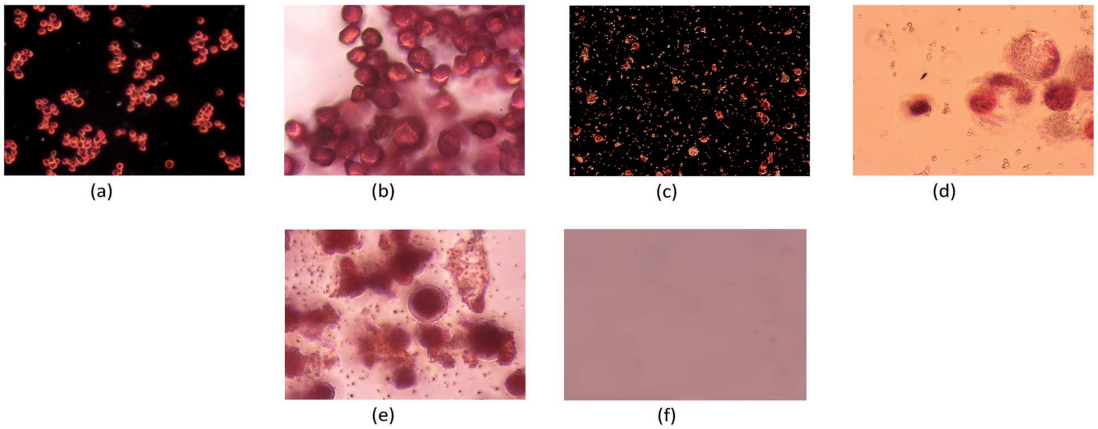


Fig. 2 Microscope images of *H. pluvialis* red. (a) Non-disruptive 10×; (b) non-disruptive 40×; (c) disruption with cell disruptor 10×; (d) disruption with cell disruptor 40×; (e) first step MSPD (disruption with mortar) 40×; (f) second step MSPD (extract obtained) 40×.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2020

Table 2 Identification parameters of carotenoids used as markers in HPLC-DAD analysis

Carotenoid	Sample retention time (min)	Standard retention time (min)	Correlation factor (R)	λ_{max} of absorption (nm)
Zeaxanthin	12.337	12.363	0.996	451
Lutein	12.337	12.316	0.993	445
Astaxanthin	11.473	11.433	0.986	470
β-Carotene	19.317	19.213	1.000	453

All marker carotenoids were identified with a correlation coefficient between the experimental and the spectral library absorption spectra higher than 0.986, as shown in Table 2. The difference between the retention time obtained by standards injection, and the retention time resulting from extracts injection, did not exceed 1%. The wavelength of maximum absorption has been established between 445 and 470 for the carotenoids presented here.

Fig. 3 shows the recovery obtained for the carotenoids astaxanthin, zeaxanthin–lutein and β-carotene with the standard cell disruption method and with MSPD method. The ratio extraction volume/sample size is exemplified, with values of 5/0.4, 5/0.2, 5/0.1 and 10/0.2 mL mg^{-1}. The recovery of carotene compounds is presented as a percentage relative efficiency value referring to the compound with the highest concentration, obtained with the technique and method of extraction described there.

Carotenoids recovery by means of MSPD is superior in all the cases except when working with smaller mass quantities (Fig. 3c) where the cell disruptor shows a greater efficiency; MSPD bed size decreases with lower mass, shorten the time of contact of the extractive solvent, obtaining therefore a smaller recovery.

By gradually increasing the mass (Fig. 3b), the dimension of the package increases, modifying the geometry of the extractive bed and improving recoveries; leading up to the best ratio (when 5 mL is used as solvent volume), 5 mL/0.4 mg (Fig. 3a), where a clear difference is demonstrated, being the MSPD extraction much more effective. In Fig. 3d a ratio of extraction volume/sample size of 50 as in (c) is maintained, obtaining, in contrast, a better extraction through MSPD. This is due to the increased sample size, which in turn decreases the efficiency of the disruptor. In addition, the increment extraction volume increases the extraction time, where the downstream flow generated in the MSPD cartridge provides a carotenoid enriched extract at the bottom and a virgin solvent at the top, thus creating a constant wash, avoiding solvent saturation while producing a short maceration. On the contrary, in the cell

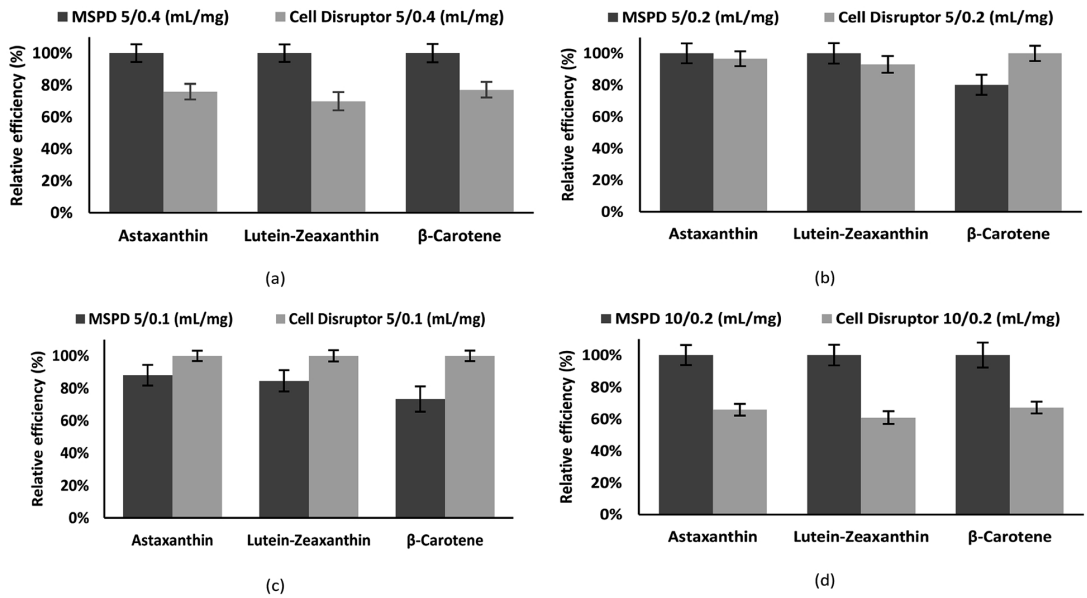


Fig. 3 Relative efficiency of major carotenoids extraction (astaxanthin, lutein–zeaxanthin, β-carotene) in ethanol by two methods: MSPD and cell disruption. The following "extraction volume/sample size" ratios were used: (a) 5 mL/0.4 mg, (b) 5 mL/0.2 mg, (c) 5 mL/0.1 mg, (d) 10 mL/0.2 mg.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

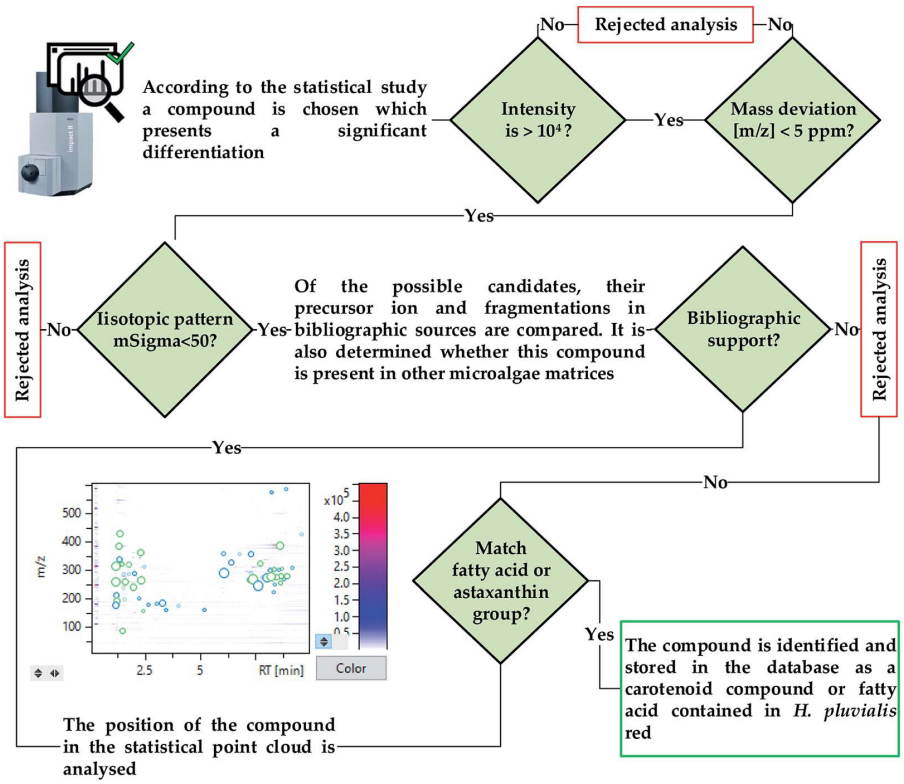


Fig. 4 Untargeted and targeted compound identification algorithm using UHPLC-QToF.

disruptor, the solvent is not renewed with fresh solvent, the molecules are broken, gradually saturating it, which is less effective in facilitating the rupture of the cell membranes and the extraction of the carotenoids. This results in efficient use of the extraction solvent by the MSPD in relation to the traditional method, generating greater recovery at equal extraction volumes.

This comparison of extraction methods shows that MSPD extraction generates an extract rich in bioactive compounds superior to the cell disruptor, applying shorter disruption times, without the generation of heat which eliminates the process of continuous cooling of the sample. In turn, the MSPD's intrinsic filtration process provides a homogeneous extract, free from subsequent filtration processes, which not only require more

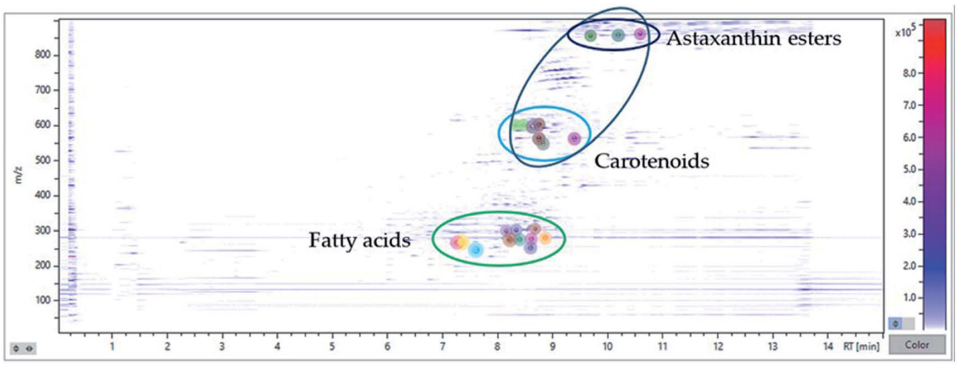


Fig. 5 Overlay of chromatography and mass profiles (negative and positive ionization) of the bioactive compounds identified in MSPD extract of *H. pluvialis* red aplanospores by UHPLC-QTOF.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2020

Table 3 Carotenoids identified by targeted characterization *via* UHPLC-QToF

R_t (min)	Carotenoid	Formula	Mode	Ion	*m*/*z*	Fragments	mSigma	Δ*m*/*z* [ppm]	*E* (eV)
8.31	Neoxanthin–violaxanthin	$C_{40}H_{56}O_4$	$[M+H]^+$	$C_{40}H_{57}O_4^+$	601.4(64)	167.1(100); 318(64); 119(64); 221.1(56)	18.24	2.59	38.0–38.1
8.53	Neoxanthin–violaxanthin	$C_{40}H_{56}O_4$	$[M+H]^+$	$C_{40}H_{57}O_4^+$	601.4(34)	221(100); 318(41); 119(23)	39.31	1.51	38.0
8.63	Astaxanthin	$C_{40}H_{52}O_4$	$[M+H]^+$	$C_{40}H_{53}O_4^+$	597.4(33)	147.1 (100); 201.1 (19); 119.1(53); 173.1(34); 379.3(22) 285.2(12)	24.92	1.83	37.8–38.0
8.82	Echinenone	$C_{40}H_{54}O$	$[M+H]^+$	$C_{40}H_{55}O^+$	551.4(37)	119.1(100); 173,1(46); 145.1(96), 133(72); 289(87)	5.04	3.10	36.5
9.39	Canthaxanthin	$C_{40}H_{52}O_2$	$[M+H]^+$	$C_{40}H_{53}O_2^+$	565.4(62)	173.1(34); 133.1(31); 145.1(29); 187.1(14); 119.1(18)	17.46	1.51	21.9
9.69	[a]AME C18:4	$C_{58}H_{78}O_5$	$[M+H]^+$	$C_{58}H_{79}O_5^+$	855.6(16)	147.1 (100); 173.1(67); 201.1(37); 119.1(49); 145.1(33); 109.1(27)	5.23	1.41	46.0
10.18	[a]AME C18:2	$C_{58}H_{82}O_5$	$[M+H]^+$	$C_{58}H_{83}O_5^+$	859.6(20)	147.1 (100); 173.1(73); 201.1(41); 119.1(43); 145.1(37); 109.1(30)	23.65	2.58	45.7–45.8
10.59	[a]AME C18:1	$C_{58}H_{84}O_5$	$[M+H]^+$	$C_{58}H_{85}O_5^+$	861.6(9)	147.1 (100); 173.1(74); 201.1(38); 119.1(37); 145.1(35); 109.1(33)	21.10	2.04	45.7–47.9

[a] AME (astaxanthin monoester).

energy, but also generate higher costs and longer production times for the extracts. In addition, the effectiveness of MSPD with larger sample sizes relative to the cell disruptor demonstrates the potential for scaling up the extraction technique.

Identification of targeted-untargeted analytes by UHPLC-QToF

Current research and commercial interest in relation to the extracts obtained from *H. pluvialis* red aplanospores is focused on obtaining astaxanthin. This study explores the extraction and characterization of bioactive compounds, whether they are carotenoids such as astaxanthin, or potential new unidentified compounds. In this way, it is necessary to perform a high sensitivity untargeted analysis that allows the identification of the greatest number of compounds, while ensuring an effective characterization. For this purpose, a high-resolution Auto MS/MS acquisition was performed, which is much less time consuming than other acquisition methods such as manual selection of precursors using LC-MS. The automatic mode combines MS scanning cycles with programmed MS/MS scans for precursor ion detection depending on their relative abundance in the MS scan, thus allowing both MS and MS/MS data to be acquired in a single analysis.[28]

To validate the identification of a compound, two main criteria are used, the exact mass and the deviation from the isotopic pattern, as a function of its theoretical value, quantified as mSigma by the T-Rex 3D algorithm used by MetaboScape. The calculation algorithm, illustrated in Fig. 4, is created establishing values of 5 ppm and 50 mSigma as the maximum acceptable deviation of the mass of the compound and the isotopic pattern respectively.[29]

Initially, a database of specific compounds (carotenoids and fatty acids) obtained from literature search in relation to microalgae and cyanobacterial matrices was constructed, combining it with the internal data of the MetaboScape software, which generates the exact masses from the molecular formula of the analytes.[30] All this process is carried out in a targeted way, since the compounds are identified by previous lists introduced in the software, but these represent only a small part of all the masses quantified by the equipment. In this way, the untargeted process begins, which becomes much more complex since the compounds of interest must be separated from noise signals and interfering analytes. Thus, a comprehensive identification is carried out guided by the application of a Principal Component Analysis (PCA) tool. PCA is a model which reduces the data matrix summarizing the variance in a set of variables in fewer dimensions than those of the original data set.[31] By studying the PCA model, the results summarized in Fig. 5 are obtained, in which a "topography view" is observed where the intensities of the compounds are plotted against the retention times and *m*/*z* values. Each circular marker represents an analyte, located in its main ions retention time and *m*/*z* and sized according to its intensity. The color-coded intensity scale (right) represents the highest intensity in the area shown. This tool allows an easy grouping of compounds that share retention times and mass profiles, making it easy to classify the analysed untargeted compounds.

In this way, fatty acid derivatives, which have not been previously reported for this microalga, were effectively identified in this work, being proposed by the calculation algorithm as irrefutable candidates, and being again corroborated since they are within the group of fatty compounds.

Targeted characterization of carotenoids

The results obtained in the process of carotenoid identification are summarized in Table 3. The *m*/*z* ion 597 was detected and characterized as the protonated molecule of astaxanthin. The base peak at *m*/*z* 147.1 shown in Fig. S2a,† product of the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

fragmentation of the C17–C18 bond of the aliphatic chain at a collision energy of 37.8–38.0 eV, corresponds to the terminal ring without the presence of the hydroxyl group. The fragments *m*/*z* 201.1 and 173.1 are formed in a similar way, these are product of the rupture of the carbons 20–21 and 19–20–31 respectively, in conjunction with the loss of water by the ring. The *m*/*z* ion 119 is the second most intense ion shown by astaxanthin, this is produced by the rupture of the terminal carbon of the central chain with the terminal ring. All these ions were detected by APCI-MS in previous works, for the astaxanthin molecule.[32] The compounds canthaxanthin (*m*/*z* 565.4) (Fig. S2b†), echinenone (*m*/*z* 551.4) (Fig. S3a†) and diadinoxanthin ion product $[M - H_2O + H]^+$ (*m*/*z* 565.4) (Fig. S2c†), generated by fragmentation the *m*/*z* ions 173.1, 119.1 and 133.1 which are characteristic for this family of compounds.[33]

The compounds violaxanthin and neoxanthin are identified as shown in Table 3 with the *m*/*z* ion 601.4, generating the ions products *m*/*z* 221, 318 and 119 illustrated in Fig. S3b and c.† The bibliographic study shows in several analyses that the neoxanthin has a lower retention time than violaxanthin, because it presents higher polarity.[34] At the same time, in an in-depth study about several carotenoid compounds, Rivera *et al.* showed the proportions of ions produced by these two compounds (neoxanthin and violaxanthin), being comparable with the data obtained here.[35] Thus, it is proposed that the compound with a retention time of 8.31 min is neoxanthin and the one with a retention time of 8.53 min is violaxanthin.

The compounds with the highest retention times within the carotenoid group were the astaxanthin monoesters (AME) C18:1, C18:2, C18:4 with the *m*/*z* ions 855.6, 859.6 and 861.6, respectively. It is simple to identify these compounds by software because they have similar mass and retention time, classified in Fig. 5 at the top as a subgroup, which in turn shares a distant relationship with the lower subgroups. The ions identified in all the astaxanthin esters: *m*/*z* 147.1, 119.1, 173.1 and 201.1; are characteristic of astaxanthin, being conclusive proof in the identification as derivatives of this carotenoid.[36]

Targeted and untargeted characterization of fatty acids

In order, to profile the main fatty acids contained in *H. pluvialis*, an analysis was carried out by means of UHPLC-QToF, both in a targeted way, entering diverse possible fatty acid candidates, and untargeted through the exhaustive analysis of the diverse compounds obtained. In this way, in Table 4, a total of 8 fatty acids are presented, of which, by means of the targeted identification, it was possible to characterize diverse compounds of the family of the polyunsaturated fatty acids. From the omega-6 series were identified: eicosapentaenoic acid (EPA) (*m*/*z* 301.2), arachidonic acid (*m*/*z* 303.2), linoleic acid (*m*/*z* 279.2) and eicosadienoic acid identified with the *m*/*z* 307.3 ion, which has been previously determined in microalgae species and cyanobacteria such as *Nostoc spongiforme*, *Oscillatoria tenuis* and *Chlorococcus* sp; presenting an important antimicrobial potential.[37]

In turn, oleic (*m*/*z* 281.2) and linolenic (*m*/*z* 279.2) acids of the omega-9 and omega-3 series respectively were identified. These compounds have been reported for *H. pluvialis* in a great diversity of papers and are of high commercial interest due to their impact in the prevention of chronic diseases and reduction of heart diseases. In relation to saturated fatty acids, the compounds palmitic acid and stearic acid were identified with the ions *m*/*z* 255.2 and 283.3, respectively. These acids are common in several families of microalgae as in *H. pluvialis* red.[30,38]

Through untargeted analysis, as shown in Table 5, three interesting compounds, which were not found to be reported prior to this study, were identified in *H. pluvialis*. *N*-phenyldecanoic acid was identified by both positive and negative ionization, presenting a mass error of less than 1 ppm and a difference in its isotopic pattern of less than 10 mSigma. According to the biological matrix studied and the possible structures given by the compound Crawler algorithm in conjunction with fragmentation *via* MetFrag, it is proposed as an "N–" value equal to 10. 10-Phenyldecanoic acid is a linear alkylbenzene fatty acid not previously identified in *H. pluvialis* red aplanospores. These long-chain aromatic fatty acids, with the phenyl unit in the terminal carbon of the acyl chain, have been identified in species of the Plantae Kingdom, occurring in the aroid subfamilies with the species *Dracunculus vulgaris*, in the Brazilian plant of the genus *Trichilia*, as well as in the bacterium *Vibrio alginolyticus* associated with the seaweed *Cladophora coelothrix*.[39]

In *H. pluvialis* aplanospores, the palmitic acid derivatives *N*-oxopalmitic acid (*m*/*z* 269.2) and *N*-hydroxypalmitic acid (*m*/*z* 271.2) were also identified. These fatty acids derivatives, although not previously identified in *H. pluvialis*, have been characterized in other macroalgae and cyanobacteria such as *Synechococcus* and *Synechocystis* in the case of *N*-

Table 4 Fatty acid compounds and derivatives identified by targeted characterization *via* UHPLC-QToF

R_t (min)	Fatty acid	Formula	Mode	Ion	*m*/*z*	mSigma	Δ*m*/*z* [ppm]
8.15	EPA	$C_{20}H_{30}O_2$	$[M - H]^-$	$C_{20}H_{29}O_2^-$	301.2	10.00	1.23
8.20	Linolenic acid (α + γ)	$C_{18}H_{30}O_2$	$[M - H]^-$	$C_{18}H_{29}O_2^-$	277.2	15.61	2.55
8.34	Arachidonic acid	$C_{20}H_{32}O_2$	$[M - H]^-$	$C_{20}H_{31}O_2^-$	303.2	9.85	1.36
8.40	Linoleic acid	$C_{18}H_{32}O_2$	$[M - H]^-$	$C_{18}H_{31}O_2^-$	279.2	13.47	2.79
8.59	Palmitic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	$[M - H]^-$	$C_{16}H_{31}O_2^-$	255.2	0.40	3.29
8.61	Oleic acid	$C_{18}H_{34}O_2$	$[M - H]^-$	$C_{18}H_{33}O_2^-$	281.2	15.31	3.33
8.68	Eicosadienoic acid	$C_{20}H_{36}O_2$	$[M - H]^-$	$C_{20}H_{35}O_2^-$	307.3	30.96	0.80
8.87	Stearic acid	$C_{18}H_{36}O_2$	$[M - H]^-$	$C_{18}H_{35}O_2^-$	283.3	2.94	1.73

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2020
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 5 Fatty acid derived compounds identified by untargeted characterization *via* UHPLC-QToF

R_t (min)	Compound	Formula	Mode	Ion	*m*/*z*	mSigma	Δ*m*/*z* [ppm]
7.25	*N*-oxopalmitic acid	$C_{16}H_{30}O_3$	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{29}O_3^-$	269.2	13.96	1.80
7.34	*N*-hydroxypalmitic acid	$C_{16}H_{32}O_3$	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{31}O_3^-$	271.2	3.03	2.50
7.60	10-Phenyldecanoic acid	$C_{16}H_{24}O_2$	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{23}O_2^-$	247.2	1.72	3.51
			$[M+H]^+$	$C_{16}H_{25}O_2^+$	249.2	9.30	0.68

hydroxypalmitic acid as in *Ulva pertusa* and *Porphyra* sp in the case of *N*-oxopalmitic acid.[37,40,41]

Affinity of bioactive compounds for extraction solvents (ethyl lactate, ethanol, and water)

To determine the influence of extractive solvents in obtaining bioactive compounds by MSPD, an analysis of the signal response (intensity) of the main analytes of interest was performed. Fig. 6 shows the intensities of the carotenoid compounds identified in *H. pluvialis* as a function of the various solvents: water, ethanol, and ethyl lactate. In general, the recovery of carotenoid compounds using water as an extractive solvent is negligible in relation to more volatile solvents such as ethyl lactate and ethanol. This is due to the hydrophobic and lipophilic nature of these compounds, which are generally extracted from *H. pluvialis* with organic solvents of lower polarity such as DMSO and acetone.[42,43] Unlike these solvents, ethanol and ethyl lactate are less volatile and less reactive food-grade solvents, which have affinity for carotenoid compounds and are much more promising for developing applications for the nutraceutical field.[44,45]

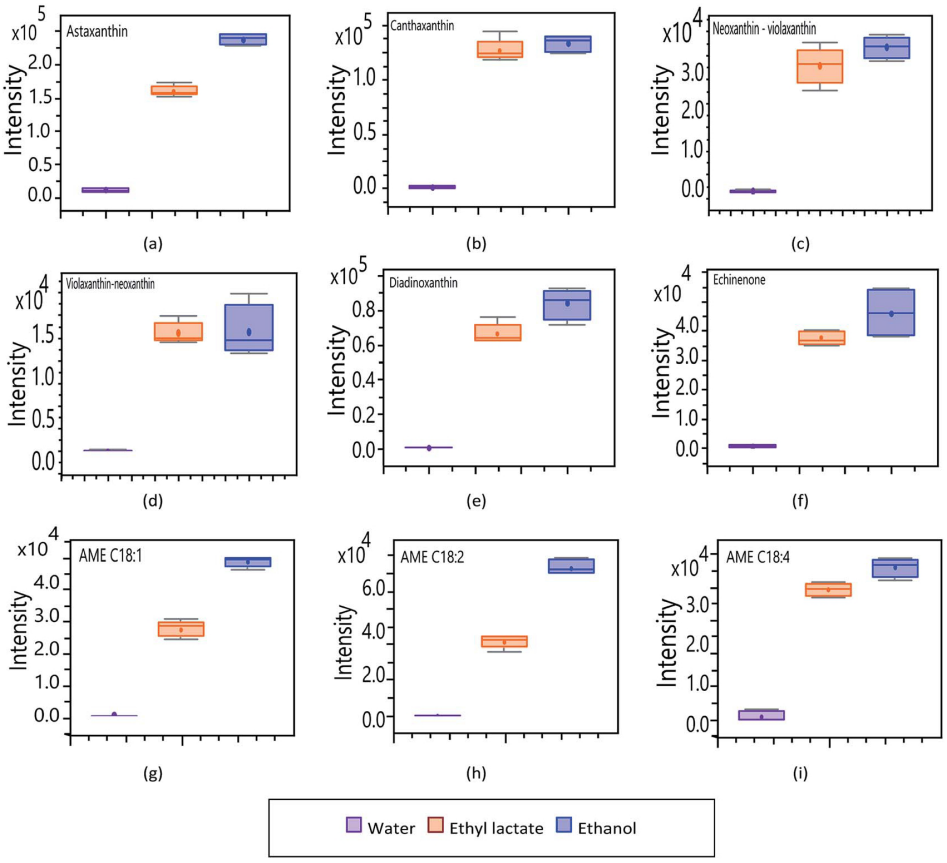


Fig. 6 Analysis of UHPLC-QToF response of carotenoids to modifications in extraction solvents. (a) Astaxanthin. (b) Canthaxanthin. (c) Neoxanthin–violaxanthin. (d) Violaxanthin–neoxanthin. (e) Diadinoxanthin. (f) Echinenone. (g) AME C18:1. (h) AME C18:2. (i) AME C18:4.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2020

Ethanol generally shows a slightly greater response in the extraction of carotenoid compounds; although, ethyl lactate extractions show comparable response values in most cases. In relation to the magnitude obtained in each compound, astaxanthin, canthaxanthin, diadinoxanthin and echinenone (Fig. 6a, b, e and f respectively); present a greater response assuming a greater abundance in the extracts. Fig. 6c and d correspond to the neoxanthin and violaxanthin isomers, where (c) by means of the previously developed analyses, is presumed to correspond to neoxanthin and (d) to violaxanthin. In terms of intensity, there is no important difference between these two compounds, they present a similar profile among the different solvents, being neoxanthin (c) the one that generates the highest response.

In relation to the astaxanthin monoesters (Fig. 6g, h and i), they all show the same pattern in the affinity profile to extraction solvents. As with other carotenoid compounds, AME show a greater response to the more volatile organic solvents, the extraction achieved with water being neglectable. In order to determine the affinity of the main fatty compounds, identified through the targeted analysis, towards the different solvents used (lactate, ethanol and water), an experimental design was planned considering pure solvents as well as mixtures of them (100, 80 and 50%). The obtained results are synthesized in Fig. 7 by means of box–plot graphs. The polyunsaturated acids EPA, arachidonic, linoleic, oleic, linolenic and eicosadienoic present a similar response profile in function of the solvents used. These omega-9, omega-6 and omega-3 series compounds show a greater response when working with ethanol–water 50% and lactate–water 50%. This presents a great advantage both operationally and for application to the nutraceutical field, since an extract is obtained that presents two main fractions: an organic part corresponding to ethyl lactate, which complies with the premises of a solvent according to principles of green chemistry, and another aqueous part, related to bioactive components of higher polarity and hydrophilic tendency.[46]

In order to use pure ethyl lactate as an essential fatty acid extraction solvent, a higher response intensity is observed in contrast to the other pure solvents analysed in this study. The feasibility of extraction by ethyl lactate not only provides good recovery, but also gives added value to the extracts, increasing their antimicrobial potential.[47] At the same time, ethyl lactate provides a much denser aspect to the extract, similar to an emulsion, being much more manageable both in its storage and in its possible nutraceutical use.[22]

In contrast to essential fatty acids, lipid compounds linked to the -oxo, -hydroxy and -phenyl groups; show a substantial response when water is used as an extraction solvent. In Fig. 8, the compounds *N*-oxopalmitic acid (Fig. 8a) and *N*-hydroxypalmitic acid (Fig. 8b) show a similar pattern compared to the corresponding essential fatty acid, as long as organic solvents are

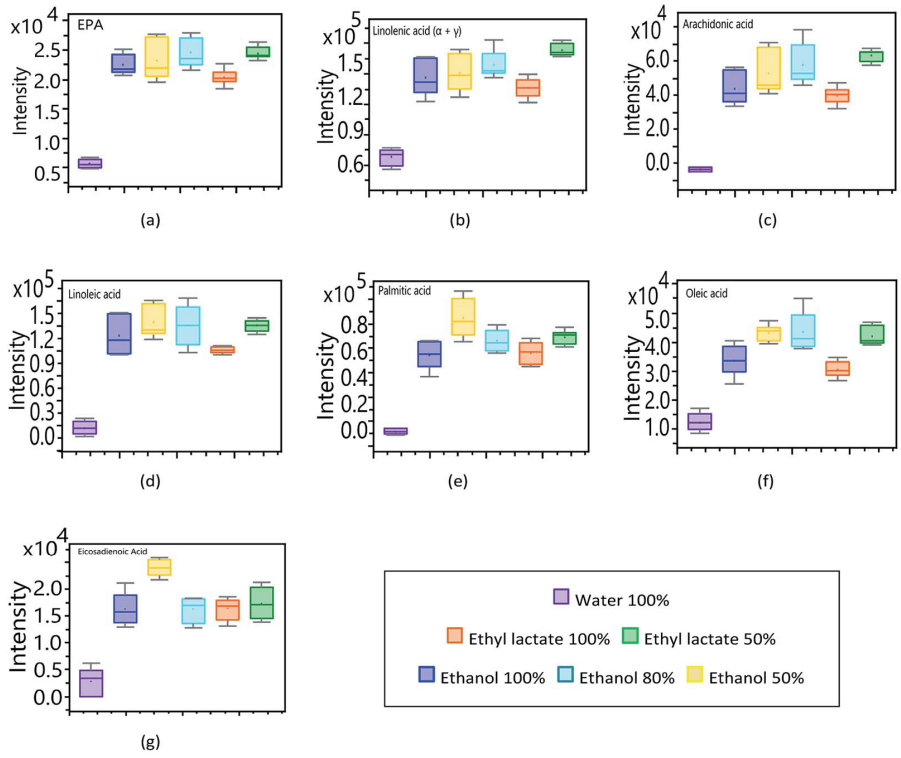


Fig. 7 Analysis of UHPLC-QToF response of target fatty acids to modifications in extraction solvents composition. (a) EPA. (b) Linolenic acid (α + γ). (c) Arachidonic acid. (d) Linoleic acid. (e) Palmitic acid. (f) Oleic acid. (g) Eicosadienoic acid.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2020

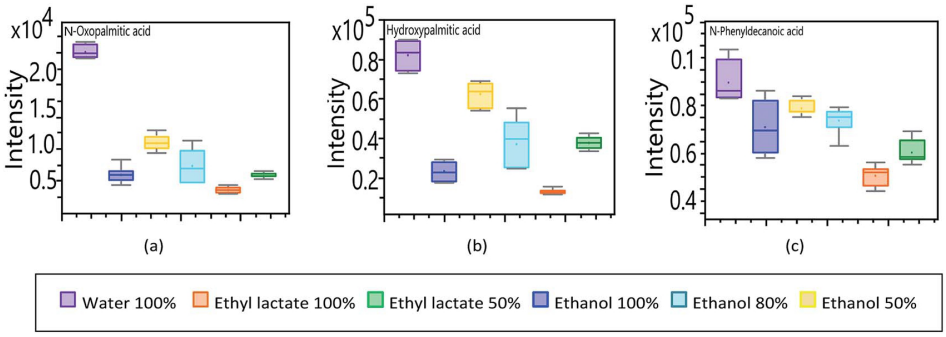


Fig. 8 Analysis of UHPLC-QToF response of untargeted fatty acids to modifications in extraction solvents. (a) *N*-oxopalmitic acid. (b) *N*-hydroxypalmitic acid (c) 10-phenyldecanoic acid.

considered, detailing a marked difference in the high response obtained when using pure water as an extractive solvent.

Unlike palmitic acid, which has a hydrophobic nature, the -oxo and -hydroxy groups give it a more hydrophilic character.[48] Palmitic acid has the shortest carbon chain of the essential fatty acids identified, which gives it less hydrophobic characteristics, exposing its terminal carboxyl group of a polar nature.

The decanoic acid derivative (Fig. 8c) presents a comparable response independently of the extraction solvent but showing a clear greater affinity for water. 10-Phenyldecanoic acid has the shortest aliphatic chain of all the fatty acids and derivatives analysed in this study. This compound has a 10-carbon chain with a terminal phenyl group, which although it does not present a significant polarity, is a bulky group that can moderately inhibit hydrophobic repulsion of the aliphatic chain. In turn, the phenyl group decreases the affinity contrast between the head and the tail of the molecule, increasing its tendency to dissolve in the aqueous phase.[49]

Conclusions

Through HPLC-DAD analysis, the feasibility of MSPD as a method to extract bioactive compounds derived from *H. pluvialis* aplanospores red *versus* the cell disruption method frequently applied has been demonstrated. In general, MSPD produced higher recoveries of the carotenoids used as markers than the standard cell disruption using ethanol as solvent. PCA divided the identified analytes into three main groups: carotenoids, esters, and fatty acids, allowing an efficient and accurate characterization of individual compounds belonging to each category. Targeted analysis by UHPLC-QToF permitted the identification of a total of 9 carotenoid compounds and esters and 8 essential fatty acids. Untargeted analysis identified 3 new compounds (*N*-oxopalmitic acid, *N*-hydroxypalmitic acid and 10-phenyldecanoic acid) not previously found in *H. pluvialis* aplanospores red. Both, carotenoid compounds and essential fatty acids showed high affinity for the solvents ethanol and ethyl lactate, while fatty acids derivatives showed higher affinity for the isovolumetric ratios ethyl lactate/water and ethanol/water. At the same time, new compounds identified in microalga showed greater affinity for water as extraction solvent. The combination of green solvents together with a deep analytical characterization allowed to obtain extracts rich in a variety of bioactive compounds, whose synergistic effect opens the possibilities of new potential industrial uses.

Author contributions

Conceptualization, A. O., C. G.-J. and M. L.; methodology, A. O., S. P., S. F, C. G.-J. and M. L.; formal analysis, C. G.-J. and M. L.; investigation, A. C., S. P.; writing—original draft preparation, A. C.; writing—review and editing, S. F., C. G.-J. and M. L.; supervision, C. G.-J. and M. L.; project administration, C. G.-J. and M. L.; funding acquisition, A. O, S. F. M. L.

Funding

This work was supported by project EQC2018-005011-P (Ministry of Science, Innovation and Universities, Spain). The authors belongs to CRETUS Institute and CRETUS Strategic Partnership (ED431E 2018/01) co-funded by FEDER (UE).

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

A. C. acknowledges CRETUS Partnership for his research contract.

Notes and references

1 Â. P. Matos, in *Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications*, ed. C. Galanakis, Elsevier, London, United Kingdom, 1st edn, 2019, pp. 63–96.
2 S. Pereira Bouzas, PhD thesis, University of Santiago de Compostela, Spain, 2019.
3 A. Solovchenko and K. Chekanov, in *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*, ed.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

K.-Y. Paek, H. N. Murthy and J.-J. Zhong, Springer, Dordrecht, Netherlands, 1st edn, 2014, pp. 63–91.
4 J. Liu, J. van der Meer, L. Zhang and Y. Zhang, in *Microalgal Production for Biomass and High-Value Products*, ed. Stephen P. Slocombe and John R. Benemann, CRC Press, Florida, US, 1st edn, 2016, pp. 267–293.
5 G. Panis and J. R. Carreon, *Algal Res.*, 2016, **18**, 175–190.
6 M. C. Ruiz-Domínguez, C. Espinosa, A. Paredes, J. Palma, C. Jaime, C. Vílchez and P. Cerezal, *Molecules*, 2019, **24**, 1–17.
7 T. O. Butler, G. J. McDougall, R. Campbell, M. S. Stanley and J. G. Day, *Biology*, 2018, **7**, 1–15.
8 M. M. R. Shah, Y. Liang, J. J. Cheng and M. Daroch, *Front. Plant Sci.*, 2018, **7**, 531.
9 A. Molino, A. Iovine, P. Casella, S. Mehariya, S. Chianese, A. Cerbone, J. Rimauro and D. Musmarra, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2018, **15**, 2436.
10 S. Sasidharan, Y. Chen, D. Saravanan, K. M. Sundram and L. Yoga Latha, *Afr. J. Tradit., Complementary Altern. Med.*, 2011, **8**, 1–10.
11 M. Garcia-Vaquero, V. Ummat, B. Tiwari and G. Rajauria, *Mar. Drugs*, 2020, **18**, 172–187.
12 A. Molino, J. Rimauro, P. Casella, A. Cerbone, V. Larocca, S. Chianese, D. Karatza, S. Mehariya, A. Ferraro, E. Hristoforou and D. Musmarra, *J. Biotechnol.*, 2018, **283**, 51–61.
13 R. Gallego, K. Arena, P. Dugo, L. Mondello, E. Ibáñez and M. Herrero, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, **412**, 589–599.
14 M. Bueno, R. Gallego, J. A. Mendiola and E. Ibáñez, in *Grand Challenges in Algae Biotechnology*, ed. A. Hallmann and P. H. Rampelotto, Springer, Cham, Switzerland, 2019, pp. 399–425.
15 H. M. Amaro, I. Sousa-Pinto, F. X. Malcata and A. C. Guedes, in *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*, ed. R. Muñoz and C. Gonzalez-Fernandez, Woodhead Publishing, Duxford, United Kingdom, 1st edn, 2017, pp. 369–400.
16 C. Garcia-Jares, M. Sanchez-Nande, J. P. Lamas and M. Lores, *Bioengineering*, 2017, **4**, 87–97.
17 D. Wianowska and M. Gil, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2019, **112**, 29–51.
18 Polyphenol Extract From White-Grape Residue, Spain Pat., ES2443547B2, Universidade de Santiago de Compostela, 2018.
19 G. Jin, Y. Liu, S. Xue, Y. Meng, J. Yan, F. Yang, Z. Guo, J. Zhu and X. Liang, *Chromatographia*, 2019, **82**, 1593–1601.
20 A. del Pilar Sánchez-Camargo, N. Pleite, M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibáñez and B. Gilbert-López, *J. Supercrit. Fluids*, 2017, **128**, 112–120.
21 S. Santoyo, M. Plaza, L. Jaime, E. Ibañez, G. Reglero and F. J. Señorans, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 8522–8527.
22 M. Lores, M. Pájaro, M. Álvarez-Casas, J. Domínguez and C. García-Jares, *Talanta*, 2015, **140**, 134–142.
23 K. H. Yim, M. Stambouli and D. Pareau, in *Green Chemistry and Sustainable Technology*, Springer, Heidelberg, Berlin, 2014, pp. 221–235.
24 C. Ruttkies, E. L. Schymanski, S. Wolf, J. Hollender and S. Neumann, *J. Cheminf.*, 2016, **8**, 3.
25 S. Wolf, S. Schmidt, M. Müller-Hannemann and S. Neumann, *BMC Bioinf.*, 2010, **11**, 148.
26 S. Boussiba, *Physiol. Plant.*, 2000, **108**, 111–117.
27 V. V. De Rosso and A. Z. Mercadante, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 5062–5072.
28 M. Calderón-Santiago, F. Priego-Capote and M. D. Luque De Castro, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 7558–7565.
29 J. J. Ríos, M. Roca and A. Pérez-Gálvez, *J. Anal. Methods Chem.*, 2015, **2015**, 1–10.
30 P. Otero, S. K. Saha, J. M. Gushin, S. Moane, J. Barron and P. Murray, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**, 4659–4667.
31 C. Syms, in *Encyclopedia of Ecology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2nd edn, 2018, pp. 566–573.
32 X. Qiao, L. Yang, Q. Gao, S. Yang, Z. Li, J. Xu and C. Xue, *J. Sci. Food Agric.*, 2019, **99**, 2226–2235.
33 M. C. P. P. Reis-Mansur, J. S. Cardoso-Rurr, J. V. M. A. Silva, G. R. de Souza, V. d. S. Cardoso, F. R. P. Mansoldo, Y. Pinheiro, J. Schultz, L. B. Lopez Balottin, A. J. R. da Silva, C. Lage, E. P. dos Santos, A. S. Rosado and A. B. Vermelho, *Sci. Rep.*, 2019, **9**, 1–14.
34 M. Hadjipieri, E. C. Georgiadou, A. Marin, H. M. Diaz-Mula, V. Goulas, V. Fotopoulos, F. A. Tomás-Barberán and G. A. Manganaris, *BMC Plant Biol.*, 2017, **17**, 102.
35 S. Rivera, F. Vilaró and R. Canela, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **400**, 1339–1346.
36 M. Rauytanapanit, K. Janchot, P. Kusolkumbot, S. Sirisattha, R. Waditee-Sirisattha and T. Praneenararat, *Mar. Drugs*, 2019, **17**, 328–340.
37 T. Kajiwara, M. Kashibe, K. Matsui and A. Hatanaka, *Phytochemistry*, 1991, **30**, 193–195.
38 M. Dammak, S. M. Haase, R. Miladi, F. Ben Amor, M. Barkallah, D. Gosset, C. Pichon, B. Huchzermeyer, I. Fendri, M. Denis and S. Abdelkafi, *Lipids Health Dis.*, 2016, **15**, 209.
39 M. Schröder, H. Abdurahman, T. Ruoff, K. Lehnert and W. Vetter, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2014, **91**, 1695–1702.
40 W. Schmidt, G. Drews, J. Weckesser, I. Fromme and D. Borowiak, *Arch. Microbiol.*, 1980, **127**, 209–215.
41 W. Schmidt, G. Drews, J. Weckesser and H. Mayer, *Arch. Microbiol.*, 1980, **127**, 217–222.
42 C. Thane and S. Reddy, *Nutr. Food Sci.*, 1997, **97**, 58–65.
43 O. Parniakov, F. J. Barba, N. Grimi, L. Marchal, S. Jubeau, N. Lebovka and E. Vorobiev, *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, 2015, **27**, 79–85.
44 Y. L. Kua, S. Gan, A. Morris and H. K. Ng, *Sustainable Chem. Pharm.*, 2016, **4**, 21–31.
45 B. K. Ishida and M. H. Chapman, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 1051–1059.
46 C. S. M. Pereira, V. M. T. M. Silva and A. E. Rodrigues, *Green Chem.*, 2011, **13**, 2658–2671.
47 The Dial Corporation, Disinfecting and Antimicrobial Compositions, *US Pat.*, 20060171978A1, The Dial Corporation, 2006.
48 N. V. Bhagavan and C.-E. Ha, in *Essentials of Medical Biochemistry*, ed. N. V. Bhagavan and C.-E. Ha, Elsevier, London, United Kingdom, 2nd edn, 2015, pp. 11–20.
49 A. M. Brzozowska, F. Mugele and M. H. G. Duits, *Colloids Surf., A*, 2013, **433**, 200–211.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2020
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.1.2. Multicomponent bioactive extract from red stage *Haematococcus pluvialis* wet paste: avoiding the drying step and toxic solvents

Aly Castillo, Simón Pereira, Ana Otero, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores

Journal of Applied Phycology, 34 (2022), 10537
ISSN: 0921-8971, 1573-5176, Springer
DOI: 10.1007/s10811-022-02712-3

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Journal of Applied Phycology (2022) 34:1537–1553
https://doi.org/10.1007/s10811-022-02712-3

Multicomponent bioactive extract from red stage *Haematococcus pluvialis* wet paste: avoiding the drying step and toxic solvents

Aly Castillo[1,2] · Simón Pereira[3] · Ana Otero[3] · Carmen Garcia-Jares[1,2] · Marta Lores[2]

Received: 2 September 2021 / Revised and accepted: 14 February 2022 / Published online: 7 March 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

This study provides an efficient alternative by extracting bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* via matrix solid-phase dispersion (MSPD) from its wet form, reducing one of the process steps with the greatest economic impact, the drying of the microalga. To obtain a suitable extract for nutraceutical purposes, solvents with the generally recognised as safe (GRAS) designation (ethanol, ethyl lactate, and ethyl acetate) with limitations of use (acetone) and extractants with higher toxicity such as methanol and methyl-tert-butyl ether (MTBE) are contrasted. Through the optimisation of the extractive process, ethanol, a GRAS solvent, presents the best overall recovery for carotenoid compounds and fatty acids, showing an antioxidant activity of 1.58 mmolTE g^{-1} DW, comparable to its synthetic alternative of petrochemical origin without the drawback of having limitations in its food use. In addition, the identification of the phenolic compounds, phloroglucinol, *p*-coumaric acid, gallic acid, and catechin, not previously characterised in red stage *H. pluvialis*, provides a response to the phenolic activity present in the extract (24.65 mmolGAE g^{-1} DW). Comparison of the extractive efficiency obtained with the main methods for the extraction of carotenoids and fatty acids in *H. pluvialis*, in contrast to the proposed method, shows a positive feasibility of this approach.

Keywords Microalgae · GRAS solvents · Carotenoids · Polyphenols · Antioxidants · Matrix solid-phase dispersion (MSPD)

Introduction

About 95% of the astaxanthin produced worldwide is the result of synthetic production (Jannel et al. 2020), which, although it has proven not to be as beneficial as its natural counterpart, its low manufacturing costs in relation to extraction from *Haematococcus pluvialis* have made it the preferred route to produce this carotenoid (Panis and Carreon 2016). Accordingly, the optimisation of extraction methods for maximum astaxanthin recovery from *H. pluvialis* has become one of the main objectives dealing with this microalga (Mularczyk et al. 2020). The current industrial process generally follows a two-stage approach, where green vegetative cells and astaxanthin-rich aplanospores are separately produced. The separation of both stages allows precise optimisation towards enhancing cell growth in the former and boosting astaxanthin synthesis in the latter. The use of optimised growth media that promote cell division in a harmonious environment is nowadays a common practice, whilst subjecting the culture to conditions that completely hinder or diminish cellular growth is used to trigger astaxanthin accumulation (Fábregas et al. 2000). Amongst the latter, nitrogen starvation and a high irradiance may be used in combination yielding high astaxanthin contents (Pereira and Otero. 2020). Once cultivation ends, *H. pluvialis* biomass may be recovered in the form of a de-watered concentrated paste by centrifugation. The microalgal paste may be then disrupted and dried, which improves final extraction efficiency (Lorenz and Cysewski. 2000).

The optimisation of the industrial production of astaxanthin has been mainly focused on improving carotenogenesis during the red stage, modifying the culture conditions

✉ Aly Castillo
alyjesus.castillo.zamora@usc.es

1 CRETUS, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela, Spain

2 LIDSA, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela, Spain

3 Institute of Aquaculture, Department of Microbiology and Parasitology, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela, Spain

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

to obtain a microalga loaded with as much astaxanthin as possible. In fact, over the last 30 years, studies based on this microalga have optimised the culture conditions to obtain a biomass with 2–6% (w/w) of astaxanthin, which seems to be the upper limit for this species (Do et al. 2016). Once the biological capacity of *H. pluvialis* to synthesise this carotenoid has been depleted, other approaches aim to increase astaxanthin production by modifying the last extractive step.

A limited extractive availability of this carotenoid astaxanthin contained in *H. pluvialis*, due to a strong, thick, and rigid cell wall present in its aplanospore stage, is a characteristic hindrance in this alga (Ye et al. 2020). Conventional techniques, such as Soxhlet extraction (Irshad et al. 2019a), have been used to penetrate the cell, but drawbacks that include long extraction times, high temperatures, and toxic solvents turn it into a costly alternative and difficult to apply in the nutraceutical field (Chen et al. 2020). Green solutions such as microwave-assisted extraction (MAE) has been used for the extraction of astaxanthin from *H. pluvialis* (Ruen-ngam et al. 2011). Although it has the advantage of working with wet samples, paradoxically it requires large volumes of solvent in relation to the sample (100:1 acetic ether) as well as temperatures above 40 °C, obtaining 0.8% DW as the highest average recovery, a low yield considering that astaxanthin is 6% of the cells (Kapoore et al. 2018). Similar problems are found with ultrasound-assisted extraction (UAE) or supercritical fluid extraction (SFE), in which the temperatures required for cell disruption generate significant effects on the stability of carotenoid compounds (Zhao et al. 2006). Thus, these approaches face a complex trade-off between disruption efficiency and energy consumption, resulting in complex scaling, such as the balance between optimal operating conditions and extract integrity (Kapoore et al. 2018).

To improve the extraction efficiency of traditional methods, it is indispensable to apply a preliminary drying of the biomass, which is one of the costliest steps in the extraction process (Shah et al. 2016). In highly sophisticated productions, spray drying or lyophilisation is used with barely any impact on the quality of the product (Stramarkou et al. 2017). Less sophisticated drying methods, such as solar drying, may reduce cost of this process step. However, such techniques may compromise the integrity of the carotenoid compound (Molina et al. 2003). There are currently no industrial methods that bypass these procedures due to the single focus on obtaining astaxanthin, which, for refining, requires the removal of moisture in the paste (Ahmed et al. 2015).

A pioneering proposal has focused on the extraction of wet *H. pluvialis* from the microalgae in its red stage using dimethylaminocyclohexane (DMCHA) as the extractive solvent, obtaining significant yields (Huang et al. 2018). In contrast, due to the toxicity of DMCHA, the extract generated, although promising, is incompatible with a nutraceutical purpose. On the other hand, different perspectives have been given to *H. pluvialis* understanding the microalga as a whole, thus assessing its quality not only for its content of this high-value carotenoid, but also as a source of fatty acids, carbohydrates, and proteins (Cerón et al. 2007). Therefore, a direct, scalable, and energy-efficient method to extract bioactive compounds from wet microalgal paste avoiding biomass pre-treatment or subsequent volatilisation of the extractant would be an attractive approach.

A simple technique directly applicable to semi-solid, solid, and viscous samples is matrix solid-phase dispersion. MSPD was first introduced by Barker et al. (1989) as a process for sample preparation, having the advantage of combining maceration, extraction, and filtration in a single process, eliminating centrifugation, drying, and separation steps. This extractive technique incorporates micro-milling through selected disruptive media capable of conferring disruption at the cellular level. In turn, it has a desiccant effect that provides homogeneous chromatographic packing, improving the interactions between the extractive mixture and the extracting solvent, creating a clean and efficient extract, outperforming conventional milling and extraction techniques. Based on these guidelines, Lores et al. (2016) developed and patented a scalable extractive approach, referred to as MSAT (Medium Scale Ambient Temperature systems) for obtaining bioactive extracts at pilot scale. Its applicability on an industrial scale was subsequently demonstrated (Gato et al. 2021; Rama et al. 2021) processing biomasses with a moisture content up to 90% without prior pre-treatment and obtaining high yields. The development of the technique and its applications faithfully comply with the principles of green chemistry (Anastas and Warner 1998).

The application of MSPD in the field of microalgae has been limited, being reported for the first time to obtain bioactive compounds in the marine species *Isochrysis zhangjiangensis* and *Nannochloropsis oculata*; using small amounts of solvent, recoveries, reproducibility, and extractions comparable to techniques such as ultrasound-assisted extraction were achieved (Jin et al. 2019). Meanwhile, the first application to freshwater microalgae was using *H. pluvialis* in its lyophilised state, efficiently obtaining a variety of bioactive compounds (Castillo et al. 2020). The response of this approach was evaluated by comparison with industrial disruptive systems, showing a 20% improvement in the recovery of the main carotenoid compounds astaxanthin, lutein, zeaxanthin, and β-carotene. At the same time, the addition of water to various extractants was proved to give better results in the recovery of amphipathic fatty chains of the omega-3 and omega-6 groups than pure solvents. In this way, the idea of using the original own moisture contained in

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

the microalgae is attractive, eliminating the drying processes and its contradictory subsequent hydration.

Thus, the aim of this research is to obtain an extract rich in bioactive compounds from *H. pluvialis* red aplanospores, without the use of a previous drying step, starting directly from its raw wet form. The extractive efficiency is analysed by contrasting it with specific methodologies for obtaining fatty acids and carotenoids from lyophilised microalgae. Moreover, the antioxidant activity and polyphenolic content are evaluated, as well as the characterisation of the compounds responsible for these activities, to obtain the whole bioactive profile of the generated extract.

Materials and methods

Chemicals and reagents

The standards used for the identification and quantification of the main bioactive compounds contained in *Haematococcus pluvialis* (carotenoids, fatty acids, carbohydrates, and polyphenols) with their CAS numbers, purity, and suppliers are summarised in Supplementary Table S1. MS grade ultrapure water, ethanol, ethyl lactate, ethyl acetate, acetone, methanol, methyl-tert-butyl ether (MTBE), and dimethylformamide (DMF) were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain).

Individual stock solutions of each carotenoid were prepared in DMF according to the supplier's recommendations. Additional dilutions were prepared in ethanol for method calibration, characterisation, and quantification, as this solvent was used for the recovery assays. Apocarotenal, supplied by Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany), was used as internal standard. For the quantification of fatty acids and polyphenols, standards were prepared in ethanol, using nonadecanoic acid supplied by Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) and quercetin supplied by Sigma-Aldrich Chemie GmbH (SIGMA), respectively, as internal standard. For carbohydrate identification, standards were diluted in water and further diluted in ethanol. All solutions were stored in amber glass vials and protected from light at − 20 °C. All solvents and reagents were of analytical grade.

Red stage Haematococcus pluvialis biomass

Haematococcus pluvialis red aplanospore in paste form were recovered from an industrial scale production after 7 days of cultivation under inductive conditions of high irradiance and nitrate starvation. The optimised procurement procedure is described by Pereira and Otero (2020). In summary, *H. pluvialis* cultures were developed in photobioreactors following a two-stage approach. When the green vegetative culture reached the target density, the culture parameters were modified to favour the accumulation of astaxanthin. The astaxanthin-rich microalgal biomass (~5% dry cell weight) was de-watered by centrifugation to a paste with about 25% solid content. Then, the paste was stored frozen at − 20 °C to avoid product degradation.

Matrix solid-phase dispersion

The wet *H. pluvialis* was directly weighed at the different study sizes, on a mortar. Then, SiO_2 (50–70 mesh particle size) (Sigma-Aldrich, Germany) was added as a disrupting agent at the tested ratio, and it was disrupted for 10 min under red light. Disruption was carried out using a glazed porcelain mortar and pistil, to reduce the contact with the porous material and thus avoiding sample loss. A 20 µm PTFE frit was put at the bottom of a MSPD polypropylene cartridge (Fig. 1), as well as 1 g of dispersant. The disrupted microalgae mixture was then transferred to the cartridge and compacted with another PTFE frit on the top. Finally,

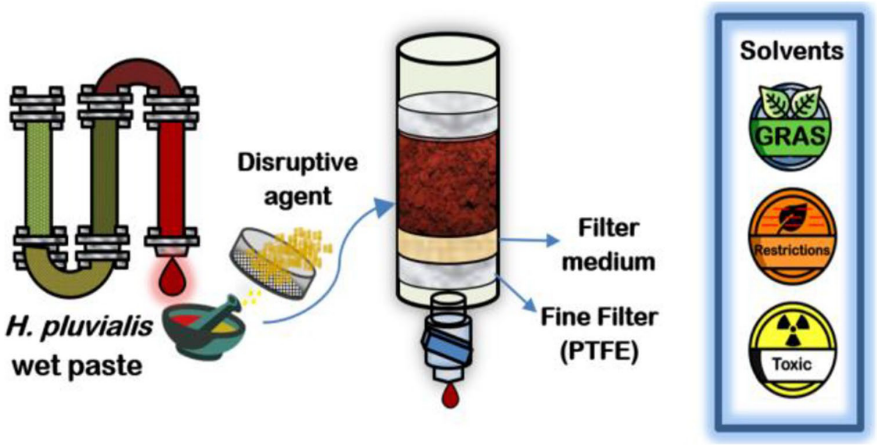


Fig. 1 MSPD extractive procedure for wet *Haematococcus pluvialis* red aplanospore

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

elution was performed with 5 and 15 mL of the corresponding solvent, depending on the assay. The extraction time was maintained constant (20 min) by regulating the flow rate using discharge valve.

Fatty acid recovery

The efficiency of MSPD for the extraction of saturated (SFA), monosaturated (MUFA), and polyunsaturated (PUFA) fatty acids was evaluated employing the Bligh and Dyer method (1959) modified for wall disruption of *H. pluvialis*. Briefly, 30 mg of lyophilised biomass was macerated in 2 mL of chloroform/methanol (1:2, v/v) and kept 24 h at 4 °C in the absence of light. The biomass was then disrupted using a homogeniser for 15 min, which incorporates a high-performance IKA T25 rotor–stator system at 24,000 rpm in an ice bath, preventing heat generation in the disruptive process. The supernatant was then decanted and stored. To ensure complete extraction, 5 mL of extraction mixture was added to the remaining solid and disrupted again for decanting and storage. Subsequently, 4 mL of Milli-Q water was added to each extract, and the contents were gently shaken to remove water-soluble impurities. The tubes were then centrifuged at 1800 × *g* for 10 min for bilayer separation. The lower lipid phase was carefully decanted from the upper residue and its moisture content removed by addition of 1 g sodium sulphate. For separation of the sulphate crystals, the extractive setup performed for MSPD was used, exchanging the filter medium for the sulphate crystals, passing the extract through it, performing a triple function: drying of the sample, separation of the desiccant and the extract, and filtering through a 20-µm PFTE membrane. The lipid extract solvent was volatilised under an extraction hood. These dried lipids were then measured gravimetrically.

Carotenoid recovery

To analyse the extractive efficiency of MSPD for the recovery of the main carotenoids in *H. pluvialis*, it was compared with the method developed by Kim et al. (2013) for the extraction of carotenoids from *Dunaliella tertiolecta*. Due to the difference in cell wall hardness between *H. pluvialis* and *D. tertiolecta*, the disruptive step was modified by adding mechanical disruption. Initially, 10 mg of lyophilised *H. pluvialis* sample was extracted with 1 mL of acetone and vortexed for 20 s. Cell wall disruption was carried out in the same way as in the lipid recovery process. The extract was then centrifuged at 1800 × *g* for 10 min. The extraction was repeated four times until the extract became colourless. The supernatant was then collected and filtered through a 0.22-µm PTFE membrane. A 0.7 mL aliquot was removed from the final extract and mixed with 0.2 mL of MiliQ water and 0.7 mL of hexane containing 0.1% w/w BHT. After gentle mixing, the top layer of hexane (0.5 mL) was separated and reconstituted in 0.5 mL ethanol. The procedure was developed in triplicate in a dry environment under red light to avoid possible degradation of the extracts.

UHPLC-QToF analysis (untargeted characterisation and fatty acids, carbohydrates, and polyphenols quantification)

For the initial analysis of carotenoid compounds, fatty acids, and carbohydrates, the obtained extracts were stored at − 20 °C in their respective solvents, adding 0.1% w /w BHT to avoid degradation. In turn, for the targeted quantification of the dried lipids obtained from the recovery study, the extracts were volatilised under a N_2 stream and reconstituted in 500 µL of ethanol. For the characterisation and subsequent quantification of the polyphenols contained in the ethanolic extract of *H. pluvialis* via MSPD, and for all extracts analysed via UHPLC-QTOF, a previous filtration through 0.22-µm PTFE filters was performed.

Calibration standards for fatty acids and carbohydrates were prepared in ethanol covering a concentration range with six levels (0.1; 0.3; 0.5; 1; 3; 5 mg L^{-1}). For the polyphenolic study, lower concentration ranges were injected, with 8 levels (0.01; 0.03; 0.05; 0.1; 0.3; 0.5; 1; 3 mg L^{-1}). Each level was injected at least three times. The method showed a directly proportional relationship between the concentration of each compound and the chromatographic response, obtaining coefficients of determination (R^2) higher than 0.992 in all cases, (Supplementary Figure S1). The quantification of the real samples was carried out by external calibration using stock solutions of the compounds studied in ethanol. The corresponding internal standards were added to the calibration standards and samples to correct for possible analytical variability. In all cases, the chromatographic response was equivalent in the spiked samples as well as in the real samples and in the calibration curve. Therefore, it was used as an additional measure to control the procedure, but no correction of the internal standard (IS) was necessary.

Based on the chromatographic protocol described by Otero et al. (2017) focused on lipid quantification of *H. pluvialis*, modifications were made for the combined untargeted characterisation and subsequent targeted analysis (fatty acids, carbohydrates, and polyphenols). An Elute UHPLC 1300 coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometry (QToF) Compact Instrument (Bruker Daltonics, Germany) was used. An Intensity Solo HPLC column C18 (2.0 µm, 100 mm × 2.1 mm) obtained from Bruker Daltonics was employed. The column temperature was set at 40 °C, and the injection volume was 2 µL. The mobile phases were constituted by A (water) and B (ethanol), both containing 0.1% of formic acid. The gradient starts at 95% (A) for 0.4 min, then increased up to 65% (A) in 0.1 min,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

and to 100% (B) in 7 min (held 5 min). The flow rate was 0.25 mL min^{-1}, and the total run time was 15 min. The nebuliser pressure and temperature were set at 2 bar and 325 °C, respectively. The dry gas flow rate was set at 5 L min^{-1}. Acquisition was done in the range m/z 10–1000 in negative and positive ionisation, showing the standards analysed in Supplementary Table S2.

For the identification of compounds by untargeted analysis, the computational package SmartFormula contained in the MetaboScape Version 4.0.4 (Build 19) analysis software was used. This tool provides the characterisation of analytes generated by fragmentation via UHPLC-QToF through comparison with the exact mass and isotopic profile of each compound. For the prediction of the molecular formula of the compounds, the compound crawler tool is used and corroborated by their structural stability with the MetFrag software, which combines the analysis of the in silico fragmentation of the possible candidates with the search in the main databases (ChemSpider, ChEBI, PubChem) of online chemical structures.

HPLC–DAD analysis (carotenoids)

For the quantification of the carotenoids present in the extracts, as the recovery study, a filtration process was carried out using a 0.22-µm PTFE membrane. Carotenoid standards were prepared in ethanol covering a concentration range with five levels (0.5, 1, 5, 10, 20 mg L^{-1}). The same analytical rigour of the HPLC–DAD study was followed for the characterisation and quantification of the carotenoid compounds via UHPLC-QTOF. Coefficients of determination (R^2) higher than 0.991 were obtained in all cases and are reported in Supplementary Figure S2. Quantification of the real samples was performed by external calibration using standard solutions of the studied compounds in ethanol, starting from a stock solution in DMF. Internal standard correction (apocarotenal) was used as an additional measure to control the procedure, but correction was not necessary.

A Jasco AS-4100 chromatographic equipment consisted of an AS-4150 autosampler coupled to a PU-4180 quaternary pump and an MD-4010 PDA detector was employed. The separation was conducted on a Kinetex C18 column (4.6 mm × 150 mm, 5 µm) (Phenomenex, USA). The column temperature was set at 30 °C, and the injection volume was 5 µL. The mobile phases were water (A) and methanol (B), both containing 1% of formic acid The flow rate was 1 mL min^{-1}, starting with 80% of B, increasing progressively until 100% B in 10 min. The total run time was 25 min.

Determination of total polyphenolic index

The Folin-Ciocalteu assay was used to determine the total polyphenolic index of the extracts (Singleton and Rossi 1965). Briefly, a total of 5 mL of diluted extract (with a dilution factor of 40 in MiliQ water) was mixed with 100 µL of Folin-Ciocalteu reagent and shaken. Then, 1 mL of a concentrated solution of sodium carbonate 20% (w/v) prepared in ultrapure water was added. The solution was vortexed and isolated from light for 30 min. Then, the absorbance was measured at 760 nm. To express the total polyphenolic index values, gallic acid was used as calibration standard and reported as millimoles of gallic acid equivalent (mmolGAE) per gram of dry microalga (gDW).

Antioxidant activity assay

To evaluate the antioxidant activity of the samples, 2,2-diphenylyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) and 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) assays were employed. For the DPPH assay, the guidelines described by Álvarez-Casas et al. (2016) were followed. Accordingly, 100 µL of diluted extract was introduced in a falcon tube, and 3.9 mL of 0.1 mM DPPH solution in methanol was added. The mixture was vortexed and isolated from light for 30 min. Then, the decrease in absorbance of the resulting mixture was measured at 515 nm. Quantification of the antioxidant activity was performed by comparison with the Trolox standard and expressed as Trolox Equivalent Antioxidant Activity (TEAC) per microalga dry weight as mmolTE g^{-1} DW. The uptake of ABTS radical cations ($ABTS^+$) by the extracts was determined as described by Xiao et al. (2020) with minor modifications. Briefly, a 7 mM stock solution of ABTS was prepared in ethanol by reacting it with 2.45 mM potassium persulphate dissolved in ethanol. The mixture was stored in the dark at 25 °C for 16 h. The solution was dissolved in ethanol to obtain an absorbance of 0.700 (± 0.004) at 752 nm. The extracts were diluted to obtain a range of 10–80% inhibition when 50 µL of this was added to 4.5 mL of the stock solution. Extracts were allowed to react for 7 min with the $ABTS^+$ radical in the dark. The result was expressed as mmolTE g^{-1} DW.

Results

Preliminary MSPD experiments

Solvent selection

Before MSPD optimisation, preliminary analysis to evaluate the influence of the elution solvent on the extraction efficiency of fatty acids, carotenoids, and carbohydrates

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

was performed. Ethyl acetate (EtAc), ethyl lactate (lactate), and ethanol (EtOH) recognised by the Food and Drugs Administration (FDA) as GRAS solvents were tested and compared with acetone (AcOH), methanol (MeOH), and MTBE. Figure 2 illustrates the relative overall MSPD extractive profile for the three solvent groups considered from red stage *H. pluvialis* wet paste.

All tested solvents showed fairly similar results in terms of their carotenoid and fatty acid extraction efficiency. Amongst GRAS solvents, ethanol showed the highest extraction efficiency, only 4% lower than that of MTBE for carotenoids and 2% lower than that of methanol for fatty acids. To understand the behaviour of the different solvents tested, an analysis was then performed for each family of compounds: carotenoids, fatty acids, and carbohydrates. The solvent behaviour analysis for each family of compounds is detailed below.

Carotenoids

Once the overall carotenoid profile has been reported, an approach towards the individual response of these bioactive compounds is necessary. *H. pluvialis* in its red phase is characterised by a rich carotenoid content (up to 6%), with astaxanthin having the highest concentration (Cohen 1999). However, only 5% of the total astaxanthin is found in its free state, being generally present in esterified form, mainly coupled to palmitic, oleic, and linoleic acids (Shah et al. 2016). Figure 3a shows the individual response of the astaxanthin characterised in the preliminary study, as well as its respective monoesters (AME) coupled to C18:1 (oleic acid), C18:2 (linoleic acid), and C18:4 (stearidonic acid) acids for the selected solvents.

In a second approach other carotenoids were identified in *H. pluvialis* paste: canthaxanthin, diadinoxanthin, and phoenicoxanthin, which extraction efficiency in the tested solvents is depicted in Fig. 3b. The response of the neoxanthin/violaxanthin and zeaxanthin/lutein isomers is plotted together.

Fatty acids

The relative response for the most relevant fatty acids in *H. pluvialis* wet paste was compared. Figure 4a shows the results obtained for the saturated fatty acids (SFA) and Fig. 4b those for the monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) groups. The extraction efficiency presents a general trend: MeOH > EtOH > AcOH > MTBE > EtAc > lactate. To highlight the extractive behaviour of each solvent with respect to the overall mean of the respective compound, an average line is drawn.

Carbohydrates

Haematococcus pluvialis under stress conditions (e.g., temperature variations, nutrient starvation, light stress, and acidity) stored around 40% w/w of the total cellular carbohydrate content (Shah et al. 2016). To assess in detail the affinity profile of the solvents studied in the carbohydrate extraction, two main sugars, which represent the main carbohydrate content in the microalgae, are shown in Fig. 5. Hence, the high affinity for methanol, ethanol, and acetone is highlighted, in contrast to solvents such as ethyl lactate which generates an extract highly refined in these carbohydrate compounds.

MSPD extraction optimisation design

The diverse extraction efficiency shown by the tested solvents for the fatty acids and carotenoids creates a compromise situation. It was necessary to select a solvent with the

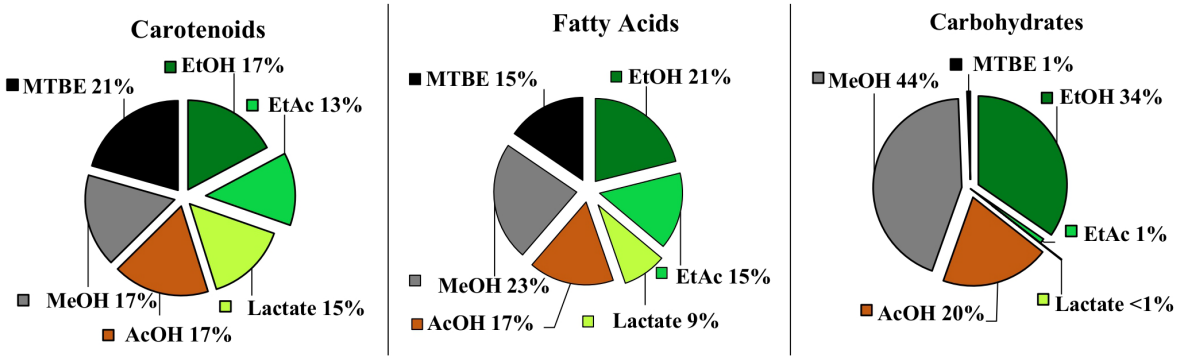


Fig. 2 Overall MSPD extraction efficiency of three main families of compounds in aplanospore stage *H. pluvialis* wet paste (25% solid content) depending on the type of elution solvent used: GRAS (green scale), severely use-limited (AcOH, brown), and non-GRAS (MeOH and MTBE, black scale)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

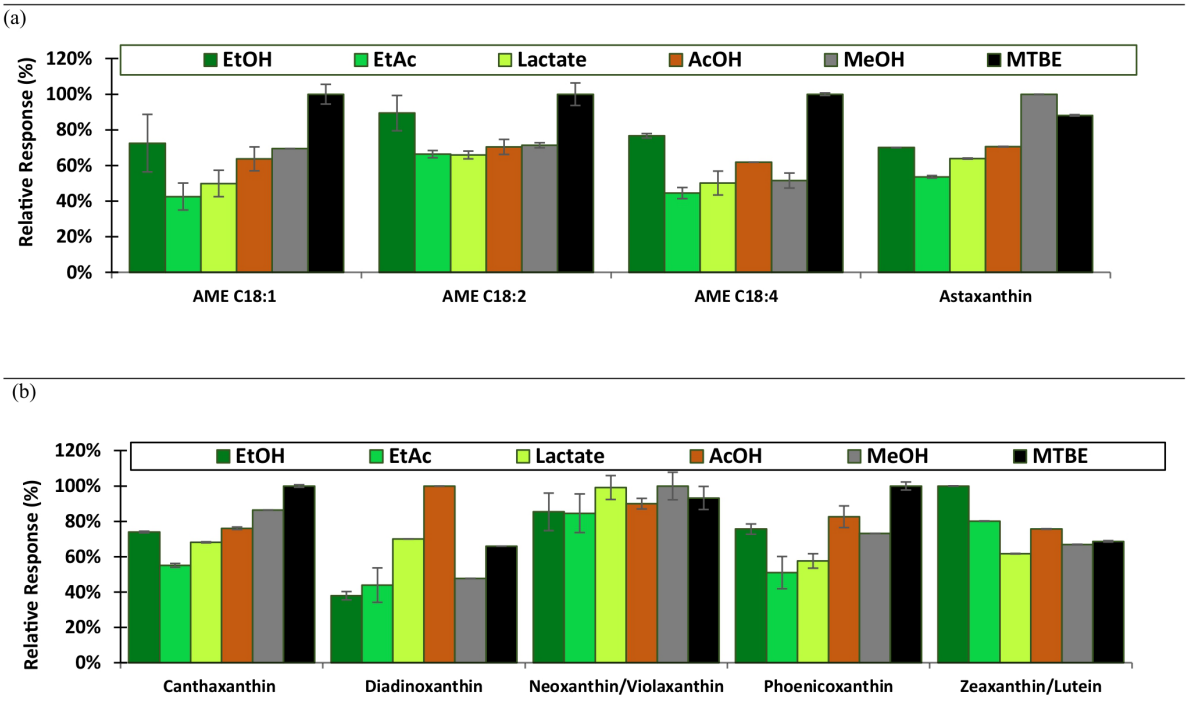


Fig. 3 Relative response of the *H. pluvialis* paste main carotenoids and their esters in GRAS solvents (green scale), severely use-limited (AcOH, brown), and non-GRAS (MeOH and MTBE, black scale). AME astaxanthin monoester

highest efficiency to extract the bioactive compounds being suitable for nutraceutical purposes. Compared to the non-GRAS solvents, ethanol showed an overall response 2% lower than the best solvent (methanol), presenting a uniform performance for the considered compounds, plus a stable profile within the analytes in each family. Thus, an optimisation procedure for extraction of wet red stage *H. pluvialis* via MSPD was carried out using ethanol as the extraction solvent.

To analyse the response of red stage concentrated paste (25% w/v) of *H. pluvialis* to the modification of the main extraction parameters by MSPD, an optimisation design was performed starting from the microalga in its wet state. In this fine design, the critical variables affecting extraction, sample mass, dispersant/sample ratio, and extraction solvent volume, were optimised. They were established based on previous experience in MSPD extractions using wet organic samples (Rubio et al. (2018) and Castillo et al. (2020)). Extraction (solvent elution) time and disruption time were set at 20 min and 10 min, respectively (Hoff and Pizzolato 2018). Table 1 summarises the factors and their selected levels.

In the case of the ratio dispersant/sample mass, a minimum value of 4 was established, due to the wet nature of the sample. Figure 6 shows that ratios lower than 4:1 resulted on a heterogeneous and agglutinated mixture, unsuitable for its treatment in the MSPD extraction column.

The main effect plots are depicted in the Pareto charts of Fig. 7, revealing statistical significance of the parameters A: sample size and C: extraction solvent volume, for both fatty acids and carotenoids.

Although the dispersant:sample mass ratio does not show a statistically significant effect on the extraction of the compounds, a ratio 8:1 operationally improved both compaction and extractive bed size. However, a larger bed size generates a larger solvent path (higher tortuosity). This phenomenon is depicted in Fig. 8, which shows the effect of each parameter studied with the response obtained for carotenoids and fatty acids. In this last case, increasing the dispersant:sample mass ratio generated only a discrete improvement compared to its adverse effect on carotenoid extraction.

MSPD extraction efficiency

The optimised MSPD-based extraction process was able to generate a multicomponent extract from wet paste of *H. pluvialis* in its red stage without requiring any pretreatment of the microalgae. The extraction efficiency of the proposed method was compared with reference methods for the isolation and recovery of carotenoids and fatty

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

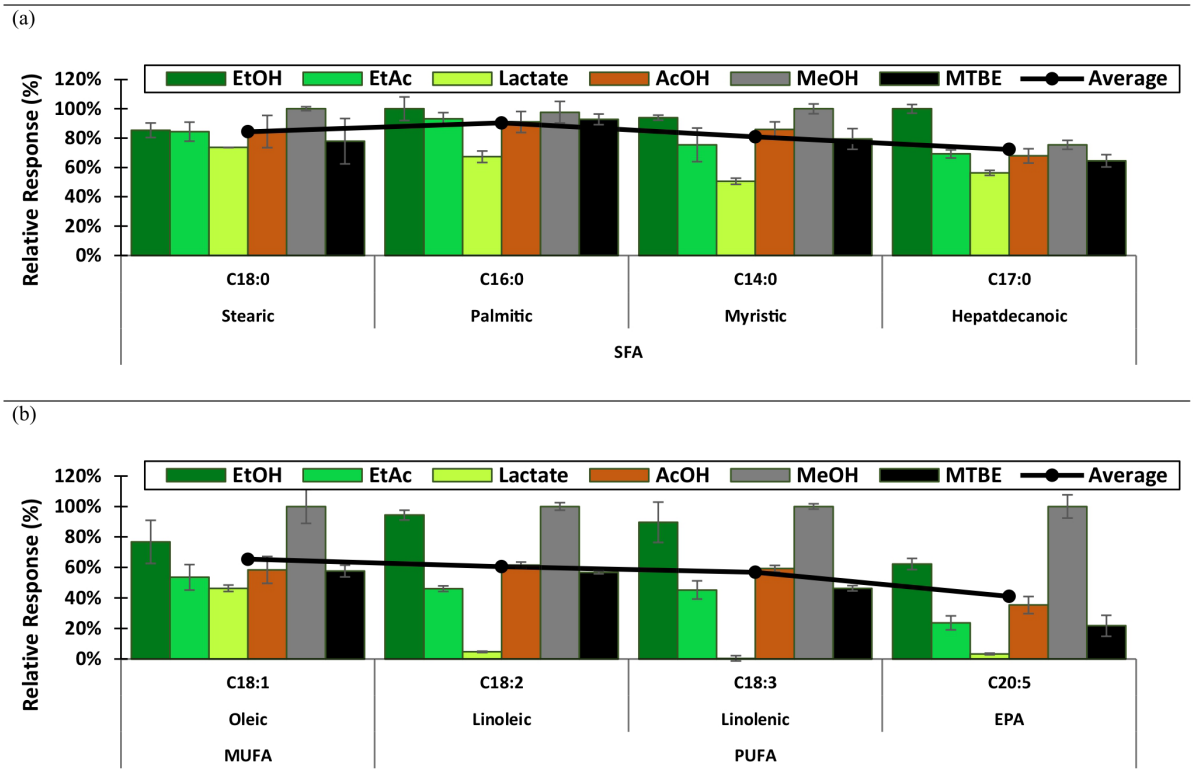


Fig. 4 Relative response of the *H. pluvialis* paste main fatty acids in GRAS solvents (green scale), severely use-limited (AcOH, brown), and non-GRAS (MeOH and MTBE, black scale)

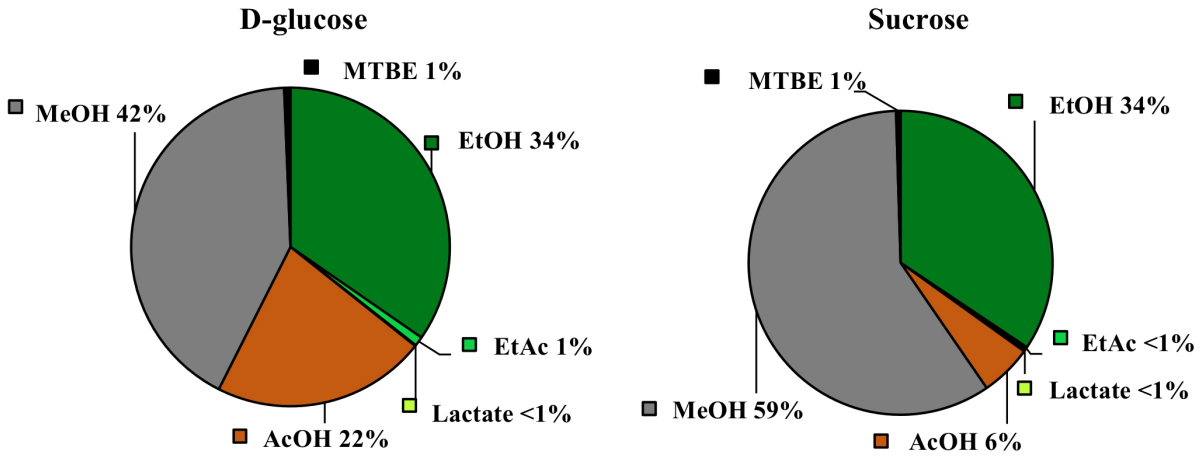


Fig. 5 Relative response of the *H. pluvialis* paste main carbohydrates in GRAS solvents (green scale), severely use-limited (AcOH, brown), and non-GRAS (MeOH and MTBE, black scale)

acids from microalgae. The results of the comparison, as well as the characterisation of the polyphenols and the evaluation of the antioxidant activity of the extract, are detailed below.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 1 Extraction parameters and levels used in the optimisation design for the extraction of *H. pluvialis* paste via MSPD

Factors	Low	High	Units
Sample mass	1	2	(g)
Dispersant/sample	4	8	(g g^{-1})
Extraction solvent volume	5	15	(mL)

Carotenoids

The reference method (RM) selected to evaluate the efficiency of MSPD to extract carotenoids from wet *H. pluvialis* paste was that proposed by Kim et al. (2013) for the recovery of carotenoids from *D. tertiolecta*, adapted for the strong cell wall disruption of *H. pluvialis*. From Fig. 9, which provides a comparative graph of the extraction results achieved by both methods for free astaxanthin, canthaxanthin, beta-carotene, and the total of zeaxanthin/lutein isomers, it is clearly shown the improvement in the extraction of carotenoids when MSPD is applied. An average difference of 55% in the recovery between both methods has been obtained, showing a similar behaviour for all compounds. This better efficiency of MSPD for carotenoid extraction was also found in our previous study using lyophilised *H. pluvialis* (Castillo et al. 2020).

Fatty acids

The extraction efficiency of fatty acids by MSPD was compared to the Bligh and Dyer (1959) RM. This method has been tested in *H. pluvialis* for different lipid chains (from C12 to C20) extraction, generating the highest global results compared to methodologies such as Folch, hypochlorous acid treatment, and acid-catalysed hot-water extraction (Otero et al. 2017). Besides, the option of a prior saponification of *H. pluvialis* was discarded, as its effect has been

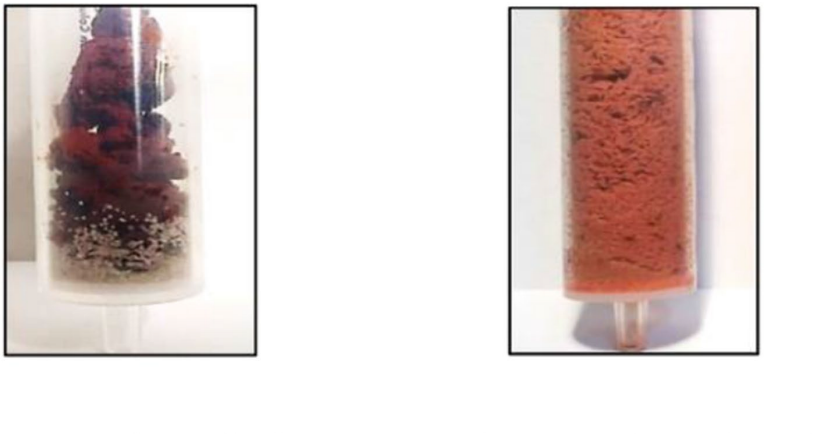


Fig. 6 The MSPD column setup at dispersant:sample mass ratios 2:1 and 4:1

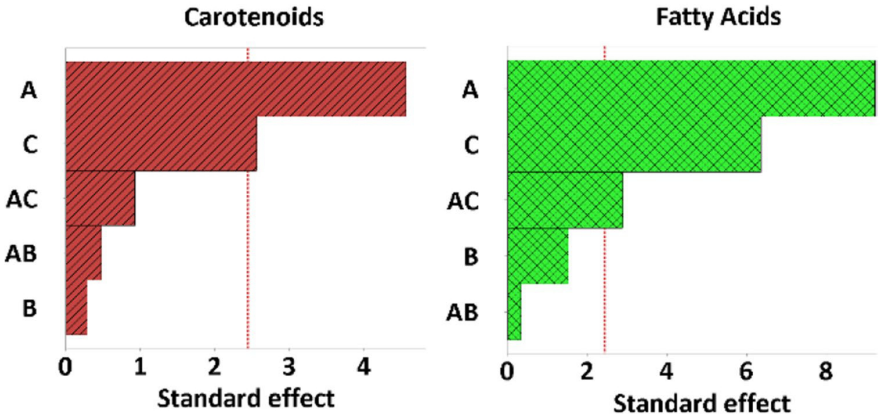


Fig. 7 Pareto charts showing the influence of **A**: sample size; **B**: dispersant/sample ratio; **C**: extraction solvent volume, on MSPD extraction of carotenoids and fatty acids from *H. pluvialis* wet paste

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

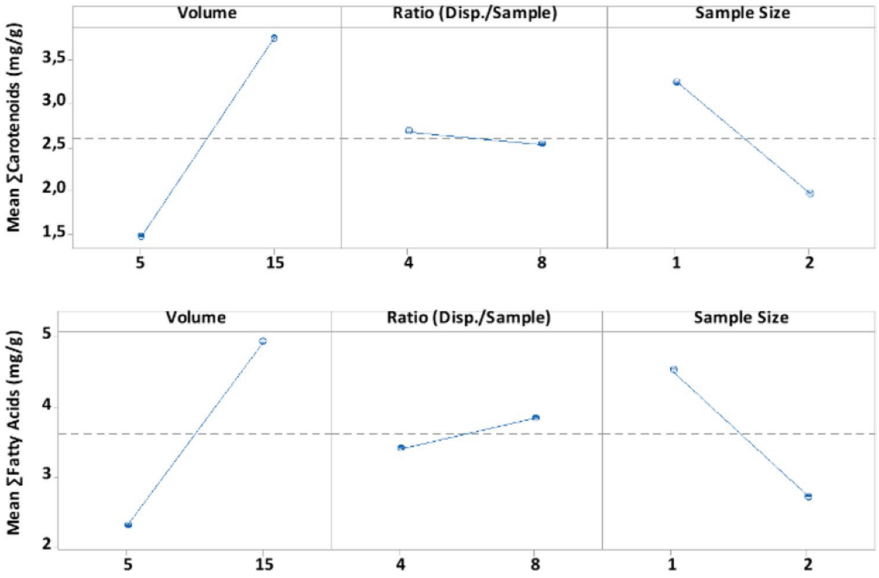


Fig. 8 Effect of ethanol volume, sample size, and dispersant:sample mass ratio in the *H. pluvialis* wet paste (24% w/v) MSPD extraction

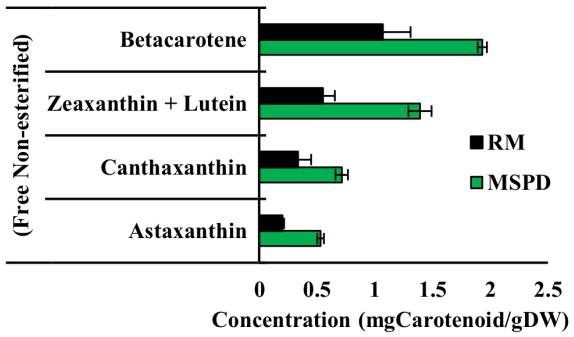


Fig. 9 Comparison of the extraction efficiency of MSPD vs reference method (RM) for the main carotenoids in red stage *H. pluvialis* wet paste (25% w/v)

proved to be indifferent or disadvantageous on the overall lipid recovery (Otero et al. 2017). The result of the comparative analysis is shown in Fig. 10.

The fatty acids were divided into 2 groups according to the concentration in the microalgae. In addition, a blue-coloured surface is plotted to highlight the absolute difference of the recoveries obtained by both methods. This surface reveals a higher relative extraction by the MSPD as a function of the RM when the unsaturation in the lipid compounds increases. In the case of palmitic acid (C16:0), the recovery by RM is 15% lower, decreasing slightly for linoleic acid (C18:2) with 22%. However, for linolenic acid (C18:3), the difference is even more marked, with MSPD showing a 68% improvement in extraction.

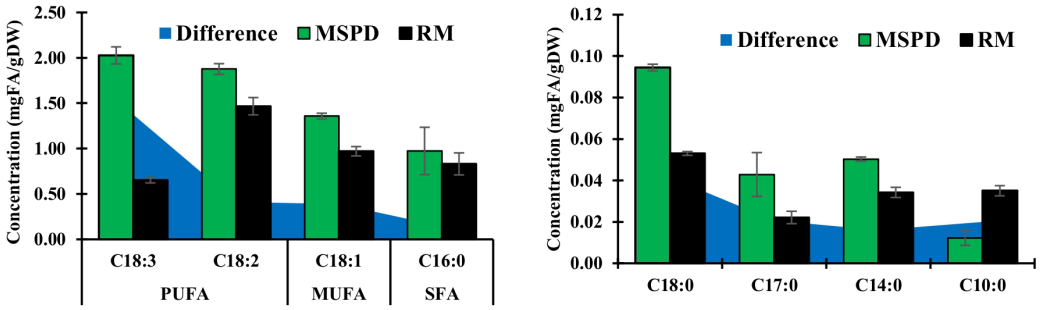


Fig. 10 Comparison of the extraction efficiency of the MSPD vs reference method (RM) for the main fatty acids contained in red stage *H. pluvialis* wet paste (25% w/v)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Polyphenolic comprehensive analysis

In a first approach, the total polyphenol content (TPC) of the extract was evaluated by the Folin-Ciocalteu method, obtaining a total of 24.65 mgGAE g^{-1} DW for the MSPD ethanol extract of the wet paste red stage *H. pluvialis*. A remarkable aspect of the phenolic content of *H. pluvialis* is that, although a proportionality with the concentration of carotenoids is known, there is limited information regarding the phenolic compounds responsible for the bioactivities of the microalga (Deniz 2020). Thus, to uncover the polyphenolic profile of *H. pluvialis*, an untargeted analysis of the extract was performed, aimed to the characterisation of polyphenols.

The criteria used for the untargeted identification and confirmation of the compounds follows a precise validation algorithm previously used for the analysis of *H. pluvialis* (Castillo et al. 2020), as well as extracts of natural origin via ESI-QToF (Ríos et al. 2015). The process starts with the analysis of the analyte intensity, which must be above the confidence limit of the instrument. If approved, the candidate must meet two main parameters: its isotopic standard and mass deviation. The isotopic pattern, reflected as mSigma, shows the effective ratio of the experimental mass fragmentation to the theoretical basis. Likewise, the mass deviation expresses the deviation between the detected experimental mass and the theoretical mass. As upper limit values, 50mSigma and 5mDa are set, which generates an efficient screening that is then supported by the targeted analysis. In this way, applying the algorithm described above, the phenolic compounds phloroglucinol, *p*-coumaric acid, gallic acid, and catechin, were identified (Table 2).

Due to their low concentration in the extract, catechin and gallic acid presented a profile that did not allow mSigma values below the established limit, and their identification was initially considered as tentative. In a subsequent targeted analysis, the phenolics compounds (phloroglucinol, *p*-coumaric acid, gallic acid, and catechin) were identified and quantified by comparison with their respective standards.

Phloroglucinol and *p*-coumaric acid stand out amongst the reduced number of studies dealing with the polyphenolic profile of *H. pluvialis*. These compounds have not been previously reported in red stage of *H. pluvialis,* although a study by Goiris et al. (2014) focused on the search for different compounds of the family of flavonoids, cinnamic acids and simple phenols, revealed that phloroglucinol represented around 99% (81 µg g^{-1}) of the total phenolic compounds in the green phase of the microalga, with more than 70% (0.6 µg g^{-1}) of the remaining amount accounted by *p*-coumaric acid. The results found for the red stage paste show a similar profile (Fig. 11), although the phloroglucinol concentration was higher (2.3 mg g^{-1}), with 32.0 µg g^{-1} of *p*-coumaric acid, and much lower of catechin (10.0 µg g^{-1}) and gallic acid (7.8 µg g^{-1}).

Antioxidant activity

For the antioxidant activity evaluation of MSPD wet paste *H. pluvialis* extracts, the DPPH analysis was initially performed. It is common to quantify the antioxidant activity of

Table 2 Phenolic compounds identified in *H. pluvialis paste* using retention time, mSigma, Δm/z parameters. classification by name, molecular ion, and ionic fragments

RT (min)	Compound name	Molecular formula	mSigma	ΔRT (min)	Δm/z (mDa)	Mass (m/z)*	Precursor ion	Produced ionic fragments *
1.16	Phloroglucinol	$C_6H_6O_3$	8.98	0.10	1.01	127.0439 (50%)	$C_6H_7O_3^{1+}$	116.0687 (100%), 90.0548 (34%), 104.0687 (19%), 85.0300 (23%)
1.71	*p*-Coumaric acid	$C_9H_8O_3$	6.85	0.02	3.08	165.0546 (11%)	$C_9H_9O_3^{1+}$	137.0448 (100%), 150.0579 (25%), 132.1006 (29%), 124.0378 (17%)
2.34	Gallic Acid	$C_7H_6O_5$	> 50	0.01	0.83	169.0142 (4%)	$C_7H_5O_5^{1-}$	145.0503 (100%), 130.0870 (27%), 133.0504 (21%), 147.0658 (21%)
2.57	Catechin	$C_{15}H_{14}O_6$	> 50	0.02	1.54	291.0863 (2%)	$C_{15}H_{15}O_6^{1+}$	130.1578 (100%), 282.2796 (49%), 231.1716 (26%), 277.1058 (21%)

mSigma: ratio between the measured isotopic pattern with respect to the theoretical one, establishing as limit value mSigma < 50. ΔRT and Δm/z: variation between theoretical vs experimental values of retention time and mass of the compound respectively

*Ion value with corresponding percentage abundance in brackets

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

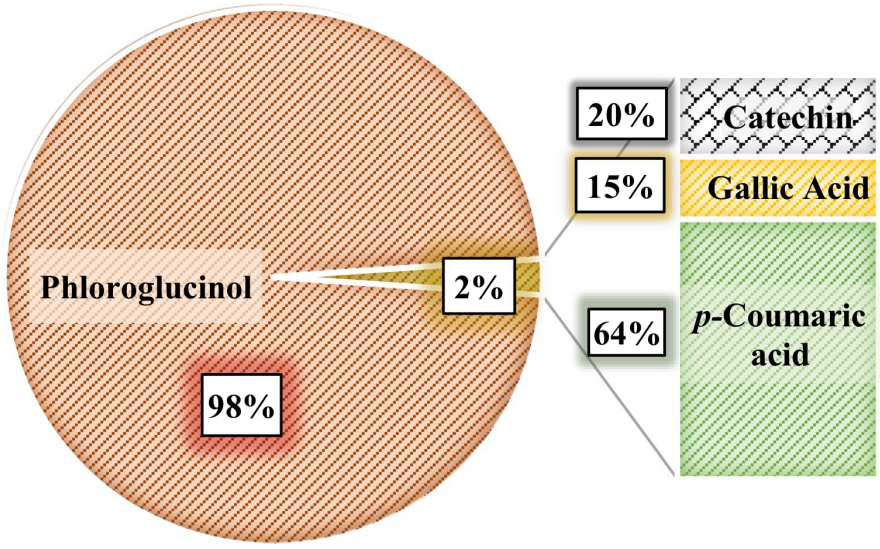


Fig. 11 Polyphenols relative concentrations found in the paste of red stage *H. pluvialis*

carotenoids using the DPPH radical at a maximum wavelength of 515 nm. However, only one study reports the possible interference between the absorbance of carotenoids contained in *H. pluvialis* (400–500 nm) with the DPPH reagent (Santoyo et al. 2010). Several dilutions of the *H. pluvialis* extract in methanol were carried out to check such interference. As shown in supplementary Fig. S3, and considering that absorbance is an additive property, from a dilution factor range from 140 up to 500 (v/v), a marked interference is observed at 515 nm in the absorption of the extracts related to that of DPPH radical. From a dilution factor of 1000, a measurement without significant interference is obtained, but at this dilution the extract is unable to give an appreciable response in the free radical inhibition. Hence, despite the common practice of performing the DPPH procedure to measure the antioxidant activity of carotenoids, and due to the proven impossibility of measuring the antioxidant activity with this methodology, the ABTS radical method was alternatively used. ABTS cation has its maximum absorption at 645, 734, and 815 nm when ethanol is used as the working solvent, which does not interfere with the absorption of the sample analysed (Re et al. 1999). Accordingly, the antioxidant value obtained for red stage *H. pluvialis* wet paste by the proposed MSPD extraction method was 1.58 mmolTE g^{-1} DW.

Discussion

There are several proposals seeking an answer to the choice of the appropriate solvent for the extraction of bioactive compounds from microalgae. MTBE has been a widely used solvent for the extraction of carotenoid compounds from microalgae (Mojaat et al. 2008). Due to its high affinity for carotenoids and high volatility, which allows for rapid removal and recovery, it is a common solvent for astaxanthin recovery studies (Bauer and Minceva 2019). Solvents such as methanol and acetone are also commonly used for the extraction of astaxanthin from *H. pluvialis* (Molino et al. 2018; Park et al. 2020).

Regarding the application of GRAS as extraction solvents in *H. pluvialis*, only one previous work showed the application of ethyl lactate (Castillo et al. 2020), whilst there are few studies in which this solvent is applied for the extraction of microalgal compounds for nutritional purposes. In the case of *Scenedesmus obliquus*, comparable results have been obtained for fatty acid recovery and antioxidant activity value using ethyl lactate and solvents such as acetone, isopropanol, and hexane, (Amaro et al. 2015). Lactate was also used with *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis sp.* showing considerable affinity for saturated and monounsaturated fatty acids, as opposed to polyunsaturated fatty acids. (Wan et al. 2017). Ethyl acetate and ethanol have been widely used in the microalgae field, with ethanol being the GRAS solvent that has shown the highest extractive efficiency for most of the bioactive compounds of interest in *H. pluvialis* (Irshad, et al. 2019b). In this way, although all the solvents chosen in this study present several advantages in the extraction of bioactive compounds from microalgae, making a direct comparison is somewhat complex, but undoubtedly interesting. As summarised in the optimization of the proposed MSPD extraction procedure in this work, a similar affinity to the selected solvents is observed for SFA C18:1 (oleic acid), C18:2 (linoleic acid), and C18:4 (stearidonic

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

acid). The increased response when MeOH is used as an extractant for SFA in contrast to free astaxanthin is notable. The astaxanthin extraction efficiency is dependent on the nature of the solvent, resulting in the following trend for this assay: methanol > ethanol > acetone. This behaviour was previously reported by Haque et al. (2016) and Molino et al. (2018), who detailed the effects of solvents on astaxanthin recovery by ultrasonication and accelerated solvent extraction (ASE), respectively. Canthaxanthin and phoenicoxanthin show a similar profile. Diadinoxanthin is better extracted by acetone, and the zeaxanthin/lutein isomers by ethanol. For the neoxanthin/violaxanthin isomers, all the solvents tested presented similar extraction efficiency.

Methanol and ethanol showed a stable extraction profile towards the fatty acids, as opposed to ethyl acetate, acetone, and MTBE which showed lower extraction efficiency with the length of the aliphatic chain. For ethyl lactate, a more defined selectivity is observed which is altered by other factors than lipid length. For the SFA and MUFA groups, the response obtained using ethyl lactate as solvent was 75% of the overall mean, in contrast to PUFA, for which this value drops to only 5%. PUFAS are of special interest from a nutritional point of view, as they include omega-3 and omega-6 compounds, useful in the prevention of cardiovascular diseases (Artemis 2008). In this way, a two-step extractive process, where SFA and MUFA were extracted in a first step, would be promising to obtain a final extract mainly loaded with these PUFA.

Haematococcus pluvialis in the red stage can store up to 40% carbohydrates (Shah et al. 2016). Most of these carbohydrates are sugars such as glucose and sucrose, which are hydrophilic in nature, displaying a better response of these compounds towards solvents with upper polarity (methanol > ethanol > acetone). In contrast, it is remarkable that ethyl lactate does not extract sugars, showing that not only polarity affects the extraction selectivity, as it is comparable to that of ethanol, but allows the obtention of a sugar-free extract when desired. Current polysaccharide refining methods involve hydrolysis techniques using conditions that are not compatible with a nutraceutical purpose, such as acidic, alkaline media, or physical methods using high temperatures, MAE, and UAE (Suarez et al. 2020). These processes involve demanding energy requirements coupled with a complex scale-up. Thus, the selective extraction by the solvents ethyl lactate and ethyl acetate creates an attractive GRAS alternative for the removal of carbohydrate content, whilst keeping the lipid and carotenoid profile comparable to the other solvents.

Due to the compromise generated by the heterogeneous extractive profile described, a decisive choice of working solvent was essential. In line with a nutraceutical approach in combination with an overall positive overall response of the solvents tested, the choice of a GRAS extractant was clear, where ethanol was outstanding. On the one hand, it gave the best overall response within its category, and on the other hand it has no restrictions, beyond those governing good manufacturing practices, for its application in food formulations, unlike acetone, which is considered within this category when its use is less than 5 to 8 mg L^{-1} (Molino et al. 2018).

The efficiency and selectivity of the MSPD extraction depend on numerous factors, including the physical state and origin of the sample, the relative concentrations and properties of the compounds, and an appropriate combination of dispersant and elution solvent (Basheer et al. 2012). It is also remarkable for its ability to sometimes integrate extraction and clean-up in the same process (García-López et al. 2008). The RM applied in this work in the recovery of carotenoids implied multiple and extensive solvent washes, liquid–liquid separation with subsequent volatilisation, and reconstitution. These subsequent steps aimed at a carotenoid-refined extract could increase experimental error and possible loss of material. In contrast, the proposed MSPD procedure combines extraction, maceration, and filtration in a single step, without the need for reconstitution since the working solvent is appropriate for the straightforward liquid chromatographic analysis.

It could be assumed that lipids of the same group, differentiated only by an unsaturation level, such as linoleic acid and linolenic acid, would present a constant relative response between the two methodologies analysed. Hence, the considerable extractive improvement of MSPD compared with the RM for linolenic acid and linoleic acid is striking. However, depending on the polarity and affinity of the fatty acid in question, the extraction efficiency could differ. An example of this is evidenced by Otero et al. (2017) when comparing the method of Bligh and Dyer (1959) and Folch. When extracting linolenic acid contained in *H. pluvialis*, a similar profile is observed between both methods, but not for linoleic acid, which is much better extracted by the proposed MSPD method. As for the minority saturated fatty acids (Fig. 10B), MSPD also shows an improved efficiency compared to the RM.

Given the antioxidant properties of phenolic compounds (Cory et al. 2018) and the potential of microalgae as sources of these compounds (Del Mondo et al. 2021), few studies have addressed their identification and quantification in microalgae matrices (Jerez-Martel et al. 2017). Consequently, the value of 24.65 mgGAE g^{-1} DW obtained by Folin-Ciocalteu assay in this study for the MSPD extract of red stage *H. pluvialis* paste is not a simple measure to compare. The range of total phenolic content (TPC) reported for *H. pluvialis*, although limited, is heterogeneous, as it is highly dependent on the different extractive procedures,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

solvents, and stage of the microalga. A study conducted for the red and green stages of *H. pluvialis* shows values of 0.54 and 1.23 mgGAE g^{-1} DW, respectively (Goiris et al. 2012). These values, much lower than those reported in this work, were obtained by mortar disruption with no apparent disruptive medium. Since the cell wall of *H. pluvialis* is characterised by its rigidity (Ye et al. 2020), a precarious disruption in the absence of disruptive material can be assumed. Additionality, proportions of ethanol diluted in a volume of water were used, which made cell wall degradation even more difficult. Other extractive procedure, through the generation of oleoresin, gave phenolic index values of about 75mgGAE g(oleoresin)$^{-1}$ (Serwotka-Suszczak et al. 2019). This value of TPC represents the highest index ever reported for *H. pluvialis*. However, it should be considered that the result is a semi-solid extract of considerable concentration, expressing its activity in mass of oleoresin produced, thus avoiding direct comparison with the ethanolic MSPD extract. In other microalgae species such as *Spirulina platensis* and *Chlorella pyrenoidosa*, values between 24.4 and 25.8 mgGAE g^{-1} DW were obtained, using 100% methanol as the extractive solvent (Machu et al. 2015). These values are comparable to those obtained in the present study.

Regarding the analysis of phenolic compounds, there is a somewhat widespread belief in the inability of microalgae to synthesise flavonoids. The identification of these compounds in microalgae matrices is relatively recent, and the range of data available to be compared with the obtained in this study is not very wide. Jerez-Martel et al. (2017) report in microalgae species such as *Euglena cantabrica* and *Spirogyra* sp. as in the cyanobacterium *Nostoc commune*; different values of gallic acid correspond to 5.8 µg g^{-1}, 91.4 µg g^{-1}, and 71 µg g^{-1}; respectively. Only *E. cantabrica* shows catechin concentrations about 71.4 µg g^{-1} (Jerez-Martel et al. 2017).

Through the in-depth characterisation of *H. pluvialis* in the red aplanospore stage extracts obtained by an optimised procedure of extraction based on MSPD, it can be concluded that the bioactive power of the microalgae, although strongly linked to its high concentration of compounds such as carotenoids and fatty acids, has a relevant impact on the synergistic action of phenolic compounds. In this way, it has been reported that the unique effect of phloroglucinol, the most abundant microalgae polyphenol, in several algal species is able to provide between 1 and 10% of the total response when bioactivities such as antioxidant capacity are measured (Goiris et al. 2012; Quéguineur et al. 2012). However, contrasting this value with those obtained by current methodologies is a challenge. In general, the measurement of antioxidant activity is performed on purified astaxanthin from *H. pluvialis*, but not on the microalgal extract. Extracts from lyophilised red stage *H. pluvialis* obtained by CO_2-expanded ethanol extraction (Reyes et al. 2014) and pressurised liquid extraction (PLE) (Jaime et al. 2010) show antioxidant activity values ranging from 0.084 to 0.267 mmolTE g(extract)$^{-1}$ respectively. These procedures, being referred to the extract mass, make comparison with the values obtained in the present work even more difficult. If the density of the ethanolic extract obtained by MPSD is assumed to be that of the pure solvent, the antioxidant activity value derived would be 0.040 mmolTE g(extract)$^{-1}$. This value, although lower than those referenced above, is comparable to those obtained by very strong extractive processes, such as those combining freezing with liquid N_2, and solvents such as hexane at temperatures in the range of 50–200 °C with pressures above 10 MPa (Reyes et al. 2014) (Jaime et al. 2010). These conditions make it possible to obtain a more concentrated extract by modifying the capacity of the solvents used to solubilise the carotenoid compounds. On the contrary, if the extractive capacity is evaluated considering the starting mass of the microalgae, MSPD generates antioxidant activity values equal to or higher than those obtained by these methodologies.

Another common way to evaluate the antioxidant power generated mainly by the natural astaxanthin contained in *H. pluvialis* is by contrast with its synthetic alternative. Thus, the mean TEAC values of synthetic astaxanthin range between 2.21 and 2.43 mmolTE g^{-1} DW (Jaime et al. 2010; Régnier et al. 2015) which, despite being higher than the values obtained for the ethanol extract of *H. pluvialis* MSPD in red phase, is synthesised by petrochemical processes that often raise alarming food safety issues with potential toxicity in the final product (Jeevanandam et al. 2020). In addition, synthetic production also presents challenges in terms of sustainability and potential environmental impact in the manufacturing process (Li et al. 2011). These drawbacks have confined the use of this synthetic palliative to the fish feed additive sector for organoleptic (pigmentation) purposes, and it is not approved for human consumption or as a food additive (Capelli et al. 2013).

Conclusions

The unidirectional approach to the refining of astaxanthin from *H. pluvialis* should be transformed into a whole in order to make it feasible. An optimal extract could be obtained from the wet microalga via MSPD, not needing previous lyophilisation of the substrate, showing the best recoveries, as well as bioactive power when ethanol is used as the extraction solvent. In turn, ethyl lactate as a GRAS alternative, gave extracts with an interesting lipid extraction profile of the form SFA > MUFA > PUFA and no carbohydrate content. The ethanolic extract, which has no limitations in food use, showed an antioxidant power of 1.58 mmolTE

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

g^{-1} DW, comparable to its synthetic pure astaxanthin counterpart. In-depth characterisation of the MSPD extract composition revealed that the synergistic activity of minor polyphenols, in combination with significant concentrations of phloroglucinol (2.3 mg g^{-1}), has a direct effect on the total phenolic content of *H. pluvialis* (24.65 mgGAE g^{-1} DW). Therefore, the combination of GRAS solvents with a scalable MSPD method, consistent with a nutraceutical purpose, is a very suitable, green, and low-cost alternative not only to obtain astaxanthin, but also to extract a high number of bioactive compounds from *H. pluvialis*.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s10811-022-02712-3.

Author contribution Conceptualization, A. O., C. G.-J., and M. L.; methodology, A. O., S. P., C. G.-J., and M. L.; formal analysis, C. G.-J. and M. L.; investigation, A. C., S. P.; writing—original draft preparation, A. C.; writing—review and editing, C. G.-J., and M. L.; supervision, C. G.-J. and M. L.; project administration, C. G.-J. and M. L.; funding acquisition, A. O, M. L

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature. This research was funded by project ED431 2020/06 (Galician Competitive Research Groups Xunta de Galicia). This work was supported by project EQC2018-005011-P (Ministry of Science, Innovation and Universities, Spain). All these programmes are co-funded by FEDER (EU). This article is based upon work from the Sample Preparation Study Group and Network, supported by the Division of Analytical Chemistry of the European Chemical Society.

Data availability All data generated or analysed during this study are included in this published article and its supplementary material files.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Associated content Information as mentioned in the text Figs. S1–S3 and Tables S1–S2 (PDF).

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

References

Ahmed F, Li Y, Fanning K, Netzel M, Schenk PM (2015) Effect of drying, storage temperature and air exposure on astaxanthin stability from *Haematococcus pluvialis*. Food Res Int 74:231–236

Álvarez-Casas M, Pájaro M, Lores M, Garcia-Jares C (2016) Characterization of grape marcs from native and foreign white varieties grown in northwestern Spain by their polyphenolic composition and antioxidant activity. Eur Food Res Technol 242:655–665

Amaro H, Fernandes F, Valentão P, Andrade P, Sousa-Pinto I, Malcata F, Guedes A (2015) Effect of solvent system on extractability of lipidic components of *Scenedesmus obliquus* (M2–1) and *Gloeothece* sp. on antioxidant scavenging capacity thereof. Mar Drugs 13:6453–6471

Anastas PT, Warner JC (1998) Green chemistry: theory and practice. Oxford University Press, Oxford

Artemis PS (2008) The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. Exp Biol Med 233:674–688

Barker SA, Long AR, Short CR (1989) Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. J Chromatogr A 475:353–361

Basheer C, Alhooshani K, Nuhu AA, Kanimozhi S, Lee HK (2012) Sample preparation of complex biological samples in the analysis of trace-level contaminants. Compr Samp, Samp Prep 3:681–700

Bauer A, Minceva M (2019) Direct extraction of astaxanthin from the microalgae: *Haematococcus pluvialis* using liquid-liquid chromatography. RSC Adv 9:22779–22789

Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 37:911–917

Capelli B, Bagchi D, Cysewski GR (2013) Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement. Nutrafoods 12:145–152

Castillo A, Pereira S, Otero A, Fiol S, Garcia-Jares C, Lores M (2020) Matrix solid-phase dispersion as a greener alternative to obtain bioactive extracts from: *Haematococcus pluvialis*. characterization by UHPLC-QToF. RSC Adv 10:27995–28006

Cerón MC, García-Malea MC, Rivas J, Acien FG, Fernandez JM, Del Río E, Guerrero MG, Molina E (2007) Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. Appl Microbiol Biotechnol 74:1112–1119

Chen W, Liu Y, Song L, Sommerfeld M, Hu Q (2020) Automated accelerated solvent extraction method for total lipid analysis of microalgae. Algal Res 51:102080

Cohen Z (1999) Chemicals from microalgae. CRC Press, Boca Raton

Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J (2018) The role of polyphenols in human health and food systems: a mini-review. Front Nutr 5:87

Del Mondo A, Smerilli A, Ambrosino L, Albin A, Noonan DM, Sansone C, Brunet C (2021) Insights into phenolic compounds from microalgae: structural variety and complex beneficial activities from health to nutraceutics. Crit Rev Biotechnol 41:155–171

Deniz I (2020) Scaling-up of *Haematococcus pluvialis* production in stirred tank photobioreactor. Bioresour Technol 310:123434

Do TT, Ong BN, Tran M-LN, Nguyen D, Melkonian M, Tran H (2016) D. Biomass and astaxanthin productivities of *Haematococcus pluvialis* in an angled twin-layer porous substrate photobioreactor: effect of inoculum density and storage time. Biology 8:68

Fábregas J, Domínguez A, Regueiro M, Maseda A, Otero A (2000) Optimisation of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. Appl Microbiol Biotechnol 53:530–535

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

García-López M, Canosa P, Rodríguez I (2008) Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. Anal Bioanal Chem 391:963–974

Gato E, Perez A, Rosalowska A, Celeiro M, Bou G, Lores M (2021) Multicomponent polyphenolic extracts from Vaccinium corymbosum at lab and pilot scale. Characterization and effectivity against nosocomial pathogens. Plants 10:2801

Goiris K, Muylaert K, Fraeye I, Foubert I, de Brabanter J, de Cooman L (2012) Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. J Appl Phycol 24:1477–1486

Goiris K, Muylaert K, Voorspoels S, Noten B, De Paepe D, Baart GJ, De Cooman L (2014) Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. J Phycol 50:483–492

Haque F, Dutta A, Thimmanagari M, Chiang YW (2016) Intensified green production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Food Bioprod Process 99:1–11

Hoff RB, Pizzolato TM (2018) Combining extraction and purification steps in sample preparation for environmental matrices: a review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications. Trends Anal Chem 109:83–96

Huang W-C, Liu H, Sun W, Xue C, Mao X (2018) Effective astaxanthin extraction from wet *Haematococcus pluvialis* using switchable hydrophilicity solvents. ACS Sustain Chem Eng 6:1560–1563

Irshad M, Hong ME, Myint AA, Kim J, Sim SJ (2019a) Safe and complete extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by efficient mechanical disruption of cyst cell wall. Int J Food Eng 15:20190128

Irshad M, Myint AA, Hong ME, Kim J, Sim SJ (2019b) One-pot simultaneous cell wall disruption and complete extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* at room temperature. ACS Sustain Chem Eng 7:13898–13910

Jaime L, Rodríguez-Meizoso I, Cifuentes A, Santoyo S, Suarez S, Ibáñez E, Señorans FJ (2010) Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. LWT Food Sci Technol 43:105–112

Jannel S, Caro Y, Bermudes M, Petit T (2020) Novel insights into the biotechnological production of *Haematococcus pluvialis*-derived astaxanthin: advances and key challenges to allow its industrial use as novel food ingredient. J Mar Sci 8:789

Jeevanandam J, Choudhary V, Selvam JD, Danquah MK (2020) The bioeconomy of production of microalgal pigments. In: Jacob-Lopes E, Queiroz M, Zepka L (eds) Pigments from microalgae handbook. Springer, Cham, pp 325–363

Jerez-Martel I, García-Poza S, Rodríguez-Martel G, Rico M, Afonso-Olivares C, Gómez-Pinchetti JL (2017) Phenolic profile and antioxidant activity of crude extracts from microalgae and cyanobacteria strains. J Food Qual 2017:2924508

Jin G, Liu Y, Xue S, Meng Y, Yan J, Yang F, Guo Z, Zhu J, Liang X (2019) Determination of three carotenoids in microalgae by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography. Chromatographia 82:1593–1601

Kapoore R, Butler T, Pandhal J, Vaidyanathan S (2018) Microwave-assisted extraction for microalgae: from biofuels to biorefinery. Biology 7:18

Kim SH, Liu KH, Lee SY, Hong SJ, Cho BK, Lee H, Lee CG, Choi HK (2013) Effects of light intensity and nitrogen starvation on glycerolipid, glycerophospholipid, and carotenoid composition in *Dunaliella tertiolecta* culture. PLoS ONE 8:72415

Li J, Zhu D, Niu J, Shen S, Wang G (2011) An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. Biotechnol Adv 29:568–574

Lorenz RT, Cysewski GR (2000) Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Trends Biotechnol 18:160–167

Lores M, Alvarez-Casas M, Garcia-Jares C, Llompart M (2016) Polyphenol extract from white-grape residue. European Patent EP2875822A4

Machu L, Misurcova L, Ambrozova JV, Orsavova J, Mlcek J, Sochor J, Jurikova T (2015) Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. Mol 20:1118–1133

Mojaat M, Foucault A, Pruvost J, Legrand J (2008) Optimal selection of organic solvents for biocompatible extraction of β-carotene from *Dunaliella salina*. J Biotechnol 133:433–441

Molina E, Belarbi EH, Fernández FG, Medina A, Chisti Y (2003) Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnol Adv 20:491–515

Molino A, Rimauro J, Casella P, Cerbone A, Larocca V, Chianese S, Karatza D, Mehariya S, Ferraro A, Hristoforou E, Musmarra D (2018) Extraction of astaxanthin from microalga *Haematococcus pluvialis* in red phase by using generally recognised as safe solvents and accelerated extraction. J Biotechnol 283:51–61

Mularczyk M, Michalak I, Marycz K (2020) Astaxanthin and other nutrients from *Haematococcus pluvialis*—multifunctional applications. Mar Drugs 18:459

Otero P, Saha SK, Gushin JM, Moane S, Barron J, Murray P (2017) Identification of optimum fatty acid extraction methods for two different microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Haematococcus pluvialis* for food and biodiesel applications. Anal Bioanal Chem 409:4659–4667

Panis G, Carreon JR (2016) Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: a microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. Algal Res 18:175–190

Park JY, Oh YK, Choi SA, Kim MC (2020) Recovery of astaxanthin-containing oil from *Haematococcus pluvialis* by nano-dispersion and oil partitioning. Appl Biochem Biotechnol 190:1304–1318

Pereira S, Otero A (2020) *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimisation: effect of light quality, temperature and irradiance on growth, pigment content and photosynthetic response. Algal Res 51:102027

Quéguineur B, Goya L, Ramos S, Martín MA, Mateos R, Bravo L (2012) Phloroglucinol: antioxidant properties and effects on cellular oxidative markers in human HepG2 cell line. Food Chem Toxicol 50:2886–2893

Rama LR, Mallo N, Biddau M, Fernandes F, de Miguel T, Sheiner L, Choupina A, Lores M (2021) Exploring the powerful phytoarsenal of white grape marc against bacteria and parasites causing significant diseases. Environ Sci Pollut Res Int 28:24270–24278

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 26:1231–1237

Régnier P, Bastias J, Rodriguez-Ruiz V, Caballero-Casero N, Caballo C, Sicilia D, Fuentes A, Maire M, Crepin M, Letourneur D, Gueguen V, Rubio S, Pavon-Djavid G (2015) Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* prevents oxidative stress on human endothelial cells without toxicity. Mar Drugs 13:2857–2874

Reyes FA, Mendiola JA, Ibañez E, del Valle JM (2014) Astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis* using CO_2-expanded ethanol. J Supercrit Fluids 92:75–83

Ríos JJ, Roca M, Pérez-Gálvez A (2015) Systematic HPLC/ESI-high resolution-QTOF-MS methodology for metabolomic studies in nonfluorescent chlorophyll catabolites pathway. J Anal Methods Chem 2015:1–10

Rubio L, Lamas JP, Lores M, Garcia-Jares C (2018) Matrix solid-phase dispersion using limonene as greener alternative for grape seeds extraction, followed by GC-MS analysis for varietal fatty acid profiling. Food Anal Methods 11:3235–3242

Ruen-ngam D, Shotipruk A, Pavasant P (2011) Comparison of extraction methods for recovery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Sep Sci Technol 46:64–70

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Santoyo S, Plaza M, Jaime L, Ibañez E, Reglero G, Señorans FJ (2010) Pressurized liquid extraction as an alternative process to obtain antiviral agents from the edible microalga *Chlorella vulgaris*. J Agric Food Chem 58:8522–8527

Serwotka-Suszczak AM, Marcinkowska KA, Smieszek A, Michalak IM, Grzebyk M, Wiśniewski M, Marycz KM (2019) The *Haematococcus pluvialis* extract enriched by bioaccumulation process with mg (ii) ions improves insulin resistance in equine adipose-derived stromal cells (EqASCs). Biomed Pharmacother 116:108972

Shah MR, Liang Y, Cheng JJ, Daroch M (2016) Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. Front Plant Sci 7:531

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 16:144–158

Stramarkou M, Papadaki S, Kyriakopoulou K, Krokida M (2017) Effect of drying and extraction conditions on the recovery of bioactive compounds from *Chlorella vulgaris*. J Appl Phycol 29:2947–2960

Suarez CA, Baca SZ, van den Broek LAM, van den Berg C, Wijffels RH, Eppink MHM (2020) Selective fractionation of free glucose and starch from microalgae using aqueous two-phase systems. Algal Res 46:101801

Wan WMA, Theodoropoulos C, Gonzalez-Miquel M (2017) Enhanced microalgal lipid extraction using bio-based solvents for sustainable biofuel production. Green Chem 19:5723–5733

Xiao F, Xu T, Lu B, Liu R (2020) Guidelines for antioxidant assays for food components. Food Front 1:60–69

Ye Z, Tan XH, Liu ZW, Aadil RM, Tan YC, Inam-ur-Raheem M (2020) Mechanisms of breakdown of *Haematococcus pluvialis* cell wall by ionic liquids, hydrochloric acid and multi-enzyme treatment. Int J Food Sci Technol 55:3182–3189

Zhao L, Zhao G, Chen F, Wang Z, Wu J, Hu X (2006) different effects of microwave and ultrasound on the stability of (all-E)-astaxanthin. J Agric Food Chem 54:8346–8351

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.2. MACROALGAS

1.2.1 Bioprospecting of targeted phenolic compounds of *Dictyota dichotoma*, *Gongolaria barbata*, *Ericaria amentacea*, *Sargassum hornschuchii* and *Ellisolandia elongata* from the adriatic sea extracted by two green methods

Aly Castillo, Maria Celeiro, Marta Lores, Kristina Grgić, Marija Banožić, Igor Jerković, Stela Jokić

Marine Drugs, 21 (2023), 27995
Special Issue: Green Chemistry in Marine Natural Product Research
ISSN: 1660-3397, Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)
DOI: 10.3390/md21020097

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

marine drugs

Article

Bioprospecting of Targeted Phenolic Compounds of *Dictyota dichotoma*, *Gongolaria barbata*, *Ericaria amentacea*, *Sargassum hornschuchii* and *Ellisolandia elongata* from the Adriatic Sea Extracted by Two Green Methods

Aly Castillo [1,2], Maria Celeiro [1,2], Marta Lores [2], Kristina Grgić [3], Marija Banožić [3,4], Igor Jerković [5,*] and Stela Jokić [3,*]

1 CRETUS, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain
2 LIDSA, Departmesnt of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, Faculty of Chemistry, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain
3 Department of Process Engineering, Faculty of Food Technology Osijek, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia
4 Faculty of Agriculture and Food Technology, University of Mostar, Biskupa Čule bb, 88000 Mostar, Bosnia and Herzegovina
5 Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, Ruđera Boškovića 35, 21000 Split, Croatia
* Correspondence: igor@ktf-split.hr (I.J.); stela.jokic@ptfos.hr (S.J.)

Abstract: The content of bioactive compounds in four brown and one red algae from the Adriatic Sea (*Dictyota dichotoma*, *Gongolaria barbata*, *Ericaria amentacea*, *Sargassum hornschuchii* and *Ellisolandia elongata*) is explored. The efficiency of two different extraction methods viz. ultrasound-assisted extraction (UAE) and matrix solid-phase dispersion (MSPD) to obtain the extracts rich in phenolic compounds was compared. The effect of the extraction solvent to modulate the phenolic profile was assessed. In general, the mixture ethanol/water in an isovolumetric proportion showed the best results. The total phenolic content (TPC) and antioxidant activity (AA), as well as the individual polyphenolic profile, were evaluated for five target algae. TPC values ranged between 0.2 mg GAE/g (for *E. elongata*) and 38 mg GAE/g (for *S. hornschuchii*). Regarding the quantification of individual polyphenols by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis, the presence of a high number of hydroxybenzoic acid derivatives (mainly of 3- and 4-hydroxybenzoic acids) in all species was noted. In *G. barbata* their concentrations reached up to 500 mg/kg. IC_{50} values (ABTS assay) ranged between 44 mg/L (for *S. hornschuchii*) and 11,040 mg/L (for *E. elongata*). This work contributes to the in-depth characterization of these little-explored algae, showing their potential as a natural source of phenolic compounds.

Keywords: Adriatic Sea macroalgae; polyphenols; matrix solid-phase dispersion; ultrasound-assisted extraction; green chemistry

check for updates

Citation: Castillo, A.; Celeiro, M.; Lores, M.; Grgić, K.; Banožić, M.; Jerković, I.; Jokić, S. Bioprospecting of Targeted Phenolic Compounds of *Dictyota dichotoma*, *Gongolaria barbata*, *Ericaria amentacea*, *Sargassum hornschuchii* and *Ellisolandia elongata* from the Adriatic Sea Extracted by Two Green Methods. *Mar. Drugs* **2023**, *21*, 97. https://doi.org/10.3390/md21020097

Academic Editor: Artur M. S. Silva

Received: 18 December 2022
Revised: 13 January 2023
Accepted: 25 January 2023
Published: 29 January 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Phenolic compounds are important for the macroalgae (seaweeds) normal growth and development exhibiting defence mechanisms against infections, injuries, and environmental aggressions [1]. Bioprospecting of macroalgal phenolic compounds has been a challenging issue [1–3]. Their structural complexity, along with the high polysaccharide abundance within the macroalgal matrix, make the isolation and characterization of phenolics quite difficult. Usually, a multi-step strategy including different fractionation techniques has been applied, which influenced the effectiveness of their structural characterization [1].

Most studies have reported total phenolic content (TPC) or phlorotannins content (TPhC) only based on spectrophotometric methods, for which the possible co-extraction

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

of, e.g., carbohydrates, may have a significant contribution [1]. Phenolic compounds present in macroalgae vary from simple molecules, such as benzoic acid and cinnamic acid or flavonoids, to the more complex phlorotannin polymeric structures derived from oligomerization of phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) units (PGU) through diaryl ether or C-C bonds, which in some cases are quite exclusive to macroalgae. In addition, some species produce fucophlorethols (especially *Sargassaceae* species), and could produce C-C and diaryl ether bonds [1,4].

For present research, 4 brown macroalgae (*Dictyota dichotoma*, *Gongolaria barbata*, *Ericaria amentacea*, and *Sargassum hornschuchii*) and one red macroalga (*Ellisolandia elongata*) from the Adriatic Sea were selected as part of our continuous research on bioprospecting of the Adriatic Sea (BioProCro). There are limited or scarce data on their chemical composition, especially their polyphenolic content [5]. Higher number of brown algae were chosen, since it is well known that brown macroalgae are rich in phenolics compared to red or green ones which is usually associated with phlorotannins [6,7].

The TPC of *D. dichotoma* from the Adriatic Sea ranged up to ca. 300 mg gallic acid equivalent (GAE)/L, total flavonoid content up to ca. 1000 mg quercetin equivalents (QE)/L, total tannins up to ca. 0.4 mg catechin equivalents (CE)/L and phloroglucinol up to ca. 150 mg/L depending on the extraction solvent [8]. High performance liquid chromatography with ultraviolet detector (HPLC-UV) was used for the analysis of individual phenolic compounds and revealed that the dominant phenolic acids in the extracts of *D. dichotoma* were *trans*-ferulic acid and *p*-coumaric acid followed by protocatechuic acid and *o*-coumaric acid [8]. While this macroalga was investigated from the Adriatic Sea, we re-investigated its phenolic composition and compared it with other investigated macroalgae. The major phenolic acids in the extracts of *D. dichotoma* from the Danish coast identified by HPLC were gentisic acid and protocatechuic acid [9].

TPC determined in *Gongolaria barbata* from Black sea was 385.6 mg GAE/100 g. It contained vanillic acid in the highest quantity followed by benzoic acid and ferulic acid. The smallest quantities were found for gallic acid, pyrogallol acid and 4-aminobenzoic acid [10]. HPLC-UV analysis for phenolic contents of *G. barbata* isolated from the Red Sea coast of Safaga, Egypt revealed (*E*)-vanillic acid, benzoic acid, salicylic acid and ferulic acid as dominant. HPLC-UV analysis of its flavonoids revealed kaempferol-3-glucoside-2-*p*-coumaroyl and rosmarinic acid [11]. Heffernan et al. detected phlorotannins containing up to 16 units of phloroglucinol in *Cystoseira nodicaulis* from the Irish coast [12] while phlorotannins containing up to 17 and 27 PGU were also identified in *Cystoseira abies-marina* [13]. Phlorotannin extracts from *Cystoseira nodicaulis*, *Cystoseira tamariscifolia*, and *Cystoseira usneoides* were characterized [14]. Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds were determined in *Cystoseira tamariscifolia* [2].

Different isoflavones, such as daidzein or genistein, were identified in *Sargassum muticum* and *Sargassum vulgare* [15]. Phlorotannins were identified in *Sargassum wightii* [16]. Phenolic acids [9], flavan-3-ols [17], hydroxytetrafuhalol, triphlorethol and dihydroxypentafuhalol [18] were found in *Sargassum muticum*.

While ultrasound-assisted extraction (UAE) has been applied for the extraction of phenolic compounds from macroalgae by several authors, as evidenced in the comprehensive review by Santos et al. [1], it has never been applied to any of the five algae that are the object of this study. Likewise, the alternative technique that we propose, matrix solid-phase dispersion (MSPD), has not been used in the extraction of bioactive compounds from macroalgae so far. The efficiency and green character of these two extraction techniques for obtaining extracts rich in phenolic compounds are compared. In addition to assessing TPC and the antioxidant activity (AA) in terms of IC_{50}, the focus has been placed on the identification and quantification of minor polyphenols by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), which is a different approach from the much more investigated phlorotannins.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. Results and Discussion

2.1. Solvent Selection

Within the broad group of phytochemical compounds, whether from terrestrial or aquatic plants, phenols are of special interest due to their high bioactive capacity, being important antioxidants associated with beneficial effects on health. While the potential of marine algae for containing these compounds is well known, the studies focused on the extraction and characterization of their polyphenolic profiles, especially for brown algae, are still scarce [19]. As it is well known, phenols present a wide range of polarity and properties depending on their chemical structure. For this reason, the extraction solvent plays a key role in the recovery of these compounds from the algae and, consequently, in the bioactive properties of the obtained extracts [20]. The most used solvent to extract polyphenols from macroalgae, including brown algae, involve methanol, ethanol and their aqueous mixtures and, among them, ethanol is the preferred one for the extracts intended to pharmaceutical, food or cosmetic applications [21].

Therefore, in a first approach, methanol (MeOH) and the hydro-organic mixture ethanol/water (50:50, *v*/*v*) (EtOH-W) were used as the solvents. These preliminary experiments were carried out employing 1 g of the sample extracted by UAE (50 W, 50 °C, 60 min) with 20 mL of the correspondent solvent. The respective TPC results, both in terms of mass/mass and mass/volume, are shown in Figure 1.

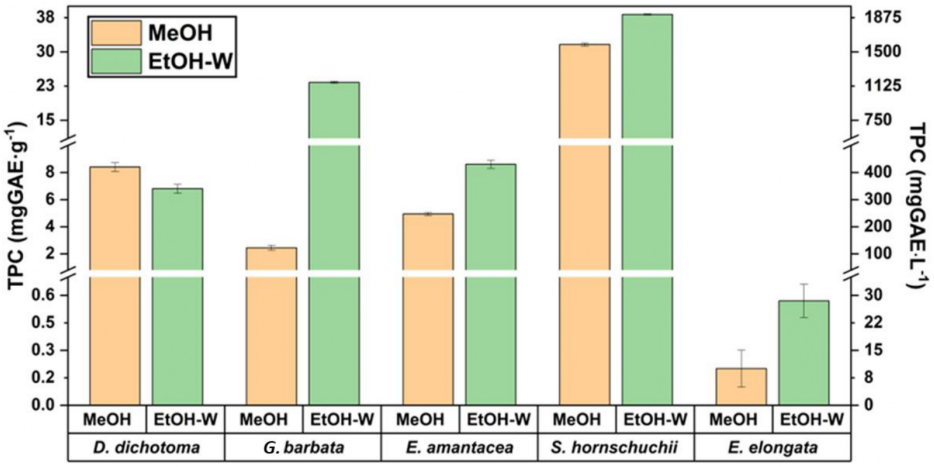


Figure 1. TPC values for the five analyzed algae. MeOH (methanol), EtOH-W (ethanol/water, 50:50, *v*/*v*).

As can be seen in Figure 1, TPC values of four brown macroalgae ranged between 7–38 mg GAE/g (341–1800 mg GAE/L) when the mixture EtOH/water was employed as the extraction solvent. In general, by using this hydro-organic mixture, higher TPC values were obtained, while only for *D. dichotoma* the highest TPC value (19% more) was obtained when MeOH was employed as the extraction solvent. Due to the lack of studies dealing with the phenolic content of these brown macroalgae, as well as the different ways of expressing the results in terms of mass or volumetric concentrations, the comparison of the obtained values with others reported in the literature is complex. However, these results are in accordance with several papers for *D. dichotoma*, where TPC values of 19 mg GAE/g and 300 mg GAE/L were reported after using supercritical CO_2 extraction (SFE) [22] and UAE [21], respectively. However, for *G. barbata* TPC values were close to 25 mg GAE/g, while lower TPC values (3.9 mg GAE/g) were reported in the literature [10].

For red macroalga *E. elongata*, although its capacity to contain carotenoid compounds as a photoprotective arsenal is well known, with zeaxanthin standing out [23], its potential as a supplier of phenolic compounds was so far unknown. Present research determined the lowest TPC values (0.6 mg GAE/g, 29 mg GAE/L) among all samples. The lower

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

concentration of phlorotannins in red algae may also contribute to the lower TPC values [1]. Similarly, the bioactive capacity of *E. amentacea*, not only based on the potential phenolic content, but on other phytochemicals, is still unknown. In the present research, this alga showed TPC of 8.6 mg GAE/g. It is important to highlight that similar or even higher TPC values for these two species were observed in comparison to other brown algae that are far more studied and better characterized, such as *Sargassum fusiforme* or *Halopteris scoparia* [21].

As can be observed in Figure 1, the effect of the solvent plays key role in the extraction of all the algae studied, mainly for *C. barbata*, showing TPC values ten times higher when the mixture EtOH/water (50:50, *v*/*v*) is employed as the extraction solvent in comparison to methanol. This behaviour was previously observed by other authors, where the aqueous extraction of this algae showed phenolic content 10.6 times higher than the methanolic one [24]. However, for the species with the highest TPC, such as *S. hornschuchii*, the use of different solvent exhibited the lowest impact among the analyzed macroalgae. The obtained value for this specie of 38 mg GAE/g (using EtOH/water) is in accordance with those reported in the literature for other *Sargassum* species such as *S. confusum* (21 mg GAE/g) [21].

2.2. Comparison between UAE and MSPD to Extract Polyphenols

Based on the previous results, the mixture ethanol/water (50:50, *v*/*v*) was selected as the extraction solvent for further experiments, as it enables a clear improvement in the overall TPC values. Besides, ethanol is a Generally Recognised As Safe (GRAS) solvent according to the United States Food and Drug Administration (FDA) and its use in food products is allowed by the European Food Safety Authority (EFSA) [25].

One important point to be considered in the recovery of bioactive compounds from the algae is the extraction procedure. As was commented, UAE has been the most widely applied to this matrix, showing different advantages such as the possibility of performing simultaneous extractions [26–28]. However, its main drawback is that the effect of the ultrasound waves cannot be homogeneous during the extraction time, and several authors have reported that although the use of high temperatures usually leads to a kinetic improvement, most phenolics are not thermostable, so the heat treatments could reduce their total extracted amount [8,29]. Besides, centrifugation of UAE derived extracts is usually required to separate the extract containing the compounds of interest from the algae residue, increasing the number of steps necessary for the sample preparation, and resulting in a higher extraction time and energy consumption [30]. Due to the complexity of the sample matrix, a technique capable of breaking the algae cells to release the bioactive compounds is necessary [31,32]. In this way, the use of MSPD results in a very suitable tool [33]. Both experimental procedures are described in Section 3.3 and depicted in Figure 2.

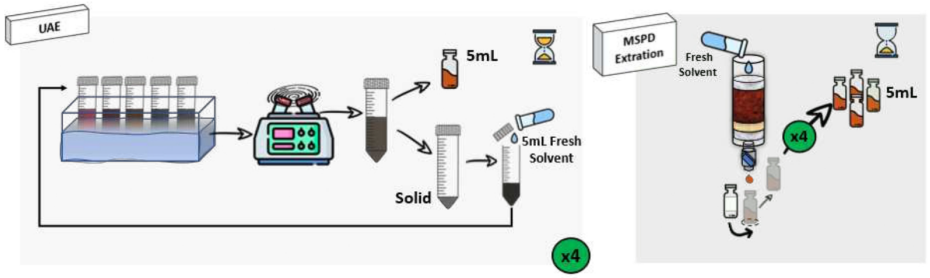


Figure 2. Outline of UAE and MSPD extraction procedures to extract bioactive compounds from the target macroalgae.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

In the last years, the development and use of extraction procedures fulfilling the green analytical chemistry (GAC) and green sample preparation (GSP) principles is increasing [34,35]. They include the use of safe solvents/reagents and materials, minimizing waste generation and energy demand, and enabling high sample throughput to minimize the negative environmental impact. In addition, it is also important to evaluate the interconnections between different experimental parameters involved in the extraction step. Very recently, the AGREEPrep metric tool [36] was developed for assessing the greenness of sample preparation methods. It is based on the principles of GSP. The greenness of both UAE and MSPD under the employed experimental conditions was assessed and results are shown in Figure 3. The values closer to one indicate a higher degree of greenness. Values of 0.46 and 0.72 were obtained for UAE and MSPD, respectively.

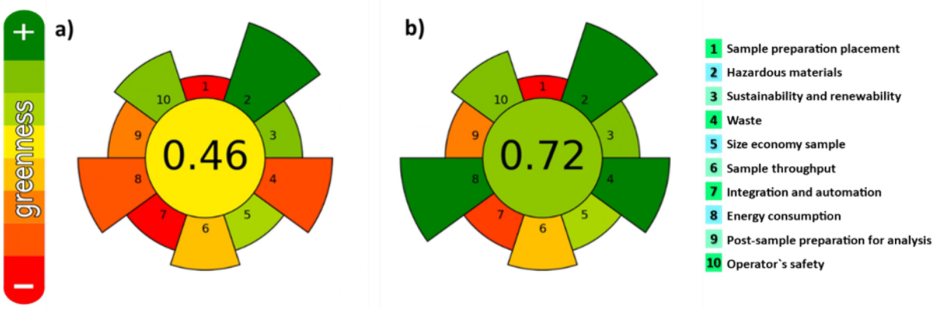


Figure 3. Evaluation of the degree of greenness. Pictograms obtained for (**a**) UAE; (**b**) MSPD.

As can be seen, main differences are observed for item 4 (waste generation), item 7 (number of steps) and item 8 (energy consumption). In comparison with UAE, MSPD combines three procedures in a single step: (i) Disruption of the sample and dispersion onto a solid-phase support, (ii) maceration (close contact between the sample and extraction solvent), and (iii) in-situ extract clean-up, with zero energy consumption (extraction is performed at ambient temperature and pressure) and zero-waste generation, fulfilling with the GAC and GSP principles. Therefore, from greenness point of view, the use of MSPD is more environmentally friendly than UAE. This technique was successfully employed for the extraction of carotenoids [32] and fat-soluble vitamins [37] from microalgae, as well as in combination with vortex-assisted extraction (VAE) to determine halogens in edible seaweed [38], but to the best of our knowledge, it has never been applied to extract the bioactive compounds from macroalgae. Thus, both UAE and MSPD procedures were compared in terms of efficiency.

2.2.1. TPC and AA Analysis

After UAE and MSPD procedures, all extracts were analyzed by spectrophotometry to obtain TPC and AA values. The values are shown for four sequential 5 mL extractions to determine the extractive behaviour of phenols in successive extractions. The results are summarized in Figure 4 and individual values for each algae and extract fraction are shown in Table 1.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

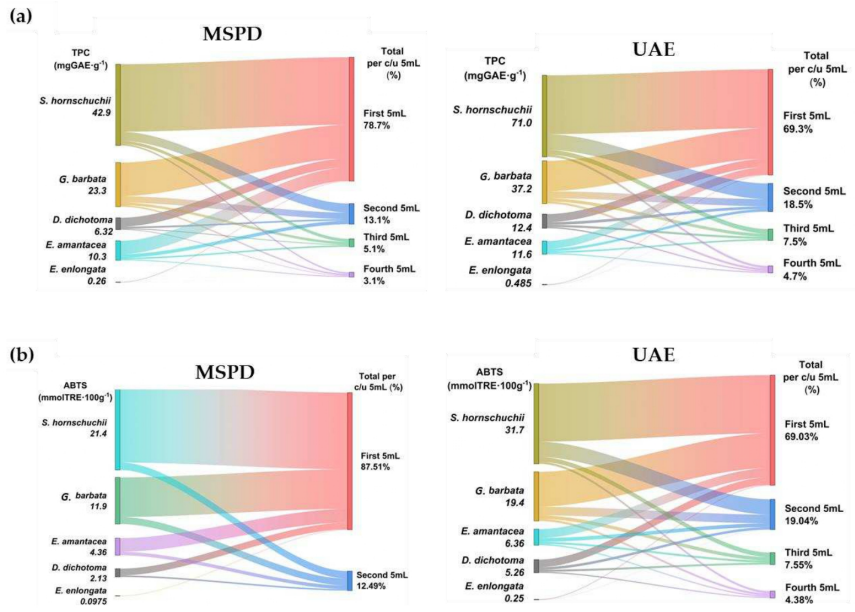


Figure 4. TPC (**a**) and AA values (**b**) for the extracts obtained by MSPD and UAE.

Table 1. TPC and AA values for the four sequential 5 mL extractions for each algae extract by MSPD and UAE.

Sample	Collected Aliquot	TPC (mgGAE/g)		TPC (mgGAE/L)		ABTS (mmolTRE/100g)		ABTS (mmolTRE/L)		IC_{50} (mg/L)	
		MSPD	UAE	MSPD	UAE	MSPD	UAE	MSPD	UAE	MSPD	UAE
D. dichotoma	1st 5 mL	4.7	7.0	938	1414	1.7	3.0	3.4	6.0	989	331
	2nd 5 mL	0.8	2.3	177	470	0.4	1.0	0.8	2.00	5310	796
	3rd 5 mL	0.4	1.8	87	364	<LDL	0.7	<LDL	1.56	>UDL	1279
	4th 5 mL	0.3	1.1	61	225	<LDL	0.4	<LDL	0.90	>UDL	1928
G. barbata	1st 5 mL	17	26	3546	5294	10	13	20	27.54	213	65
	2nd 5 mL	3.3	6.1	678	1231	1.7	3.4	3.6	6.85	1189	288
	3rd 5 mL	1.3	2.6	268	539	<LDL	1.3	<LDL	2.73	>UDL	733
	4th 5 mL	0.8	1.9	168	381	<LDL	0.8	<LDL	1.76	>UDL	1014
E. amentacea	1st 5 mL	7.1	6.8	1421	1361	3.4	3.5	6.9	7.13	251	240
	2nd 5 mL	1.8	2.2	361	444	0.8	1.4	1.77	2.91	955	689
	3rd 5 mL	0.8	1.4	173	294	<LDL	0.8	<LDL	1.61	>UDL	1212
	4th 5 mL	0.5	1.0	103	212	<LDL	0.5	<LDL	1.07	>UDL	1552
S. hornschuchii	1st 5 mL	38	51	7128	10240	19	23	59	46	55	44
	2nd 5 mL	4.7	13	954	2725	1.9	6.0	3.8	12	434	125
	3rd 5 mL	1.6	4.0	324	810	<LDL	1.8	<LDL	3.6	>UDL	470
	4th 5 mL	0.8	2.0	176	417	<LDL	0.9	<LDL	1.7	>UDL	951
E. enlongata	1st 5 mL	0.2	0.3	42	74	0.1	0.2	0.2	1.2	11040	5006
	2nd 5 mL	0.02	0.1	<LDL	23	<LDL	0.05	<LDL	0.26	>UDL	18,657
	3rd 5 mL	0.01	<LDL	<LDL	<LDL	<LDL	<LDL	<LDL	<LDL	>UDL	>UDL
	4th 5 mL	0.02	<LDL	<LDL	<LDL	<LDL	<LDL	<LDL	<LDL	>UDL	>UDL

LDL: Lower detection limit, UDL: Upper detection limit.

2.2.2. IC_{50} Results

The IC_{50} value, a parameter widely employed to measure the antioxidant activity of bioactive extracts, was also assessed and the results are summarized in Figure 5a for the first aliquot of 5 mL obtained by UAE and MSPD procedures.

The IC_{50} value was calculated as the concentration of antioxidants needed to decrease the initial ABTS concentration by 50% (experimental details are shown in Section 3.5). Thus,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

lower IC_{50} values represent higher antioxidant activity. As can be seen in Figure 5a, IC_{50} values ranged between 44 mg/L (for *S. hornschuchii*) and 11,040 mg/L (for *E. enlongata*). As was previously commented, there is a lack of information in the literature regarding the characterization of these algae. However, the obtained IC_{50} values are below those reported by other authors for brown macroalgae, *Sargassum binderi* (36,627 mg/L), and *Turbinaria conoides* (96,242 mg/L) from the Gulf of Thailand [39,40], employing water as the extractant. The obtained IC_{50} values in this work are also lower than those reported for *Sargassum muticum* (450–520 mg/L) from the Cost of Brittani (France) after employing classical solid-liquid extraction and the advanced technique centrifugal partition extraction (CPE) using ethanol/water (50:50, *v*/*v*). These results demonstrate the great antioxidant potential of the extracts obtained from these algae from the Adriatic Sea. Figure 5b,c show the corresponding TPC and AA values, respectively, for the first 5 mL aliquots obtained by MSPD and UAE. The direct correlation among them is clear (Figure 5b,c), indicating that polyphenols (mainly phlorotannins) are the key compounds that reduce oxidation and being responsible for ABTS scavenging capability of the algae extracts.

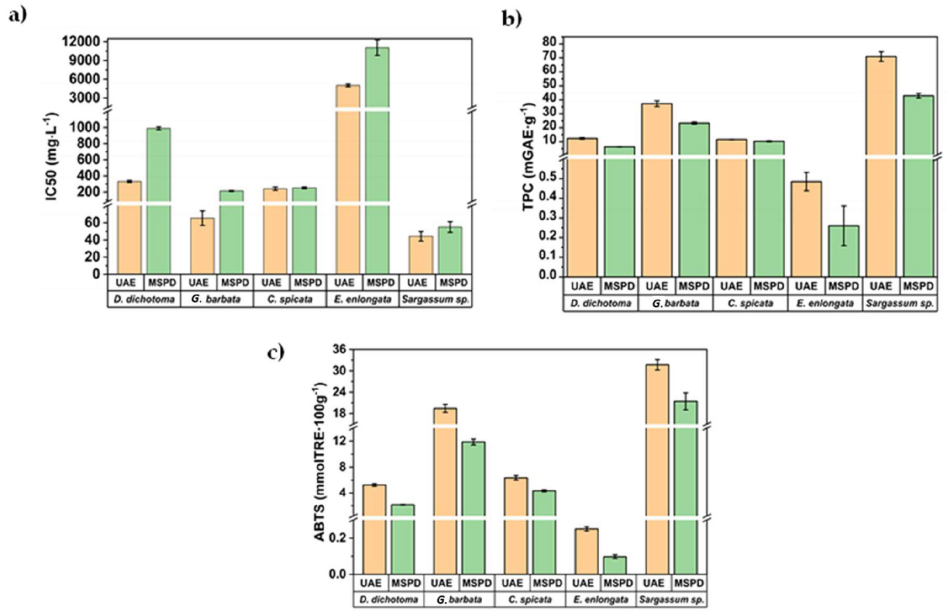


Figure 5. Comparison of the (**a**) IC_{50}, (**b**) TPC, and (**c**) AA values for the first aliquot obtained by MSPD and UAE.

2.2.3. Quantification of Individual Polyphenols

Polyphenols are one of the most common classes of secondary metabolites found in terrestrial plants as well as in marine algae. However, there are fundamental differences in the chemical structures of polyphenols in both terrestrial and marine plants. Polyphenols from terrestrial plants are mainly derived from gallic and ellagic acids, whereas the marine algae polyphenols are derived from phloroglucinol [41]. Marine algae polyphenols are known as phlorotannins. They possess a high hydrophilic character and are formed by polymerized phloroglucinol units [42,43]. In general, polyphenols have been little or not at all explored in marine algae and the identification and characterization of polyphenols in target algae has not been sufficiently studied. In fact, to the best of our knowledge, the individual polyphenolic profile has not been evaluated for *E. amentacea*, and *G. barbata*. In this work, 60 target phenols (see Table S1) were analyzed by LC-MS/MS analysis. Fifteen of them were identified and quantified in the extracts. The results are summarized in Table 2 and Figure 6.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 2. Concentration, expressed as mg/kg (dry weight), of the polyphenols detected in the analyzed species by UAE and MSPD.

Polyphenols	*D. dichotoma*		*G. barbata*		*E. amentacea*		*S. hornschuchii*		*E. elongata*	
	UAE	*MSPD*	*UAE*	*MSPD*	*UAE*	*MSPD*	*UAE*	*MSPD*	*UAE*	*MSPD*
Non flavonoids										
3,4-dihydroxybenzoic acid	14 ± 1	40 ± 10	0.42 ± 0.01	1.3 ± 0.4	nd	nd	0.24 ± 0.02	1.6 ± 0.2	nd	nd
2,4-dihydroxybenzoic acid + 2-5-dihydroxybenzoic acid	9.3 ± 0.4	26 ± 4	0.29 ± 0.03	1.0 ± 0.1	0.05 ± 0.01	0.4 ± 0.1	0.11 ± 0.01	0.8 ± 0.1	nd	nd
2,5-dihydroxybenzaldehyde + 3,4-dihydroxybenzaldehyde	0.16 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.14 ± 0.06	0.21 ± 0.04	nd	nd	nd	nd
3-hydroxybenzoic acid + 4-hydroxybenzoic acid	12 ± 3	13 ± 5	393 ± 19	543 ± 75	8 ± 1	6 ± 2	6 ± 1	8 ± 3	15 ± 1	16 ± 1
2,6-dihydroxybenzoic acid + 3-5-dihydroxybenzoic acid	11 ± 1	31 ± 5	nd	1.2 ± 0.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-hydroxybenzaldehyde + 4-hydroxybenzaldehyde	1.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.2	2.1 ± 0.1	1.1 ± 0.3	nd	nd	6 ± 1	4 ± 1
Flavonoids										
Quercetin-3-glucuronide	0.07 ± 0.01	0.3 ± 0.1	0.12 ± 0.02	0.3 ± 0.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Quercetin-3-glucoside	0.12 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.03	0.14 ± 0.01	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3,5-dimethoxybenzaldehyde	0.10 ± 0.03	2.5 ± 0.9	nd	1.8 ± 0.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Quercetin	10 ± 1	4.3 ± 0.4	11 ± 3	3 ± 1	3 ± 1	1.8 ± 0.8	9 ± 1	1.9 ± 0.3	15 ± 2	1.9 ± 0.6

nd: Not detected.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

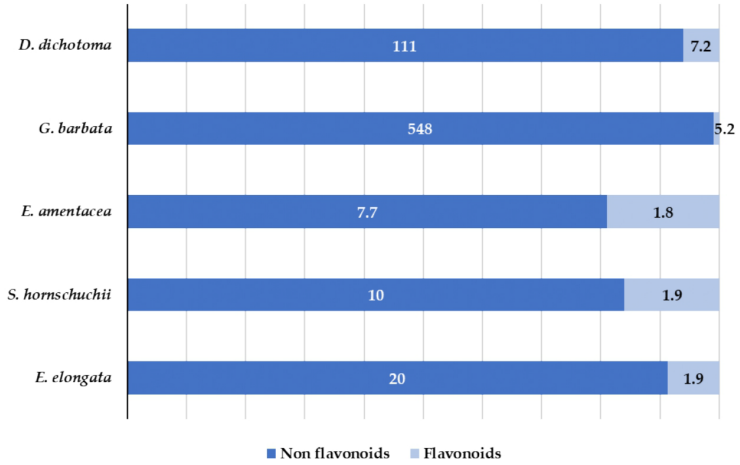


Figure 6. Distribution (mg/kg) of flavonoids and non-flavonoids in the targeted algae.

As can be seen in Table 2 and Figure 6, both flavonoids and non-flavonols polyphenols were detected. High number of compounds were detected in *D. dichotoma* and *G. barbata*, whereas for the other three species, a low number of compounds were quantified. Non flavonoids (derivatives of hydroxybenzoic acid (salicylic acid)) were detected in all analyzed algae. Salicylic acid is one of the oldest compounds used in medicine, either free or in the ester form [44]. Its antipyretic, antirheumatic and analgesic properties have been largely demonstrated and, recent studies showed not only its antioxidant activity, but also the activity of its derivatives [45]. In the obtained *G. barbata* extracts the presence of 3-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxybenzoic acid at the concentration levels up to 500 mg/kg was determined. These results are in accordance with those observed in ethanolic extracts of Tunisian *G. barbata*, were high amount (76.8 mg/L) of salicylic acid was also found [11]. In recent study related to the antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring compounds in Tunisian *G. barbata*, in addition to the already known major phlorotannins usually found in algae (phloroglucinol and their derivatives), several flavonoids were identified including quercetin and its derivatives, although they were not quantified [46]. In present work, quercetin dominates among flavonoids and, it was found in all species at concentrations ranging from 1.8 to 11 mg/kg. 3- and 4-hydroxybenzoic acids show antifungal and antimicrobial activities [47,48]. While there is a lack of studies regarding the marine algae in comparison with terrestrial plant flavonoids, recent studies suggest that flavonoid enriched functional foods are able to prevent neurodegenerative disorders and heart diseases [49]. Several of the compounds detected in the targeted algae, such as quercetin, exhibited a high antioxidant character that is related to its chemical structure (the position of -OH hydroxyl group [50]). In addition, its antibacterial activity against *S.aureus* and *E. coli* has been demonstrated [51].

In the comparison between UAE and MSPD, for the more polar compounds such as 3,4-, 2-4- and 2-5-dihydroxybenzoic acids, the extraction yield of MSPD is considerably higher than UAE. It is important to note that the extraction solvent was EtOH/water in isovolumetric proportion. These compounds possess a higher affinity for water, and it seems that extraction under mild conditions without temperature (MSPD) favours the transfer of the analytes to water. In addition, the use of UAE (higher temperature) may favour the loss or decomposition of these compounds. However, the differences observed for quercetin between UAE and MSPD may be related to the fact that quercetin-glycosides are easily decomposed [52]. As can be seen in Table 2, the concentrations for quercetin derivatives are very similar using both techniques, while the concentrations for quercetin are considerably higher after UAE.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. Materials and Methods

3.1. Sampling

Dictyota dichotoma (Hudson) J.L. Lamouroux, 1809 was collected in February 2022 close to Zadar, Adriatic Sea, Croatia (44 05 50 N; 15 14 43 E) from depth of 1 m. *Gongolaria barbata* (Stackhouse) Kuntze (ex. *Cystoseria barbata*) was collected in May 2021 close to Zadar, Adriatic Sea, Croatia (44 12 42 N; 15 09 23 E) at depth of 4–6 m. *Ericaria amentacea* (C. Aghard) Molinary and Guiry 2020 (ex *Cystoseria spicata*) was gathered in April 2021 at Dugi otok, Adriatic Sea, Croatia (44 03 16 N; 14 59 14 E) from depth of 0.5 m. *Sargassum hornschuchii* C. Agardh, 1820 was collected in December 2021 at Mandre, island Pag, Adriatic Sea, Croatia (44 28 37 N; 14 54 58 E) from depth of 20 m. *Ellisolandia elongata* (J.Ellis and Solander) K.R.Hind & G.W.Saunders, 2013 was collected in November 2021 at Dugi otok, Adriatic Sea, Croatia (44 03 16 N; 14 59 14 E) from depth of 0.5 m.

Fresh samples of macroalgae were washed separately five times in water and twice in deionized water. For the freeze-drying experiment the samples were cut in a slice and firstly frozen at −60 °C for 24 h in an ultra-low freezer and then placed in a laboratory freeze dryer (CoolSafe PRO, Labogene, Denmark). The freeze drying process was performed for 24 h under high vacuum (0.13–0.55 hPa) with primary and secondary drying temperatures of −30 °C and 20 °C, respectively. Freeze-dried macroalgae were further used for the extraction.

3.2. Standards, Reagents and Materials

For 60 target polyphenols, their CAS numbers, molecular mass, retention time and MS/MS transitions are shown in Table S1. Water and methanol (MS grade), and ethanol were supplied by Scharlab (Barcelona, Spain). The Folin-Ciocalteu's phenol reagent (2M), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox®), 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), formic acid, sodium carbonate and sand (200–300 µm mesh) were supplied by Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany).

3.3. Extraction Procedures: UAE and MSPD

3.3.1. Ultrasound-Assisted Extraction (UAE)

1 g of freeze-dried sample was placed in a 10 mL glass vial and 5 mL of the correspondent solvent (methanol or ethanol/water (50:50, v/v)) were added. Then, the vial was encapsulated and immersed in an ultrasonic bath (J.P. Selecta, Barcelona, Spain) for 60 min at 50 °C. After the extraction, the extract was collected, centrifuged (Orto Alresa, Barcelona, Spain) at 3500 rpm for 10 min and the precipitate was re-extracted with 5 mL of fresh solvent (the procedure was repeated 4 times). Afterwards, the extract was filtered through 0.22 µm polytetrafluoroethylene (PTFE) filters before the analysis.

3.3.2. Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD)

1 g of freeze-dried sample was gently blended with 8 g of dispersing sorbent (sand) into porcelain mortar using a porcelain pestle until a homogeneous mixture was obtained. The mixture was transferred into a polypropylene cartridge containing a PTFE cellulose frit at the bottom, and 0.5 g of sand (to obtain a further degree of fractionation and sample clean-up). Finally, other cellulose frit was placed at the top to compress the mixture. Elution was made by gravity flow with ethanol/water (50:50, v/v), subsequently collecting 5 mL (×4) of the extract into different volumetric flasks.

3.4. Total Polyphenolic Content (TPC)

TPC was determined by employing the Folin-Ciocalteu (FC) colorimetric method described by Singleton and Rossi [53] employing a modification of the Zhang's guidelines [54] for microtitration in 96-well plates. Briefly, 20 µL of each diluted extract was mixed with 100 µL of Folin-Ciocalteu reagent (1:10, v/v) and 80 µL of sodium carbonate aqueous solution (7.5 g/L). The mixture was shaken and kept in the dark for 30 min. Afterwards, the absorbance was measured at 760 nm in a microplate reader (BMG LABTECH, Ortenberg,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Germany). The TPC was quantified by employing a calibration curve of gallic acid covering a concentration range between 20 and 160 mg/L (absorbance: 0.200–0.800). The TPC was expressed as milligrams of gallic acid equivalent per liter of extract (mg GAE/L) and per gram of the sample (dry weight) (mg GAE/g).

3.5. Antioxidant Activity (AA) and IC_{50}

AA was determined using the ABTS reagent following the method described by Ozgen et al. [55]. Briefly, 100 µL of the extracts at different dilutions factors were placed in a 96-well plate and mixed with 100 µL of ABTS reagent (prepared in methanol). The mixture was kept in the dark for 10 min and the measurement was performed at 515 nm in a microplate reader (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany). For the quantification of AA, a calibration curve prepared in Trolox, covering a concentration range between 3 and 31 mg/L (absorbance between 0.200–0.800), was employed. The AA was expressed as millimoles Trolox equivalent per liter of the extract (mmol TRE/L).

The mean inhibitory concentration (IC_{50}) of the samples was also calculated, represented as the milligrams of dry alga per litre of extract ($mg \cdot L^{-1}$) necessary to inhibit 50% of the ABTS radicals [56]. For this purpose, 8 concentration levels of the extract were carried out in a range of inhibition between 20% and 80% of $ABTS^{+}$. In this way, it interpolates in the linear range close to 50% by means of the relationship

$$Y = aX + b$$

where:

"*Y*" is the percentage inhibition of ABTS+.
"*X*" the concentration of the extract in mg/L
"*a*" and "*b*" are the fitted parameters of the regression line.

3.6. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

For the quantification of the targeted polyphenols in the algae extracts, LC-MS/MS analysis was performed by employing a Thermo Scientific (San José, CA, USA) instrument based on a TSQ Quantum Ultra^{TM} triple quadrupole mass spectrometer equipped with a HESI-II (heated electrospray ionization) source and an Accela Open autosampler with a 20 µL loop. The chromatographic separation was performed by using a Kinetex C18 column (2.6 µm, 100 × 2.1 mm) with a guard column (SecurityGuard^{TM} ULTRA Holder) obtained from Phenomenex (Torrance, CA, USA). The column temperature was set at 50 °C, and the injection volume was 10 µL. The mobile phase consisted of water (A) and methanol (B), both containing 0.1% formic acid. The eluted program started with 5% of B (held 5 min), and it was up to 90% of B over 11 min (held 3 min). Then, initial conditions were reached in 5 min. The flow rate was kept constant at 200 µL/min. The total run time for each injection was 20 min. The mass spectrometer and the HESI-II source were working simultaneously in the positive and negative mode. Selected Reaction Monitoring (SRM) acquisition mode was implemented monitoring 2 or 3 transitions per compound (see Table S1), for an unequivocal identification and quantification of the target compounds. The system was operated by Xcalibur 2.2 and Trace Finder^{TM} 3.2.

4. Conclusions

This work provides useful knowledge on the phenolic content and radical scavenging properties of four brown algae *Dictyota dichotoma*, *Gongolaria barbata*, *Ericaria amentacea*, *Sargassum hornschuchii* and 1 red algae *Ellisolandia elongata* from the Adriatic Sea. The ethanolic/water extracts showed high TPC and a good antioxidant potential. A comparison between two extraction techniques, MSPD and UAE, was made, showing their suitability in terms of efficiency; although according to their greenness character, MSPD offers a low-cost and more environmentally-friendly alternative to UAE, demonstrating that 79% of the polyphenols are extracted in only 5 mL of extract. TPC values ranged between 0.3–43 mg GAE/g and AA between 0.1–21 mmolTRE/100g. Fifteen of 60 polyphenols

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

analyzed by LC-MS/MS were detected in the samples, including both flavonoids and non flavonoids, highlighting the presence of 3- and 4-hydroxybenzoic acids at concentrations up to 543 mg/kg in *G. barbata*. IC_{50} values were also assessed, ranging between 44 mg/L (for *S. hornschuchii*) and 11,040 mg/L (for *E. elongata*). This is a little-explored area and further research should be performed to obtain a deep characterization of these promising algae as a source of bioactive compounds for their re-valorization and potential use in the food, cosmetic and/or pharmaceutical industries. This work contributes to the in-depth characterization of these little-explored algae, showing their potential as a natural source of phenolic compounds.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/md21020097/s1, Table S1: Target polyphenols. CAS number, molecular mass, retention time and MS/MS transitions.

Author Contributions: Conceptualization, S.J. and I.J.; methodology, A.C., M.C., M.L. and K.G.; formal analysis, M.L., A.C. and K.G.; investigation, K.G.; resources, M.L., S.J. and I.J.; data curation, A.C., M.C. and K.G.; writing—original draft preparation, A.C., M.C., M.B., S.J. and I.J.; writing—review and editing, A.C., M.C., M.L., M.B., S.J. and I.J.; supervision, M.L. and I.J.; project administration, S.J.; funding acquisition, S.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Croatian Government and the European Union through the European Regional Development Fund—the Competitiveness and Cohesion Operational Programme (KK.01.1.1.01) for funding The Scientific Centre of Excellence for Marine Bioprospecting—BioProCro.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Authors would like to thank Donat Petricioli for the sample collection and identification.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

A.C.S.; Rocha, S.M.; Silvestre, A.J.D. The quest for phenolic compounds from macroalgae: A review of on methodologies. *Biomolecules* **2019**, *9*, 847. [CrossRef]
·Pasini, A.; Pérez-Rodriguez, E.; Alvarez, R.M.; Figueroa, F.L. Daily and seasonal variations of optimum lic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Mar. Biol.* **2006**, *148*, 459–465. [CrossRef]
; Nocchi Carneiro, N.P.; Gestinari, L.M.; dos Santos, B.F.; Bento, L.M.; Lhullier, C.; Gouvea, L.; Bastos, E.; roperties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. *J. Appl. Phycol.* sRef]
ou, C.; Cérantola, S.P.; Guerard, F.; Lann, K.L.; Bourgougnon, N. Chapter Thirteen—Phlorotannins om Brittany (France). In *Interesting Molecules for Ecophysiological and Valorisation Purposes, Advances in* ıic Press: Cambridge, MA, USA, 2014; pp. 379–411.
Stanojkovic, T. Brown macroalgae from the Adriatic Sea as a promising source of bioactive nutrients. *J.* , *13*, 330–338. [CrossRef]
adhar, K.N.; Macridachis, J.; Pav, M.; Morais, T.R.; Campino, L.; Varela, J.; Lago, J. *Cystoseira* algae : chemical entities and biological activities. *Tetrahedron. Asym.* **2017**, *28*, 1486–1505. [CrossRef]
C. Ecological function of phenolic compounds from mediterranean fucoid algae and seagrasses: An stoseira sensu lato and *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *J. Mar. Sci. Eng.* **2020**, *8*, 19. [CrossRef]
t, V.; Botic, V.; Crnjac, A.; Smoljo, M.; Soldo, B.; Ljubenkov, I.; Cagalj, M.; Skroza, D. Bioactive phenolic brown algae *Dictyota dichotoma* and *Padina pavonica* (Dictyotaceae). *Foods* **2021**, *10*, 1187. [CrossRef]
C. Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. –1681. [CrossRef]
ı, A.; Ionescu, A.M. Evaluation of total phenolic content in relation to antioxidant activity of brown m Black Sea. *Rev. Chimie* **2019**, *70*, 2684–2689. [CrossRef]
d, H.; Mostafa, S.; Ibraheem, I. Controlling of microbial growth by using *Cystoseira barbata* extract. *Egyp.*
.P.; FitzGerald, R.J.; Smyth, T.J. Profiling of the molecular weight and structural isomer abundance of otannins. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 509–528. [CrossRef]

13. Montero, L.; Herrero, M.; Ibañez, E.; Cifuentes, A. Separation and characterization of phlorotannins from brown algae *Cystoseira* abies-marina by comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Electrophoresis* **2014**, *35*, 1644–1651. [CrossRef] [PubMed]
14. Ferreres, F.; Lopes, G.; Gil-Izquierdo, A.; Andrade, P.B.; Sousa, C.; Mouga, T.; Valentao, P.C. Phlorotannin extracts from fucales characterized by HPLC-DAD-ESI-MS: Approaches to hyaluronidase inhibitory capacity and antioxidant properties. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 2766–2781. [CrossRef] [PubMed]
15. Klejdus, B.; Lojková, L.; Plaza, M.; Snovoblá, M.; Stervobá, D. Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 7956–7965. [CrossRef] [PubMed]
16. Vijayan, R.; Chitra, L.; Penislusshiyan, S.; Palvannan, T. Exploring bioactive fraction of *Sargassum wightii*: In Vitro elucidation of angiotensin-I-converting enzyme inhibition and antioxidant potential. *Int. J. Food Prop.* **2018**, *21*, 674–684. [CrossRef]
17. Rodrigues, D.; Sousa, S.; Silva, A.; Amorim, M.; Pereira, L.; Rocha-Santos, T.A.P.; Gomes, A.M.P.; Duarte, A.C.; Freitas, A.C. Impact of enzyme-and ultrasound-assisted extraction methods on biological properties of red, brown, and green seaweeds from the central west coast of Portugal. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 3177–3188. [CrossRef]
18. Del Pilar Sanchez-Camargo, A.; Montero, L.; Stiger-Pouvreau, V.; Tanniou, A.; Cifuentes, A.; Herrero, M.; Ibañez, E. Considerations on the use of enzyme-assisted extraction in combination with pressurized liquids to recover bioactive compounds from algae. *Food Chem.* **2016**, *192*, 67–74. [CrossRef] [PubMed]
19. Vo, T.S.; Ngo, D.H.; Kim, S.K. *Brown Algal Polyphenol and Its Pharmaceutical Properties, Marine-Derived Biomaterials for Tissue Engineering Applications*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2019; pp. 223–243.
20. Aminina, N.M.; Karaulova, E.P.; Vishnevskaya, T.I.; Yakush, E.V.; Kim, Y.K.; Nam, K.H.; Son, K.T. Characteristics of polyphenolic content in brown algae of the Pacific Coast of Russia. *Molecules* **2020**, *25*, 3909. [CrossRef]
21. Generalic-Mekinic, I.; Skroza, D.; Simat, V.; Hamed, I.; Sgalj, M.; Popovic Perkovic, Z. Phenolic content of brown algae (*Pheophyceae*) species: Extraction, identification, and quantification. *Biomolecules* **2019**, *9*, 244. [CrossRef]
22. Ktari, L.; Mdallel, C.; Aoun, B.; Chebil Ajjabi, L.; Sadok, S. Fucoxanthin and phenolic contents of six dictyotales from the Tunisian coasts with an emphasis for a green extraction using a supercritical CO_2 method. *Front. Mar. Sci.* **2021**, *8*, 647159. [CrossRef]
23. Korbee, N.; Navarro, N.P.; García-Sánchez, M.; Celis-Plá, P.S.M.; Quintano, E.; Copertino, M.; Pedersen, A.; Mariath, R.; Mangaiyarkarasi, N.; Pérez-Ruzafa, A. A novel in situ system to evaluate the effect of high CO_2 on photosynthesis and biochemistry of seaweeds. *Aquat. Biol.* **2014**, *22*, 245–259. [CrossRef]
24. Haddar, A.; Sellimi, S.; Ghannouchi, R.; Alvarez, O.M.; Nasri, M.; Bougatef, A. Functional, antioxidant and film-forming properties of tuna-skin gelatin with a brown algae extract. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *51*, 477–483. [CrossRef] [PubMed]
25. Food and Drug Administration (FDA). Generally Recognized as Safe (GRAS). Available online: https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras (accessed on 28 November 2022).
26. Kadam, S.U.; O'Donnell, C.P.; Rai, D.K.; Hossain, M.B.; Burgess, C.M.; Walsh, D.; Tiwari, B.K. Laminarin from Irish brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Laminaria hyperborea*: Ultrasound assisted extraction, characterization and bioactivity. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 4270–4280. [CrossRef] [PubMed]
27. Dang, T.T.; Van Vuong, Q.; Schreider, M.J.; Bowyer, M.C.; Van Altena, L.A.; Scarlett, C.J. Optimisation of ultrasound-assisted extraction conditions for phenolic content and antioxidant activities of the alga *Hormosira banksii* using response surface methodology. *J. Appl. Phycol.* **2017**, *29*, 3161–3173. [CrossRef]
28. Dang, T.T.; Bowyer, M.C.; Van Altena, L.A.; Scarlett, C.J. Comparison of chemical profile and antioxidant properties of the brown algae. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2018**, *53*, 174–181. [CrossRef]
29. Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A.G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.S.; Abert-Vian, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* **2017**, *34*, 540–560. [CrossRef] [PubMed]
30. Mittal, R.; Tavanandi, H.A.; Mantri, V.A.; Raghavarao, K. Ultrasound assisted methods for enhanced extraction of phycobiliproteins from marine macro-algae, *Gelidium pusillum* (Rhodophyta). *Ultrason. Sonochem.* **2017**, *38*, 92–103. [CrossRef] [PubMed]
31. Carreira-Casais, A.; Otero, P.; Garcia-Perez, P.; Garcia-Oliveira, P.; Pereira, A.G.; Carpena, M.; Soria-Lopez, A.; Simal-Gandara, J.; Prieto, M.A. Benefits and drawbacks of ultrasound-assisted extraction for the recovery of bioactive compounds from marine algae. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 9153. [CrossRef]
32. Castillo, A.; Pereira, S.; Otero, A.; Fiol, S.; Garcia-Jares, C.; Lores, M. Matrix solid-phase dispersion as a greener alternative to obtain bioactive extracts from *Haematococcus pluvialis*. Characterization by UHPLC-QToF. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 27995–28006. [CrossRef]
33. Hyotylainen, T.; Riekkola, M.L. Potential of effective extraction techniques and new analytical systems for profiling the marine environment. *TrAC-Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 788–808. [CrossRef]
34. Armenta, S.; Garrigues, S.; Esteve-Turrillas, F.A.; de la Guardia, M. Green extraction techniques in green analytical chemistry. *TrAC-Trends Anal. Chem.* **2019**, *116*, 248–253. [CrossRef]
35. López-Lorente, A.I.; Pena-Pereira, F.; Pedersen-Bjergaard, S.; Zuin, V.G.; Ozkan, S.A.; Psillakis, E. The ten principles of green sample preparation. *TrAC-Trends Anal. Chem.* **2022**, *148*, 116530. [CrossRef]
36. Wojnowski, W.; Tobiszewski, M.; Pena-Pereira, F.; Psillakis, E. AGREEprep-analytical greenness metric for sample preparation. *TrAC-Trends Anal. Chem.* **2022**, *149*, 116553. [CrossRef]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

37. Chronopoulou, L.; Dal Bosco, C.; Di Caprio, F.; Prosini, L.; Gentili, A.; Pagnanelli, F.; Palocci, C. Extraction of carotenoids and fat-soluble vitamins from *Tetradesmus obliquus* microalgae: An optimized approach by using supercritical CO_2. *Molecules* **2019**, *24*, 2581. [CrossRef] [PubMed]
38. De Melo Malinowski, M.H.; Maciel, P.K.; Chaves, M.J.S.; Barbosa, S.C.; Primel, E.G.; Duarte, F.A.; Soares, B.M. Vortex-assisted matrix solid-phase dispersion: An eco-friendly alternative for the determination of halogens in edible seaweed. *Talanta* **2022**, *244*, 123395. [CrossRef] [PubMed]
39. Boonchum, W.; Peerapornpisal, Y.; Kanjanapothi, D.; Pekkoh, J.; Pumas, C.; Jamjai, U.; Amornlerdpison, D.; Noiraksar, T.; Vacharapiyasophon, P. Antioxidant activity of some seaweed from the Gulf of Thailand. *Int. J. Agric. Biol.* **2011**, *13*, 95–99.
40. Anaelle, T.; Leon, E.S.; Laurent, V.; Elena, I.; Mendiola, J.A.; Stephane, C.; Nelly, K.; Luc, M.; Valerie, S.P. Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using *Sargassum muticum* as model. *Talanta* **2013**, *104*, 44–52. [CrossRef]
41. Singh, I.P.; Bharate, S.B. Phloroglucinol compounds of natural origin. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 558–591. [CrossRef]
42. Lee, S.H.; Jeon, Y.J. Anti-diabetic effects of brown algae derived phlorotannins, marine polyphenols through diverse mechanisms. *Fitoterapia* **2013**, *86*, 129–136. [CrossRef]
43. Jegou, C.; Kervarec, N.; Cerantola, S.; Bihannic, I.; Stiger-Pouvreau, V. NMR use to quantify phlorotannins: The case of *Cystoseira tamariscifolia*, a phloroglucinol-producing brown macroalga in Brittany (France). *Talanta* **2015**, *135*, 1–6. [CrossRef]
44. Zhao, K. An Overall Review on Salicylic Acid. *Int. Core J. Eng.* **2021**, *7*, 414–418.
45. Velika, B.; Kron, I. Antioxidant properties of benzoic acid derivatives against Superoxide radical. *Free Radic. Antiox.* **2012**, *2*, 62–67. [CrossRef]
46. Sellimi, S.; Benslima, A.; Barragan-Montero, V.; Hajji, M.; Nasri, M. Polyphenolic-protein-polysaccharide ternary conjugates from *Cystoseira barbata* Tunisian seaweed as potential biopreservatives: Chemical, antioxidant and antimicrobial properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *105*, 1375–1383. [CrossRef] [PubMed]
47. Chong, K.P.; Rossall, S.; Atong, M. In vitro antimicrobial activity and fungitoxicity of syringic acid, caffeic acid and 4-hydroxybenzoic acid against *Ganoderma boninense*. *J. Agric. Sci.* **2009**, *1*, 15. [CrossRef]
48. Khadem, S.; Marles, R.J. Monocyclic phenolic acids; hydroxy-and polyhydroxybenzoic acids: Occurrence and recent bioactivity studies. *Molecules* **2010**, *15*, 7985–8005. [CrossRef] [PubMed]
49. Cotas, J.O.; Leandro, A.; Monteiro, P.; Pacheco, D.; Figueirinha, A.; Gonçalves, A.M.M.; da Silva, C.G.; Pereira, L. Seaweed phenolics: From extraction to applications. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 384. [CrossRef]
50. Ozgen, S.; Kilinc, O.K.; Selamoglu, Z. Antioxidant activity of quercetin: A mechanistic review. *Turk. J. Agric. Food Sci. Technol.* **2016**, *4*, 1134–1138. [CrossRef]
51. Al-Saif, S.S.A.; Abdel-Raouf, N.; El-Wazanani, H.A.; Aref, I.A. Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea, Saudi Arabia. *Saud. J. Biol. Sci.* **2014**, *21*, 57–64. [CrossRef]
52. Rohn, S.; Buchner, N.; Driemel, G.; Rauser, M.; Kroh, L.W. Thermal degradation of onion quercetin glucosides under roasting conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1568–1573. [CrossRef]
53. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
54. Zhang, Q.; Zhang, J.; Shen, J.; Silva, A.; Dennis, D.A.; Barrow, C.J. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *J. Appl. Phycol.* **2006**, *18*, 445–450. [CrossRef]
55. Ozgen, M.; Reese, R.N.; Tulio, A.Z.; Scheerens, J.C.; Miller, A.R. Modified 2, 2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1151–1157. [CrossRef] [PubMed]
56. Xiao, F.; Xu, T.; Lu, B.; Liu, R. Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Front.* **2020**, *1*, 60–69. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo 2. Métodos verdes de extracción de matrices agroindustriales

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Una fuente primordial de compuestos funcionales se encuentra de forma latente en el potencial remanente que albergan los subproductos de la industria agroalimentaria, siendo una alternativa prometedora al enriquecimiento de dietas carentes de compuestos funcionales, a la par de revalorizar lo que de otra forma terminará siendo un residuo. A su vez, la aplicación adecuada de metodologías extractivas hacia la obtención de un proceso factible de recuperación de estos compuestos bioactivos puede desembocar en una tarea compleja.

Dentro de los subproductos de la industria agrícola, el bagazo de la uva blanca, el remanente generado luego de los procesos de vinificación, presenta un perfil bioactivo interesante resaltado por un amplio abanico de compuestos polifenólicos. Aplicaciones comunes para el bagazo de la uva comprenden, de forma general, su uso como materia prima en la fabricación de bebidas espirituosas, alcohol, o como abono, limitando el potencial que alberga este subproducto.

En este capítulo se procede a presentar un trabajo publicado enfocado en la aplicación de una metodología sencilla, de pocas etapas y requerimientos energéticos; denominada sistema a mediana escala y temperatura ambiente (MSAT), como medio en la extracción de compuestos bioactivos del bagazo de la uva. Así, se lleva cabo un proceso de optimización operacional como un análisis de disolventes en busca de un extracto de elevada bioactividad.

Mediante la aplicación de metodologías analíticas de HPLC-MS/MS y análisis de índices bioactivos, son caracterizados diversos extractos en mezclas hidroorgánicas utilizando disolventes de categoría GRAS. Adicionalmente se realiza un estudio de estabilidad, evaluando los procesos de bioconversión polifenólica en función de diferentes factores de almacenamiento.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.1. Optimization of bioactives extraction from grape marc via a medium scale ambient temperature system and stability study

Aly Castillo, María Celeiro, Laura Rubio, Andrea Bañobre, Miguel Otero-Otero, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores

Frontiers, 9 (2022), 1008457
ISSN: 2296-861X, Frontiers
DOI: 10.3389/FNUT.2022.1008457

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

frontiers | Frontiers in Nutrition

TYPE Original Research
PUBLISHED 28 October 2022
DOI 10.3389/fnut.2022.1008457

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Angel Gil-Izquierdo,
Center for Edaphology and Applied Biology of Segura (CSIC), Spain

REVIEWED BY
Khashayar Sarabandi,
Zahedan University of Medical Sciences, Iran
Veronica Sanda Chedea,
Research Station for Viticulture and Enology Blaj (SCDVV Blaj), Romania

*CORRESPONDENCE
Aly Castillo
alyjesus.castillo.zamora@usc.es

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to Nutrition and Food Science Technology, a section of the journal Frontiers in Nutrition

RECEIVED 31 July 2022
ACCEPTED 13 October 2022
PUBLISHED 28 October 2022

CITATION
Castillo A, Celeiro M, Rubio L, Bañobre A, Otero-Otero M, Garcia-Jares C and Lores M (2022) Optimization of bioactives extraction from grape marc via a medium scale ambient temperature system and stability study.
Front. Nutr. 9:1008457.
doi: 10.3389/fnut.2022.1008457

COPYRIGHT
© 2022 Castillo, Celeiro, Rubio, Bañobre, Otero-Otero, Garcia-Jares and Lores. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Optimization of bioactives extraction from grape marc via a medium scale ambient temperature system and stability study

Aly Castillo[1,2]*, María Celeiro[1,2], Laura Rubio[1,2], Andrea Bañobre[1], Miguel Otero-Otero[1], Carmen Garcia-Jares[1,2] and Marta Lores[1]

[1]Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Soluciones Analíticas (LIDSA), Department of Analytical Chemistry, Nutrition, and Food Science, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain, [2]CRETUS, Department of Analytical Chemistry, Nutrition, and Food Science, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

A scalable procedure with minimum energy requirements, MSAT (Medium Scale Ambient Temperature), in combination with solvents generally recognized as safe (GRAS), has been optimized to obtain polyphenolic extracts from white grape (*Vitis vinifera*) marc. The solvents considered were propylene glycol (Pg), ethanol (Et), and ethyl lactate (Lc), as well as their respective hydro-organic mixtures. In a first approach, the operating parameters were optimized through a response surface matrix: extraction solvent volume (range 10–150 mL), marc mass (range 20–200 g) and marc/dispersant mass ratio (range 0.5–2 g·g^{-1}), using the total polyphenol content (TPC) and the antioxidant activity (AA) of the extracts as response parameters. The highest TPC (5,918 mgGAE·L^{-1}) and AA (44 mmolTE·L^{-1}) values were obtained using 200 g marc and 100 mL solvent. Regarding the type of solvent, a better response was reached with Lc > Et > Pg > H_2O obtaining a polyphenol concentration of 252 mg·L^{-1} for the hydro-organic isovolumetric ratio of ethyl lactate. In addition, the stability of the extracts was studied for 62 days. The effect of factors such as temperature, light exposure, and oxidative reactivity was evaluated. The bioactivity indices showed no changes with the storage conditions of the extracts in the first month of analysis, after which 75% of the antioxidant activity as the concentration of the polyphenolic profile (204 mg·L^{-1}) remains. The absence of reactive oxygen and the cooling of the extract (4°C) were the most determining factors ($p < 0.05$) in modulating the stability of the total polyphenolic profile.

KEYWORDS

MSAT, polyphenols, antioxidant activity, grape marc, GRAS solvents, ethyl lactate, natural extracts, LC-MS/MS

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Introduction

Within the main categories of agri-food exports of the European Union, wine production has dominated the basket of products in the last 5 years, with more than 165 million hectoliters generated annually (1). To meet this demand, more than 3.2 million hectares of vineyards are required, from which an average of 11 million tons of grapes are extracted each year, destined for winemaking purposes only (2). As a result of the winemaking process, around 25% in dry weight of this raw material is generated as a by-product, mainly comprised of grape skins, pips, and stems, called grape marc (3). This residual by-product causes an important handling and storage problem, where it's discriminated and direct deposition in soils and groundwater leads to a potential phytotoxic. This is due to the release of high amounts of tannins and polyphenols, together with high oxygen consumption, which could have a negative impact on wildlife growth (4, 5). In contrast, the high content of bioactive compounds in grape marc, including both flavonoids and non-flavonoids, has shown important antioxidant and antimicrobial effects, being associated with the prevention of numerous diseases, including cardiovascular problems, neurodegenerative disorders such as Alzheimer's, in addition to various forms of cancer (3, 6).

Currently, there are several extractive processes that seek to recover the bioactive compounds contained in grape marc (7). The most traditional are solid-liquid extraction by mechanical agitation and Soxhlet extraction, generally using ethanolic or methanolic solutions as solvents (8). The main challenges of these processes are the degradation of thermolabile compounds, long extraction time, toxicity, and environmental safety (9). Other techniques such as pressurized liquid extraction (PLE) (10), ultrasound assisted extraction (UAE) (11), microwave assisted extraction (MAE) (12), and supercritical fluid extraction (SFE) (5), are some of the current alternatives to industrial extractive processes. In general, these techniques face a complex trade-off between extractive efficiency and energy consumption, impacting on scale-up, such as the balance between optimal operating conditions (pressure and temperature) and extract integrity (13).

A scalable method, incorporating standard temperature and pressure conditions, MSAT (Medium Scale Ambient Temperature), has been widely applied in the extraction of polyphenolic compounds from plants (*Cytisus scoparius*) (14) and agro-industrial by-products (*Vaccinium corymbosum*) (15). Due to the scaling versatility of the process supported by a wide set of optimizable variables, and its combination with generally recognized as safe (GRAS) solvents such as ethyl lactate, glycols, ethanol, and aqueous solutions of mineral salts, it is an attractive technique for practical application purposes in different areas (16).

The synergistic activity provided by solvents in the generation of natural extracts is well known, not only in the overall obtaining of polyphenolic compounds, but also in their inherent bioactivity. Likewise, and contradictorily, isolation efforts toward individual analytes contained in plants are laborious, reducing their integral activity in fractionation, where the whole of their constituents is required to observe the biological effect (17). Moreover, the versatility of obtaining a ready-to-use ingredient in the liquid state provides a range of advantages in relation to diffusion, dosage, and application. However, a fundamental part of natural additive formulations is the evaluation of their chemical stability as a finished product during the storage period, which is of particular importance for liquid products (16). The stability of the compounds that make up a nutraceutical formulation can be affected due to changes in storage conditions resulting in the modification of their nutritional value (e.g., antioxidant capacity, composition, and bioavailability) (18). Polyphenols present unsaturated bonds and a high antioxidant capacity, which makes them sensitive to heat, pH variations, light, and the presence of oxygen (19). At the same time, they show a heterogeneous degradation profile, being dependent both on their phenolic nature and on the operational conditions under which they are obtained. This highlights the need to know and control both the extraction process and the stability and preservation conditions of each specific extract.

Therefore, this work performs a comprehensive analysis of the production of bioactive extracts from grape marc using the MSAT extraction technique. Based on the optimization study of the operational parameters involved in the extractive process, the total polyphenolic content (TPC) and antioxidant activity (AA) of the extract were maximized. Also, the affinity selected of the GRAS solvents: ethyl lactate, ethanol, and propylene glycol, as well as their hydro-organic mixtures, toward the main phenolic families contained in the marc, was evaluated. In addition, the stability of the extracts generated when stored under various conditions of temperature, light and oxidative exposure was analyzed by means of a 62-day periodic test.

Materials and methods

Standard and reagents

The standards used for the quantification of bioactivities as well as the individual characterization of the main polyphenolic compounds contained in the white grape extract, with their CAS numbers, purity, and suppliers are summarized in **Supplementary Table 1**. The solvents used for the extraction process were ethanol, ethyl lactate, propylene glycol, and ultrapure water of MS grade from Scharlab (Barcelona, Spain). MS-grade methanol obtained from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany) and formic acid from Merck (Darmstadt, Germany), were used to prepare the mobile phases for chromatographic analysis.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Grape marc

In this work, the marc for the 2021 harvest was obtained directly from Galician vineyards, specifically from Albariño white grapes. The grapes were cultivated in the Rías Baixas denomination of origin, in the subzone of O Salnés, at the Mar de Frades winery. Once the grapes were pressed in the winery, the marc was collected and placed in food-grade bags (20 cm × 20 cm) hermetically sealed for freezing (–20°C). The marc, which has a moisture content of 65.37% and an acid pH of 4.19, was kept in these conditions until the time of processing to obtain the extracts.

Medium-scale ambient temperature extraction

Frozen marc was weighed according to design specifications and crushed without pre-treatment in a food grinder (Moulinex, France) until an average particle diameter of 5 mm was obtained. The marc was then dispersed with SiO_2 (particle size 0.707 mm) using a mortar and pestle for 5 min. MSAT extraction was carried out on an Afora V-53721 glass column (23 cm × 50 mm Ø) with a 0-pore filter plate (160–250 μm) containing 1 g of SiO_2 layer at the bottom. Then, the mixture of disrupted marc and SiO_2 was transferred to the column and compacted. Finally, the extract was eluted with the different volumes and solvents considered in the study by maintaining a controlled extractive flow of 2 mL·min^{-1}.

Total polyphenol content index

The total polyphenolic content (TPC) index of grape marc extracts was determined by the Folin-Ciocalteu method following Zhang's guidelines for microtitration in 96-well plates (20). Briefly, a total of 20 μL of pure extract without further modifications is diluted and subsequently mixed with 100 μL of Folin-Ciocalteu reagent (1:10, v/v) and 80 μL of sodium carbonate solution (7.5 g·L^{-1}). The mixture was shaken and isolated in the dark for 30 min and then measured at 760 nm in a microplate reader (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany). To express the TPC index, calibration curves of gallic acid covering a concentration range of 20–160 mg·L^{-1} (0.200–0.800 absorbance unit [AU]) were employed. TPC was expressed as milligrams of gallic acid equivalent per liter of extract (mgGAE·L^{-1}).

Antioxidant activity

The antioxidant activity (AA) of the extracts, as well as their mean inhibitory concentration IC50, were determined using the DPPH reagent following the method described by Symes et al. (21). Briefly, 100 μL of the extracts at eight different concentration levels were placed in a 96-well plate and mixed with 100 μL of DPPH reagent prepared in methanol. The mixture was kept in the dark for 10 min and the measurement was performed at 515 nm. To express the AA, a calibration curve of Trolox in the range of 3–31 mg·L^{-1} (0.200–0.800 AU) was employed. The AA was represented as millimoles Trolox equivalent per liter of extract (mmolTE·L^{-1}). The half inhibitory concentration (IC50) of the samples was also measured and referred to the total polyphenolic content (mgGAE·L^{-1}) present in the extract.

Reducing sugars

The total reducing sugar content of the extracts was determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method following the method of Gonçalves et al. (22) with slight modifications. Briefly, 25 μL of the extract was mixed with 25 μL of DNS reagent. The reaction takes place in a bath at 100°C for 5 min. The measurement was performed at 540 nm. To express the total content of reducing sugars, a calibration curve of glucose was used in the range of 0.5–2 mg·L^{-1} (0.200–0.800 AU). Results were represented as mg glucose equivalent (mg GLE) per liter of extract.

LC-MS/MS analysis

The quantification of the polyphenols in the extracts was performed by LC-MS/MS using a Thermo Scientific (San Jose, CA, USA) instrument based on a TSQ Quantum Ultra^{TM} triple quadrupole mass spectrometer equipped with a heated electrospray ionization (HESI) source, and an Accela Open autosampler with a 20 μL loop. Optimal instrumental conditions were previously optimized by Celeiro et al. (23). The chromatographic separation was performed employing a Kinetex C18 column (100 mm × 2.1 mm × 100 Å) obtained from Phenomenex (Torrance, CA, USA). The mobile phase was composed of water (A) and methanol (B), both with 0.1% formic acid. The chromatographic gradient was 5% B to 90% B in 11 min and kept constant for 3 min. Initial conditions were achieved in 6 min. Injection volume was 10 μL, with a flow rate of 0.2 mL·min^{-1}, and column temperature was set at 50°C. Compound identification and detection were performed by selected reaction monitoring (SRM) working simultaneously in both negative and positive mode, monitoring two or three MS/MS transitions for each compound. The MS/MS parameters for all studied compounds were optimized by individual direct infusion and the most abundant collision-induced fragments were considered for quantification (**Supplementary Table 2**). Other HESI source parameters were the spray voltage: 3,000 V, vaporizer temperature: 350°C, sheath gas pressure: 35 au (arbitrary units), and ion sweep and auxiliar gas pressure:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

0 and 10 au, respectively, and the capillary temperature: 320°C. The system was operated by Xcalibur 2.2. and Trace Finder 3.1. software.

Statistical analysis

Analyses were performed at least in triplicate and results were expressed as mean ± standard deviation. The optimization of the extraction procedure was carried out by a composite central response surface design evaluating the quadratic action of the considered factors. The solvent study was analyzed through a general linear one-way analysis of variance (ANOVA), comparing the individual action in contrast to the control group (100% water) by least significance difference (LSD) test. For the evaluation of the effect of storage parameters on the stability of the extract, a general linear ANOVA was performed using the Dunnett test for the comparative analysis with the control groups. The statistical analysis was performed using Minitab 22.1.1 software (Pennsylvania, USA). 3D and 2D response surface plots were generated using OriginPro, Version 2021 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

Results and discussion

Medium scale ambient temperature system operational optimization

In a first approach, an operational range was delimited considering the process variables: extract volume, marc mass, and dispersant/marc ratio, keeping fixed the extractant solvent (ethanol-water 50:50) and SiO_2 as disruptor (**Table 1**). The ethanol-water mixture was initially selected due to its high capacity for the extraction of various phenolic compounds from agro-industrial residues (24, 25), resulting in extracts characterized by a higher antioxidant activity than extracts obtained with pure water or ethanol (26). As for the dispersant material, SiO_2 from sea sand was selected over other materials such as Florisil or diatomaceous earth (DE). The limited size range, typically less than 150 μm for DE, as well as higher costs for Florisil decreased the feasibility of the optimization process and subsequent scale-up.

For the analysis of operational factors, a composite center response surface matrix (RSM) design divided into three orthogonal blocks was used to provide a measure of operational stability throughout the tests. **Table 2** summarizes the design matrix comprising 20 trials bounded by eight hub area points, six axial points, four hub center points, and two axial center points. The TPC and the AA of the extracts were considered as the response variables to evaluate the results of the design.

The TPC values show clear differences among the design experiments. All three factors were statistically significant: the amount of marc (A, $p = 0.009$), the volume of extraction solvent (B, $p = 0.003$) and the dispersant/marc ratio (C, $p = 0.005$), as well as the ratio between factors B and C ($p = 0.023$). Antioxidant activity followed the same behavior as TPC, although for this parameter the design factors were not statistically significant.

TABLE 1 Extraction parameters and factor levels used in the surface design for medium scale ambient temperature (MSAT) extraction.

Parameters	Legend	Fixed	Low	High
Marc (g)	A	–	20	100
Extraction solvent (mL)	B	Ethanol-water 50:50	10	250
Dispersant/marc (g/g)	C	Dispersant: SiO_2	0.5	2

Figure 1 shows the response surface plots obtained for TPC, in which a progressive trend of TPC is observed, from 1,600 to 3,800 mgGAE·L^{-1}, with increasing marc mass and decreasing solvent volume, as well as with the marc-dispersant ratio. Values close to the lower limit are obtained by applying MSAT to sources rich in polyphenols, mainly anthocyanins and procyanidins, such as blueberries, generating TPC in the order of 1,455 mgGAE·L^{-1} (18). By applying other processes such as ultrasound-assisted extraction (UAE), liquid bioactive extracts have been generated from bagasse from organic sources such as carrots with TPCs in the order of 1,903.2–2,754.9 mgGAE·L^{-1} (19).

At the same time, direct comparison of the obtained TPC range (1,634–3,727 mgGAE·L^{-1}) with other extractive processes from white grape marc is complex, due to a general solid extract production approach, where the extractive yield is referred to the initial marc mass content (mgGAE·g^{-1}). Values have been reported for ethanolic extracts via UAE from Merlot grape marc from Krèedin grape variety, in the range of 806–2,800 mGAE·L^{-1} (20). Although a different polyphenolic content is expected due to being from the red winemaking process, such values are obtained by processes with higher energy requirements in relation to the MSAT technique, as well as mass values below 2 g.

Another aspect that stands out in **Figure 1** is that the area delimiting the maximum sectors is partially located at the extremes of the experimental domain considered. Thus, the addition of new experiments was proposed to extend the experimental design matrix. These experiments are delimited through an optimization algorithm using predictive tests to increase the polyphenolic content and antioxidant activity while respecting the operational limits of the extractive column.

Table 3 shows the results obtained with the additional points of the design, confirming that the TPC and AA values increase with the mass of marc extracted. In general, good agreement was obtained between the predicted and measured values, although in experiment 22 the measured TPC and AA values were higher than the predicted values. When incorporating the new experiments, the response surface plots (**Figure 2**) revealed a significant interaction between marc mass and dispersant-marc ratio (AC interaction) with $p = 0.005$ and $p = 0.024$ for TPC and AA, respectively. The optimum working zone

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10.3389/fnut.2022.1008457

TABLE 2 Design matrix and results obtained for bioactive indexes total polyphenol content (TPC) and antioxidant activity (AA).

Assay	Type	Block	A	B	C	TPC (mgGAE·L^{-1})	AA (mmolTE·L^{-1})
1	Central	2	60	130	1.25	3,016	23.1
2	Central	2	60	130	1.25	2,998	19.0
3	Cube	2	36	57	1.71	3,679	27.0
4	Cube	2	36	203	0.79	2,550	19.5
5	Cube	2	84	203	1.71	2,677	16.7
6	Cube	2	84	57	0.79	3,128	18.3
7	Central	1	60	130	1.25	2,793	13.2
8	Cube	1	84	57	1.71	3,727	21.5
9	Central	1	60	130	1.25	2,829	26.7
10	Cube	1	36	203	1.71	2,068	18.2
11	Cube	1	84	203	0.79	2,271	17.9
12	Cube	1	36	57	0.79	1,634	12.5
13	Central	3	60	130	1.25	2,319	17.7
14	Central	3	60	130	1.25	2,791	23.1
15	Axial	3	60	130	2.00	3,714	30.6
16	Axial	3	60	10	1.25	3,304	25.8
17	Axial	3	60	250	1.25	1,642	11.9
18	Axial	3	60	130	0.50	2,321	20.5
19	Axial	3	20	130	1.25	2,009	18.8
20	Axial	3	100	130	1.25	3,508	28.1

A, Marc mass (g); B, extract volume (mL); C, dispersant/Marc ratio.

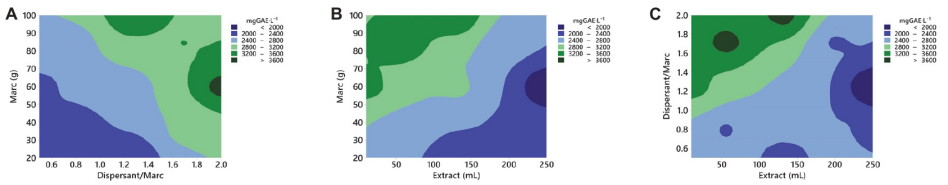


FIGURE 1
Response surface matrix for total polyphenolic content (TPC, mgGAE·L^{-1}) by modifications in the operational variables of the medium scale ambient temperature (MSAT) extractive process. **(A)** Dispersant/marc × marc. **(B)** Extraction solvent × marc. **(C)** Extraction solvent × dispersant/marc.

corresponds to the values of 200 g of marc, 100 mL of extracting solvent and 1.25 marc-dispersant ratio, obtaining a maximum TPC of 5,918 mgGAE·L^{-1}. This value represents a high level in contrast to other extractive procedures, such as enzymatic processes for the extraction of phenols from the marc of white grapes, where TPCs of the order of 1,272–2,659 mgGAE·L^{-1} are obtained (21), showing higher MSAT values (4.6 and 2.2 times, respectively).

Solvent selection

Once the operational parameters were optimized, a study was carried out to select the best solvent considering only GRAS solvents: ethyl lactate, ethanol and propylene glycol mixed with water in different percentages (25, 50, 75, and 100%). To compare the extraction efficiency, a general linear ANOVA was used to determine the individual effect by means of LSD comparative analysis, considering 100% water as the control solvent. The analysis of the results considered: the content of reducing sugars and the acidity of the extracts; the bioactive profile of the extracts measured by TPC, AA, and IC50; and the polyphenolic profiles, evaluating 11 different polyphenols.

Total reducing sugar content and extract acidity

The industrial production of bioactive extracts from plants and agricultural by-products usually generates liquid products. However, a total or partial drying process of the extracts is often implemented to reduce their volume and/or to improve

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TABLE 3 Additional experiments to expand the experimental design matrix and prediction results for total polyphenol content (TPC) and antioxidant activity (AA).

Assay	A	B	C	Predicted TPC ($mgGAE \cdot L^{-1}$)	Real TPC ($mgGAE \cdot L^{-1}$)	Predicted AA ($mmolTE \cdot L^{-1}$)	Real AA ($mmolTE \cdot L^{-1}$)
21	150	150	2	3691	3393	22.6	24.7
22	200	100	1.25	4528	5918	34.1	44.0
23	165	75	1.70	4937	4140	29.6	28.2

A, Marc mass (g); B, extract volume (mL); C, dispersant/Marc ratio.

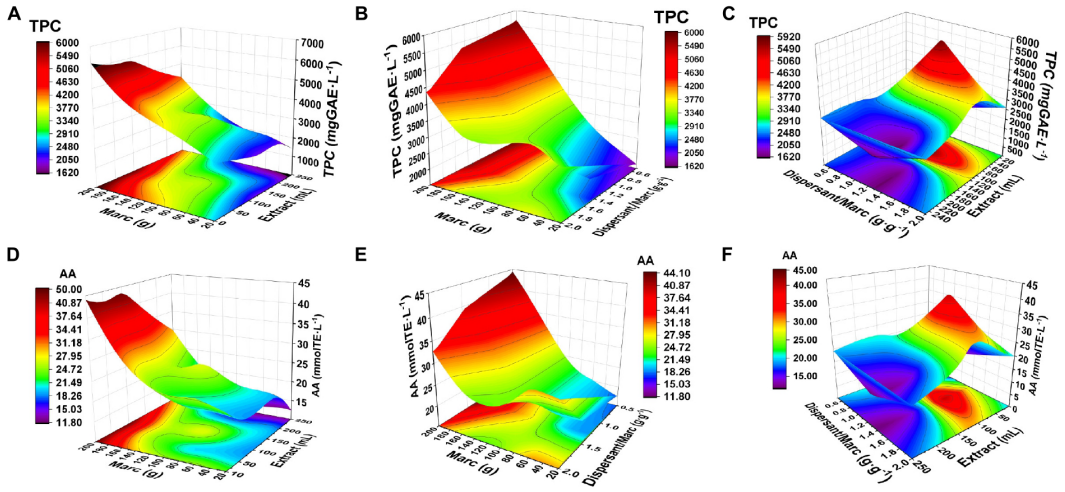


FIGURE 2
Statistical optimization of operational variables and their impact on total polyphenol content (TPC) and antioxidant activity (AA) bioactive indicators in the medium scale ambient temperature (MSAT) extractive process through the expanded experimental domain using response surface matrix (RSM). For TPC response: **(A)** Extraction solvent × marc. **(B)** Dispersant/marc × marc. **(C)** Extraction solvent × dispersant/marc. For the AA response: **(D)** Extraction solvent × marc. **(E)** Dispersant/marc × marc. **(F)** Extraction solvent × dispersant/marc.

their handling and application properties (27). Spray drying and lyophilization are the most used techniques to produce solid natural extracts. Other alternatives to solvent removal such as vacuum evaporation and drying by N_2 current have been successfully applied to ethanolic and ethyl lactate natural extracts at temperatures not higher than 100°C (28). It is important to consider that when these techniques are used in food media rich in sugars and acids, they present compaction problems, since the glass transition temperature (20°C) is exceeded, when a hard, solid, and amorphous sugar undergoes a transformation to a liquid, soft and gummy phase, generating a semi-solid state that is not very manageable (29). In addition, factors such as acidity play a role in modulating the bioactivity of the extracts, with a greater degradation of the polyphenolic content in basic media (30). Since the aim is to obtain a versatile extract that can be used for solid-state production while maintaining maximum bioactivity, the selected response factors were the content in reducing sugars and the pH of the extract. The results are shown in **Table 4**.

No significant effect ($p > 0.05$) was evidenced in the extraction of reducing sugars because of the modification of the solvents considered. However, the analysis shows a decrease of more than 30% of the total sugar content when pure ethyl lactate is used as extractant. The selectivity of ethyl lactate toward bioactive compounds and its low affinity toward carbohydrates such as glucose and sucrose has been reported in natural algal extracts, where less than 1% of these compounds are obtained in relation to other solvents such as ethanol, methanol, and acetone (31). As for the pH, it ranged from 4.11 to 4.96, with lower values, in general, the lower the water content in the solvent mixture. The 50:50 ethyl lactate-water mixture resulted in extracts with the highest acidity.

Bioactive profile of the extracts: Total polyphenol content, antioxidant activity, and IC50

The bioactivity of natural extracts is strongly conditioned by the type of extractant solvent and its capacity for the extraction

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TABLE 4 Grape marc extraction solvent selection using the medium scale ambient temperature (MSAT) extractive technique: effect on reducing sugars content and pH.

Solvent	Rate	Reducing sugars ($g \cdot L^{-1}$)	pH
Water	100	51.26	4.31
Ethanol	25	46.51	4.44^{H}
	50	53.03	4.62^{H}
	75	47.84	4.72^{H}
	100	40.00	4.96^{H}
Ethyl Lactate	25	44.86	4.22
	50	44.07	4.11^{L}
	75	41.17	4.62^{H}
	100	34.91^{L}	4.73^{H}
Propylene glycol	25	42.88	4.42
	50	51.47	4.47^{H}
	75	46.09	4.58^{H}
	100	48.20	4.63^{H}
LSD Test		$p > 0.05$	$p < 0.001$

^{H}Upper significant value. ^{L}Lower significant value.

of bioactive compounds with different polarities (32). Ethanolic-based solvents have been widely used demonstrating a high antioxidant potential. Other solvents such as propylene glycol, widely used in the feed field, and ethyl lactate, used in the food industry, have been much less explored for the extraction of natural bioactive compounds (33, 34). For the first time here is reported a global analysis of white grape marc that incorporates the evaluation of these three GRAS solvents in line with a minimum requirements technique such as MSAT system. In this work, the effect of ethanol, ethyl lactate, and propylene glycol and their mixtures with water on widely recognized bioactivity indexes: TPC, AA, and mean inhibition index (IC50) has been evaluated. Figure 3 shows the results obtained. In general, it is evident that in all cases there is a correlation between the TPC and the AA, indicating that the polyphenolic compounds are the main causes of the free radical inhibitory power of the white grape marc extract. The mixture of water and 50% ethyl lactate as opposed to the pure organic solvent, obtained the best set of parameters: DPPH (23.4 $mmolTE \cdot L^{-1}$) and IC50 (8.0 $mg \cdot L^{-1}$), as an analogous TPC (4,003 $mgGAE \cdot L^{-1}$). A similar behavior was evidenced by Lores et al., using ethyl lactate for the extraction of bioactive compounds from the plant *Cytisus scoparius*, attributing such performance to the different polarities of the solvents which allow the extraction of a wider range of compounds (14). Ethanol at the same ratio of 50% in water generated very similar results. The figure also shows a significant effect on the TPC when using solvents with a lower proportion of water. The maximum TPC value (4,606 $mgGAE \cdot L^{-1}$) of the extract obtained with pure ethyl lactate stands out. Also, it is relevant the IC50 value obtained with the lowest proportion of propylene glycol in water (25%).

Polyphenolic profiles

The extracts obtained with the different solvents tested showed diverse polyphenolic profiles considering the 11 phenolic compounds determined by LC-MS/MS (**Supplementary Figure 1**). When the sum of the concentrations of the individual compounds is evaluated (**Supplementary Table 3**), the best solvents are ethanol and ethyl lactate 50% in water, followed in efficiency by the same pure solvents. In general, ethanol presents high affinity for most of the polyphenolic families. Ethanol/water (50:50, v/v) was significantly superior for the extraction of procyanidins ($134\ mg \cdot L^{-1}$). The affinity of ethanol for these flavonoids,

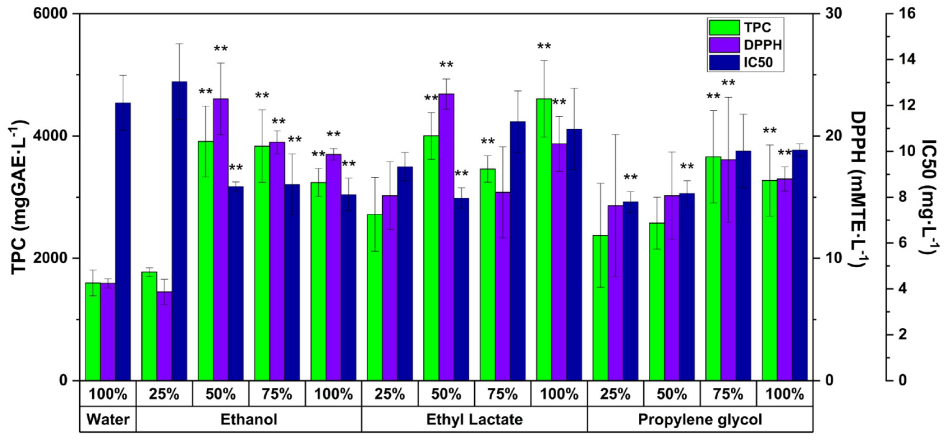


FIGURE 3
Response of the bioactive indicators antioxidant activity (AA), total polyphenol content (TPC), and IC50 to modifications in the proportions of the extractive solvents. **Significant value.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

which account for more than 50% of the polyphenols in the extract, makes it the solvent with the highest overall extraction efficiency. Below ethanol, with less than 5% difference, ethyl lactate was significantly more selective for quercetin (5.4 $mg{\cdot}L^{-1}$), being more than 60% higher than the other solvents. The similarity of these two solvents toward the extraction of bioactive compounds has been evidenced in polyphenolic families, as well as in terpenes (35) and carotenoids (36), where in the latter, ethyl lactate not only generated higher recoveries but also a greater modulation to the degradation of these thermolabile and photosensitive compounds (34). The extracts obtained with propylene glycol did not show significant differences on the total polyphenol content, due to their selectivity for the polyphenols found in lower concentrations in the extracts, especially caffeic, epigallocatechin gallate, and gallic acid.

The differences in the selectivity of the solvents tested for obtaining bioactive extracts from white marc generate the need for a compromise in the selection of an extraction solvent to obtain an extract that can be dried for production as a solid while maintaining the best combination of bioactive parameters, as well as a comprehensive polyphenolic profile. Since 50% ethyl lactate in water generated the lowest concentration of total sugar content, it is the potential candidate to produce solid extracts, maintaining high TPC, AA, and IC50 values, and a balanced polyphenolic profile. In turn, its application in the extractive process of grape marc as a food grade, non-toxic and non-carcinogenic solvent, approved for use in food and pharmaceuticals (33), results in an attractive and current approach involving a low-energy extraction (MSATs) and GRAS solvents. Therefore, this solvent was selected to continue the study, evaluating the stability of the extracts.

Stability of extracts

Bioactive profile and acidity stability

Table 5 shows the effects of the factors time, temperature, light exposure, and reactivity with oxygen on the main bioactive indices TPC, AA, IC50, and acidity of the extract. The statistical significance of the factors considered was determined by a matrix of 24 trials through a general linear ANOVA. The individual behavior of the factors was analyzed by applying Dunnett comparative test, considering the original extract (day 0) as a control group, as well as the minimum storage conditions (20°C, absence of light, and oxidative protection). The results of the statistical analysis revealed that both TPC and IC50 did not show significant variation under the different storage conditions. However, AA shows a slight modulation of 3.6% when oxygen is removed from the storage medium. In addition, the extract shows a reduced acidification ($p < 0.05$) of about 8% from the initial value when stored at 20°C, with only a 5 or 6% decrease in pH at temperatures of −20 and 4°C, respectively.

The extract shows a significant increase ($p < 0.05$) of more than 35% of the TPC on the 8th day of analysis, decreasing to the initial values for the following points of the study. However, this increase for TPC does not show a correlation with either AA or IC50. In this respect, there are previous references of similar behavior in stability studies of polyphenolic compounds, showing singular increases in the concentration of some of these compounds due to the degradation of other phenolic chains (37). A heterogeneous response in the reactivity of the Folin-Ciocalteu method to different compounds has also been demonstrated, showing that polyphenols such as quercetin, gallic acid, ellagic acid, and ferulic acid, at the same concentration, generate a 50% higher reactivity in the presence of Folin's reagent with respect to larger compounds such as rutin (38). Thus, the point increase in TPC obtained in the stability study could be due to the specific fragmentation of the large phenolic chains into smaller but more Folin-reactive compounds.

Individual polyphenolic profile stability

The evolution of the 11 polyphenolic compounds characterized in the extract under different storage conditions is summarized in **Supplementary Table 4**. The individual polyphenolic profiles during the 62 days considered and their main degradation modifiers are shown in **Supplementary Figure 2**.

The choice of 11 polyphenolic markers as indicators of extract stability under light, oxidative, and temperature effects make this evaluation a pioneering analysis of grape marc extracts, giving a better understanding of the interactions between these bioactive compounds.

In general, a significant fluctuation in the profiles is observed, where the relationship between degradation and the formation of smaller polyphenolic compounds from others with larger structures keeps the total content stable until the 8th day. Quercetin-3-glucuronide and caftaric acid are more stable, retaining up to 60% of their initial concentration during 34 days of storage. In contrast, larger polyphenolic compounds, such as rutin, and procyanidins, show a rapid degradation of around 55% from the 4th day onward. Although the absence of oxygen improves the preservation of procyanidins, the degenerative effect produced by a higher storage temperature has a greater impact on the preservation of these compounds. This behavior has been previously evidenced by Rohr et al., considering these compounds as the most unstable natural phenolic chains, with the capacity to spontaneously oxidize in the presence of oxygen, as well as their enzymatic degradation by interaction with polyphenol oxidase (39). In contrast, only temperature generates a degenerative effect in the case of rutin, decreasing its concentration by up to 63%. The thermolability of rutin has been discussed by Murakami et al., showing a higher sensitivity of this flavonoid in contrast to phenolic acids such as chlorogenic acid (40).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TABLE 5 Stability of bioactive parameters total polyphenol content (TPC), antioxidant activity (AA), and IC50, and pH of white grape marc extract in 50% ethyl lactate extractant to modification in storage conditions.

Factor	Values	TPC ($mgGAE{\cdot}L^{-1}$)	AA ($mmolTE{\cdot}L^{-1}$)	IC50 ($mgGAE{\cdot}L^{-1}$)	pH
Day	0	3,677	19.0	7.6	4.65
	2	3,518	16.1	13.2^{H}	4.52
	4	3,815	17.6	10.0	4.53
	8	$5{,}028^{H}$	19.9	14.9^{H}	4.49
	20	3,681	13.8^{L}	13.6^{H}	4.37
	34	3,286	14.1^{L}	15.8^{H}	4.32^{L}
	62	3,479	12.9^{L}	15.4^{H}	4.14^{L}
p-value		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Light	No	3,802	16.2	13.0	4.43
	Yes	3,764	16.2	12.8	4.43
p-value		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
Nitrogen	No	3,743	15.9	13.1	4.43
	Yes	3,823	16.5^{H}	12.8	4.43
p-value		>0.05	0.030	>0.05	>0.05
Temperature (°C)	−20	3,780	16.3	13.1	4.55^{H}
	4	3,802	16.4	12.7	4.468^{H}
	20	3,768	16.0	13.0	4.274
p-value		>0.05	>0.05	>0.05	<0.001

^{H}Upper significant value. ^{L}Lower significant value.

The polyphenolic compounds quercetin and gallic acid, together show a similar pattern of evolution, increasing in concentration by up to 200% over the 62 days of storage, being favored by higher temperatures (**Supplementary Table 4**). This pattern of behavior, analogous to that observed in the analysis of the TPC, is generated by the decomposition of the larger structures containing them. In this regard, it is well known that hydrolyzable tannins from glucose esters of gallic acid generate gallic acid as well as its carbohydrate substituents (41). Similarly, **Supplementary Figure 2** shows a decrease in the concentration of quercetin-3-glucoside and quercetin-3-glucuronide acids that is proportional to the increase in quercetin content.

Conclusion

The aim of this work was to obtain polyphenolic extracts from grape marc by means of an extractive method with minimum energy requirements MSAT (Medium Scale Ambient Temperature) system, using solvents generally recognized as safe (GRAS). The set of operational parameters including extractive volume (100 mL), marc mass (200 g) and its ratio with a dispersant (1.25) were efficiently optimized by applying a response surface matrix (RSM) design, obtaining maximum TPC (5,918 $mgGAE{\cdot}L^{-1}$) and AA (44 $mmolTE{\cdot}L^{-1}$) values. The robustness in the response of the operational variables together with a high correlation between the predicted response and the experimental values obtained, demonstrate the versatility of MSATs for the development of process scaling-up. Ethyl lactate was the solvent that provided the best extraction efficiency, with its 50:50 water ratio yielding extracts with the best response for bioactivity parameters, and the highest extraction of the flavonols, quercetin, and their glycoside derivatives. Also, an ethanolic extract was obtained, more enriched in flavanols and procyanidins, as well as a glycolic extract with a selective efficacy for caftaric and gallic acids. A study of the stability of the extract during 2 months of storage showed that it retains 62% of its antioxidant activity and keeps its total polyphenolic content unchanged. Thermal and light effects, as well as the presence of oxygen in the storage of the extract, did not generate significant overall changes in the bioactive properties.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary material**, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

Author contributions

ML and CG-J: conceptualization, funding acquisition, and methodology. AC: software and visualization. AB, MO-O, and AC: validation. AC, LR, and MC: formal analysis. AB and AC: investigation and writing—original draft preparation. ML: resources. AC and MO-O: data curation. AC, LR, MC, ML, and CG-J: writing—review and editing. MC, ML, and CG-J:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

supervision. AC, ML, and CG-J: project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 101036768 (NeoGiANT project). This work was also funded by project ED431 2020/06 (Galician Competitive Research Groups Xunta de Galicia). This article is based upon work from the Sample Preparation Study Group and Network, supported by the Division of Analytical Chemistry of the European Chemical Society.

Acknowledgments

The authors of this work acknowledge the Mar de Frades winery for its contribution supplying of the Albariño white grape marc.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.1008457/full#supplementary-material

References

1. European Commission. *Support and Protection of EU Grape Growers, Wine Makers, Traders and Consumers Through Policy, Legislation, Labelling, Trade Measures and Market Monitoring*. (2020). Available online at: https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products/wine_es (accessed June 26, 2022).

2. Aliaño-González MJ, Gabaston J, Ortiz-Somovilla V, Cantos-Villar E. Wood waste from fruit trees: biomolecules and their applications in agri-food industry. *Biomolecules*. (2022) 12:238. doi: 10.3390/BIOM12020238/S1

3. Garcia-Jares C, Vazquez A, Lamas JP, Pajaro M, Alvarez-Casas M, Lores M. Antioxidant white grape seed phenolics: pressurized liquid extracts from different varieties. *Antioxidants*. (2015) 4:737–49. doi: 10.3390/ANTIOX4040737

4. Muñoz P, Pérez K, Cassano A, Ruby-Figueroa R. Recovery of anthocyanins and monosaccharides from grape marc extract by nanofiltration membranes. *Molecules*. (2021) 26:2003. doi: 10.3390/MOLECULES26072003

5. Gómez-Brandón M, Lores M, Insam H, Domínguez J. Strategies for recycling and valorization of grape marc. *Crit Rev Biotechnol*. (2019) 39:437–50. doi: 10.1080/07388551.2018.1555514

6. Rama JLR, Mallo N, Biddau M, Fernandes F, de Miguel T, Sheiner L, et al. Exploring the powerful phytoarsenal of white grape marc against bacteria and parasites causing significant diseases. *Environ Sci Pollut Res*. (2021) 28:24270–8. doi: 10.1007/S11356-019-07472-1/TABLES/3

7. Iora SRF, Maciel GM, Zielinski AAF, da Silva MV, de Pontes PVA, Haminiuk CWI, et al. Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. *Int J Food Sci Technol*. (2015) 50:62–9. doi: 10.1111/IJFS.12583

8. Kalli E, Lappa I, Bouchagier P, Tarantilis PA, Skotti E. Novel application and industrial exploitation of winery by-products. *Bioresour Bioprocess*. (2018) 5:1–21. doi: 10.1186/S40643-018-0232-6

9. Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol*. (2006) 17:300–12. doi: 10.1016/J.TIFS.2005.12.004

10. Pereira DTV, Tarone AG, Cazarin CBB, Barbero GF, Martínez J. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc. *J Food Eng*. (2019) 240:105–13. doi: 10.1016/J.JFOODENG.2018.07.019

11. da Porto C, Natolino A, Decorti D. The combined extraction of polyphenols from grape marc: ultrasound assisted extraction followed by supercritical CO2 extraction of ultrasound-raffinate. *LWT Food Sci Technol*. (2015) 61:98–104. doi: 10.1016/J.LWT.2014.11.027

12. Garrido T, Gizdavic-Nikolaidis M, Leceta I, Urdanpilleta M, Guerrero P, de la Caba K, et al. Optimizing the extraction process of natural antioxidants from chardonnay grape marc using microwave-assisted extraction. *Waste Manag*. (2019) 88:110–7. doi: 10.1016/J.WASMAN.2019.03.031

13. Carpentieri S, Soltanipour F, Ferrari G, Pataro G, Donsì F. Emerging green techniques for the extraction of antioxidants from agri-food by-products as promising ingredients for the food industry. *Antioxidants*. (2021) 10:1417. doi: 10.3390/ANTIOX10091417

14. Lores M, Pájaro M, Álvarez-Casas M, Domínguez J, García-Jares C. Use of ethyl lactate to extract bioactive compounds from *Cytisus scoparius*: comparison of pressurized liquid extraction and medium scale ambient temperature systems. *Talanta*. (2015) 140:134–42. doi: 10.1016/J.TALANTA.2015.03.034

15. Gato E, Rosalowska A, Martínez-Guitián M, Lores M, Bou G, Pérez A. Anti-adhesive activity of a *Vaccinium corymbosum* polyphenolic extract targeting intestinal colonization by *Klebsiella pneumoniae*. *Biomed Pharmacother*. (2020) 132:110885. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2020.110885

16. Gato E, Perez A, Rosalowska A, Celeiro M, Bou G, Lores M. Multicomponent polyphenolic extracts from *Vaccinium corymbosum* at lab and pilot scale. Characterization and effectivity against nosocomial pathogens. *Plants*. (2021) 10:2801. doi: 10.3390/PLANTS10122801

17. Caesar LK, Cech NB. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Nat Prod Rep*. (2019) 36:869. doi: 10.1039/C9NP00011A

18. Galanakis CM. Functionality of food components and emerging technologies. *Foods*. (2021) 10:128–54. doi: 10.3390/FOODS10010128

19. Esparza I, Cimminelli MJ, Moler JA, Jiménez-Moreno N, Ancín-Azpilicueta C. Stability of phenolic compounds in grape stem extracts. *Antioxidants*. (2020) 9:1–14. doi: 10.3390/ANTIOX9080720

20. Zhang Q, Zhang J, Shen J, Silva A, Dennis DA, Barrow CJ. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *J Appl Phycol*. (2006) 18:445–50. doi: 10.1007/S10811-006-9048-4

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

21. Symes A, Shavandi A, Zhang H, Ahmed IAM, Al-Juhaimi FY, Bekhit AEDA. Antioxidant activities and caffeic acid content in New Zealand Asparagus (*Asparagus officinalis*) roots extracts. *Antioxidants.* (2018) 7:52–65. doi: 10.3390/ANTIOX7040052

22. Gonçalves C, Rodriguez-Jasso RM, Gomes N, Teixeira JA, Belo I. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Anal Methods.* (2010) 2:2046–8. doi: 10.1039/C0AY00525H

23. Celeiro M, Lamas JP, Arcas R, Lores M. Antioxidants profiling of by-products from *Eucalyptus* greenboards manufacture. *Antioxidants.* (2019) 8:263. doi: 10.3390/ANTIOX8080263

24. Lapornik B, Prošek M, Wondra AG. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J Food Eng.* (2005) 71:214–22. doi: 10.1016/J.JFOODENG.2004.10.036

25. Jara-Palacios MJ, Hernanz D, González-Manzano S, Santos-Buelga C, Escudero-Gilete ML, Heredia FJ. Detailed phenolic composition of white grape by-products by RRLC/MS and measurement of the antioxidant activity. *Talanta.* (2014) 125:51–7. doi: 10.1016/J.TALANTA.2014.02.065

26. Jara-Palacios MJ, Gonçalves S, Heredia FJ, Hernanz D, Romano A. Extraction of antioxidants from winemaking byproducts: effect of the solvent on phenolic composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities, and electrochemical behaviour. *Antioxidants.* (2020) 9:675. doi: 10.3390/ANTIOX9080675

27. Berkulin W, Theissing K-H. *Process for Preparing Dry Extracts*. Patent No. US20030104076A1. New York, NY (2003).

28. Golmakani MT, Mendiola JA, Rezaei K, Ibáñez E. Expanded ethanol with CO2 and pressurized ethyl lactate to obtain fractions enriched in γ-linolenic acid from *Arthrospira platensis* (Spirulina). *J Supercrit Fluids.* (2012) 62:109–15. doi: 10.1016/J.SUPFLU.2011.11.026

29. Muzaffar K, Nayik GA, Kumar P. Stickiness problem associated with spray drying of sugar and acid rich foods: a mini review. *J Nutr Food Sci.* (2015) 12:12000–3. doi: 10.4172/2155-9600.S12-003

30. Friedman M, Jürgens HS. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* (2000) 48:2101–10. doi: 10.1021/JF990489J

31. Castillo A, Pereira S, Otero A, Garcia-Jares C, Lores M. Multicomponent bioactive extract from red stage *Haematococcus pluvialis* wet paste: avoiding the drying step and toxic solvents. *J Appl Phycol.* (2022) 36:1–17. doi: 10.1007/S10811-022-02712-3

32. Mikucka W, Zielinska M, Bulkowska K, Witonska I. Recovery of polyphenols from distillery stillage by microwave-assisted, ultrasound-assisted and conventional solid–liquid extraction. *Sci Rep.* (2022) 12:1–13. doi: 10.1038/s41598-022-07322-0

33. Kua YL, Gan S, Morris A, Ng HK. Ethyl lactate as a potential green solvent to extract hydrophilic (polar) and lipophilic (non-polar) phytonutrients simultaneously from fruit and vegetable by-products. *Sustain Chem Pharm.* (2016) 4:21–31. doi: 10.1016/J.SCP.2016.07.003

34. Ishida BK, Chapman MH. Carotenoid extraction from plants using a novel, environmentally friendly solvent. *J Agric Food Chem.* (2009) 57:1051–9. doi: 10.1021/JF8026292/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2008-026292_0007.JPEG

35. Villanueva Bermejo D, Angelov I, Vicente G, Stateva RP, Rodriguez García-Risco M, Reglero G, et al. Extraction of thymol from different varieties of thyme plants using green solvents. *J Sci Food Agric.* (2015) 95:2901–7. doi: 10.1002/JSFA.7031

36. Strati IF, Oreopoulou V. Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste. *Int J Food Sci Technol.* (2011) 46:23–9. doi: 10.1111/J.1365-2621.2010.02496.X

37. Tomaz I, Šikuten I, Preiner D, Andabaka Ž, Huzanić N, Lesković M, et al. Stability of polyphenolic extracts from red grape skins after thermal treatments. *Chem Pap.* (2019) 73:195–203. doi: 10.1007/S11696-018-0573-9/FIGURES/4

38. Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB. A thorough study of reactivity of various compound classes towards the folin-ciocalteu reagent. *J Agric Food Chem.* (2010) 58:8139. doi: 10.1021/JF1005935

39. Rohr GE, Meier B, Sticher O. Analysis of procyanidins. *Stud Nat Prod Chem.* (2000) 21:497–570. doi: 10.1016/S1572-5995(00)80013-7

40. Murakami M, Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T. Effects of thermal treatment on radical-scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds. *J Food Sci.* (2004) 69:FCT7–10. doi: 10.1111/J.1365-2621.2004.TB17848.X

41. Mehaya FM, Mohammad AA. Thermostability of bioactive compounds during roasting process of coffee beans. *Heliyon.* (2020) 6:e05508. doi: 10.1016/J.HELIYON.2020.E05508

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo 3. Aplicaciones de los extractos bioactivos en la industria alimentaria

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La reintroducción de subproductos en la cadena de valor, destinada a la generación de alimentos funcionales, más que una alternativa de reaprovechamiento se ha convertido en una necesidad de producción. La demanda de fuentes de bioactivos como de procesos sostenibles orientados a la generación de residuos cero, resaltan la necesidad de optimizar los recursos al captar el material remanente dejado atrás en las líneas residuales. La elevada cantidad de compuestos bioactivos contenidos en los subproductos pueden otorgar una mejora en el perfil nutricional de las matrices alimentarias, así como potenciar sus propiedades funcionales.

En consonancia, fuentes desatendidas que han demostrado su capacidad para producir un amplio rango de fitoquímicos, con una alta adaptabilidad a diversos mecanismos de cultivo y un elevado rendimiento, se presentan como el complemento ideal en la creación de mecanismos sostenibles para la producción de alimentos funcionales.

En este contexto, este capítulo engloba dos publicaciones enfocadas en la introducción, por un lado, de una fuente rica en compuestos carotenoides y ácidos grasos esenciales como los es la microalga *H. pluvialis,* en la mejora de las propiedades funcionales de un alimento. Este estudio, que combina estudios analíticos mediante HPLC-DAD y GC-MS y reológicos mediante las propiedades organolépticas brindadas al alimento, contrasta el efecto funcional otorgado por *H. pluvialis* con relación a un aditivo sintético común empleado en la coloración de matrices alimentarias. Así también es evaluada la capacidad por parte de la pasta de microalga en la modulación del crecimiento bacteriano característico en los procesos de degradación alimentaria.

Por otro lado, en una segunda publicación, se evalúa la incorporación del extracto bioactivo “e-Vitis”, derivado del bagazo de la uva, como una fuente de compuestos fenólicos en el enriquecimiento de la dieta de porcinos. Este estudio incluye una caracterización no dirigida mediante UHPLC-QTOF para rastrear el proceso metabólico de los polifenoles en el tracto digestivo de estos animales de granja, con el objetivo de demostrar el efecto positivo en su salud gastrointestinal.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1. EXTRACTOS ACUÍCOLAS

3.1.1. The generally recognized as safe (GRAS) microalgae *Haematococcus pluvialis* (wet) as a multifunctional additive for coloring and improving the organoleptic and functional properties of food

Aly Castillo, Tiane C. Finimundy, Sandrina A. Heleno, Paula Rodrigues, Filipa A. Fernandes, Simón Pereira, Marta Lores, Lillian Barros, Carmen Garcia-Jares

Food & Function, 14 (2023), 6023
ISSN: 2042-650X, 2042-6496, Royal Society of Chemistry (RSC)
DOI: 10.1039/D3FO01028G

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Food & Function

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Check for updates

Cite this: *Food Funct.*, 2023, **14**, 6023

The generally recognized as safe (GRAS) microalgae *Haematococcus pluvialis* (wet) as a multifunctional additive for coloring and improving the organoleptic and functional properties of foods†

Aly Castillo, *[a,b,c] Tiane C. Finimundy, [d,e] Sandrina A. Heleno, [d,e] Paula Rodrigues,[d,e] Filipa A. Fernandes,[d,e] Simón Pereira,[f] Marta Lores, [b] Lillian Barros [d,e] and Carmen Garcia-Jares[a,b]

Received 15th March 2023,
Accepted 21st May 2023

DOI: 10.1039/d3fo01028g

rsc.li/food-function

This work proposes the application of astaxanthin-rich *H. pluvialis* wet paste (HPW) as a partial substitute for wheat flour in the preparation of filloas, a dish that combines the basic ingredients of industrial bakery. The nutritional and color profile of HPW-enriched samples was evaluated by comparative analysis with a mixture of synthetic food dyes. The highest content of carotenoids (798 ± 12 μg g^{-1}) and fatty acids (76 ± 2 mg g^{-1}) was obtained for a filloa fortified with *H. pluvialis* in contrast to a non-significant dye response. Subsequently, the color stability of the fortified filloa was evaluated over time (3, 6 and 9 days), as well as its physicochemical properties and microbiological profile. As a result, HPW provided filloas with a longer shelf life, brightness (*L), and texture, in comparison with a mixture of synthetic dyes. In addition, an inhibitory effect of HPW towards mesophilic aerobic microorganisms in the food was obtained.

Introduction

Aesthetics as an enhancer of the final product in the food industry has a positioning equal to or greater than the nutritional value provided.[1] Consumer choice has been proven to be highly dependent on the appearance, appearance-induced expectations, and visual quality of the food.[2] These demands have focused efforts on whole foods that incorporate organoleptic and functional properties, generally requiring a wide number of additives and specific functional ingredients. As an alternative to the high costs of improving individual food properties, multifunctional additives are clearly more attractive as they improve more than one aspect of the final product. Among the most common family of additives, the use of synthetic additives prevails over natural additives, due to their lower production costs, giving them an 18% superiority in the global food market in the last 5 years.[3] In contrast, their excessive use has been framed in a controversial environment due to the potential impact on the consumer, being associated with reactions such as asthma, allergies, and tumor development.[4]

Within synthetic additives, food colors stand out for their high consumption, with a five-fold increase in intake over the last 60 years.[5] Paradoxically, they generally do not provide any nutritional value, coupled with the growing concern about their adverse health effects.[6] The main market for synthetic colors is focused on sectors such as confectionery, where children, the main consumers, are particularly affected by the intake of these substances. Artificial colors such as azorubine (E-122), tartrazine (E-102), erioglaucine (E-133), sunset (E-110), quinoline (E-104), allura (E129), and ponceau 4R (E-124) have been linked to possible effects on activity and attention in infants.[7] Because of this, there is a trend in the industry to remove synthetic food colors and replace them with natural products.

[a]*CRETUS, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain. E-mail: alyjesus.castillo.zamora@usc.es*
[b]*LIDSA, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain*
[c]*i-Grape Laboratory, Edificio Emprendia, Avda Mestre Mateo s/n, 15702 Santiago de Compostela, Spain*
[d]*Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Bragança, 5300-253, Portugal*
[e]*Laboratório Associado para a Sustentabilidade e Tecnologia em Regiões de Montanha (SusTEC), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal*
[f]*Institute of Aquaculture and Department of Microbiology and Parasitology, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela, Spain*

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: https://doi.org/10.1039/d3fo01028g

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2023

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Recent research on functional food ingredients has shown interest in developing foods containing algae or algal ingredients.[8] Within this large group of living organisms, one of the most promising sources of bioactive ingredients and compounds for novel food products, which can be used to improve the nutritional value of foods due to their balanced chemical composition, are microalgae.[9] Different approaches have increased the bioactive content of diverse food matrices, incorporating freeze-dried microalgae such as *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Spirulina* sp. at concentrations of 1 to 10% $g_{microalga}$ g_{food}^{-1}, obtaining high consumer acceptance and even a predilection for foods enriched with these microorganisms.[10–12] Likewise, microalgae have several attractive characteristics for large-scale sustainable production, such as high biomass yields per unit area and the ability to be cultivated on a non-arable land using non-potable water or even salt water.[13] In turn, because not all microalgae are suitable for consumption, approval as a Generally Recognized as Safe (GRAS) organism is necessary. Limited microalgae have the FDA-recognized GRAS status, mainly because this category requires costly and time-consuming safety testing, which has limited the number of algal species with the GRAS status.[14]

A microorganism characterized by its capacity to accumulate bioactive compounds, where carotenoids and fatty acids stand out, is the microalga *Haematococcus pluvialis.*[15] This alga belongs to the GRAS category, being an indirect but essential coloring agent in providing the characteristic reddish hue to salmon. This coloring is due to its ability to store up to 6% dry weight (DW) of astaxanthin, and other carotenoids such as β-carotene and lutein.[16] This makes the microalga not only a powerful coloring agent, but also a source of antioxidants with potential action in the prevention of various health disorders and metabolic diseases.[17] In turn, *H. pluvialis* is cultivated to produce omega-3 and omega-6 fatty acids, as it can store up to 32% DW of these essential fatty acids.[18] In addition to their beneficial effect in combating cardiovascular diseases, these fatty acids are linked to astaxanthin through esterification processes, giving it greater stability against degradation,[19] maintaining its bioactive capacity and bioavailability, as well as prolonging its coloring capacity.

There is limited information on the use of microalgae as an additive in the confectionery industry, to enrich its organoleptic and functional properties. Only one study has used *H. pluvialis* as a partial substitute for whole grains to reduce the glycemic response in cookies, showing a healthy alternative with bioactive potential.[20] However, the costly lyophilization process required to obtain flour from *H. pluvialis* and the subsequent dry milling, which favors the degradation of carotenoid compounds, make its use as a colorant on a commercial scale complex.[21] Therefore, a direct method that takes advantage of the bioactive content of wet microalgae pastes by avoiding pre-treatment of the biomass would be an attractive approach.

In this way, this work shows a functional alternative for the enrichment of the organoleptic and bioactive properties of filloas (Galician pancakes), a typical dish from the northwest of the Iberian Peninsula, which combines the essential ingredients of the confectionery industry. The microalga in its wet state is proposed as a natural coloring agent in contrast to commercial synthetic colorants. Likewise, its functionality as a potential moderator of the physicochemical and microbiological degradation of foodstuffs is determined through a stability study.

Materials and methods

Haematococcus pluvialis wet paste biomass

The astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* wet paste (above 50 $mg_{astaxanthin}$ g_{DW}^{-1}) was obtained through a two-step industrial process optimized for maximum astaxanthin concentration following the best set of parameters delimited by Pereira and Otero 2020.[22] In summary, in a first stage, the vegetative cell growth of *H. pluvialis* is promoted until a defined density is reached (target value: 7.0×10^6 cells per mL). Then, the microalga is exposed to inductive conditions of irradiation and nitrate starvation, which induced the accumulation of astaxanthin. The wet biomass is centrifuged to remove free water until a paste containing about 25% solids is obtained. The paste was then stored at a temperature of −20 °C.

Filloa preparation

The preparation of filloas was outlined by the American Association for Cereal Chemistry (AACC) 10-80.01 Baking Flour Quality in a Pancake-Making Method, with slight modifications applied to preserve the original organoleptic characteristics of filloas.[23] The basic recipe requires flour (136 g), two eggs, milk (340 mL), salt (0.20 g) and sugar (10 g). The addition percentages of the microalgae paste were determined by a previous analysis (results not shown) of 50% inhibition of oxidative haemolysis (OxHLIA). Thus, a concentration that guarantees 50% inhibition of OxHLIA analysis was added as a lower limit; 7% (7 $g_{microalgaeDW}$ 100 g_{flour}^{-1}) (HPW7) as well as an inhibition higher than 95% using 13% (13 $g_{microalgaeDW}$ 100 g_{flour}^{-1}) (HPW13) have been considered. These concentrations provide a total free astaxanthin concentration in a 20 g portion below the intake suggested by the European Food Safety Authority of 8 mg day^{-1}.[24] For comparative analysis of the pigmentation obtained by the addition of HPW relative to a synthetic dye (ESI Table S1†), the volumes of the commercial colorants E122 (2.6 mL) and E102 (3.9 mL) were determined by colorimetric analysis to an equivalent hue between the colorant and HPW7 of ±4 (ESI Fig. S1†).

For the preparation of the control filloas, eggs and milk were mixed with an electric mixer for 2 minutes. Then, salt, sugar, and flour were added and mixed for 3 minutes. HPW supplemented filloas were prepared by replacing the wheat flour by the corresponding dry weight of the algae paste (7 and 13%). The optimized volume of E122 red and E102 yellow was added for the comparative study with the addition of a commercial food dye. Since the *H. pluvialis* cells need to be broken

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2023
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

to release their content, both the control and the supplemented mixtures were homogenized in an Ultra Turrax® T25 rotor-stator system at 24 000 rpm for 3 minutes in an ice bath. The filloas were cooked on a 12 cm circular hotplate at a temperature of 190 °C. Cooking was timed with 1 minute contact time on each side of the pancake. Then, the filloas were left to rest at room temperature for 1 minute. For the quantification of bioactive compounds (carotenoids and fatty acids), the filloas were lyophilized and stored in the absence of light at −20 °C. A triplicate of the feed was performed for each factor (blank, dye, HPW7 and HPW13), analysis group (microbiological and physicochemical), as well as for each study day, generating a total of 96 samples.

Extraction of bioactive compounds

Standards used for the characterization and quantification of carotenoid and fatty acid compounds in the filloas are summarized in ESI Table S2.† MS-grade ultrapure water, ethanol, methanol, methyl *tert*-butyl ether (MTBE) and dimethylformamide (DMF) were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Individual stock solutions of carotenoids were prepared in DMF according to the supplier's recommendations. Alpha-tocopherol and alpha-tocopherol acetate were used as an internal standard and a surrogate (100 mg L^{-1}), respectively. Fatty acid standards were prepared in MTBE using nonadecanoic acid as an internal standard and lignoceric acid as a surrogate (2 mg mL^{-1}). All solutions were stored in amber glass vials and protected from light at −20 °C.

For the extraction, 1 g of the lyophilized sample was added with 36 μL of the surrogate solution and 2 mL of MTBE. The mixture was disrupted using an IKA T25 rotor–stator system at 24 000 rpm for 1 minute in an ice bath, and then centrifuged at 3800*g*, separating the upper organic phase. The extraction was repeated four times until the enriched samples had lost their color. The MTBE extract was gently evaporated under a nitrogen stream and reconstituted according to the subsequent analyses.

HPLC-DAD analysis (carotenoid characterization)

For the chromatographic analysis, the procedure of Castillo *et al.* 2020 was used, with slight modifications.[15] Briefly, a Jasco AS-4100 model HPLC-DAD, incorporating a PU-4180 quaternary pump and a PDA MD-4010 diode array detector, was used. A Kinetex 5 μm C18-100 Å column (4.6 × 150 mm, 2.6 μm) maintained at a constant temperature of 30 °C was used for chromatographic separation. The mobile phase consisted of a 1% formic acid solution in water (A) and in methanol (B). Thus, with a constant flow rate of 1 mL min^{-1}, a ratio of 20% of (A) to 80% of (B) was established for 5 min, and then progressively increased to 100% (B) in 10 min, and maintained for 25 min. For quantification, calibration standards were prepared at six concentration levels in DMF (0.5, 1, 5, 10, 15, and 20 mg L^{-1}). Each level was injected at least in triplicate. A directly proportional relationship between the concentration and the chromatographic response was demonstrated, with coefficients of determination (R^2) greater than 0.992 in all cases (ESI Fig. S2†). Sample extracts were diluted in 80 μl of DMF, after addition of 10 μL of the IS dilution to give a final concentration of 100 mg L^{-1}, and filtered through 0.22 μm polytetrafluoroethylene (PTFE) filters before injection.

GC-MS analysis (fatty acid characterization)

The analysis was performed using an Agilent 780A GC with an Agilent 7693 injector and coupled to an Agilent 5975C triple-axis inert mass quadrupole detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Chromatographic separation was performed using a Zebron ZB column (30 × 0.25 mm × 0.25 μm) obtained from Phenomenex (CA, USA). Helium was used as a carrier gas at a constant column flow rate of 1 mL min^{-1}. For the quantification of fatty acids, a calibration curve (ESI Fig. S3†) was prepared with the fatty acid standards at 9 concentration levels (0.2, 0.5, 1, 2, 2, 5, 10, 20, 50 and 100 mg L^{-1}) in MTBE. The extract was diluted in 50 μl of MTBE containing 50 μL of the internal standard (nonadecanoic acid) to a final concentration of 3 mg L^{-1}. A derivatization process using trimethyl sulfonium hydroxide (TMSH) was performed according to Rubio *et al.*, 2018, with slight modifications.[25] Briefly, dilutions of standards and samples were mixed with 50 μL of TMSH and allowed to react in the absence of light for 30 min. Selected Ion Monitoring (SIM) acquisition mode was implemented monitoring 2 or 3 ions for an unequivocal identification and quantification of the fatty acids.

Stability study

To uncover the effects of the addition of the microalgae paste and artificial coloring on the preservation of the filloas, the four levels (ESI Fig. S1†) were analyzed in triplicate. Each set consisted of identical pieces of filloas with average values of 10.6 cm diameter and 157 ± 1 g mass. To ensure the suitability of the analyses, the wet microalgae paste was sterilized in an autoclave prior to the enrichment of the samples to prevent contamination of the culture media containing the microalgae. Autoclaving of the microalga paste is applied only in the stability study, and its microbiological profile is evaluated to ensure the absence of pathogenic microorganisms. After cooking and subsequent cooling to room temperature, the filloas were stored in food grade bags. Immediately afterwards, all samples were placed in trays and stored at a constant temperature of 20 °C. Four different storage times, measured in days, were used to monitor changes in the physical properties and microbial load, namely T0 (immediately after treatments), T3, T6 and T9.

Microbiological analysis

General sample preparation. The preparation of samples for microbiological analysis followed the procedure described in the International Organization for Standardization (ISO) 6887-1:2003. Filloa samples (10.0 ± 0.1 g) were mixed with 90 mL of peptone water (PW) and homogenized by vortexing. The obtained suspensions were further diluted to obtain dilutions from 10^{-1} to 10^{-5}. Each dilution was analyzed in duplicate.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2023

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Microorganism analysis

Aerobic plate count (APC). 1 mL of each prepared suspension was mixed with 20 mL of Plate Count Agar (PCA) by the pour plate method, in duplicate (LOQ = 1 log UFCper g). The plates were further incubated in a reversed position at 30 °C for 72 h and counted according to ISO 4833-2:2013.[26]

Coliforms and *E. coli*. For the counting of coliforms, 1 mL of each suspension was mixed with 20 mL of Violet Red Bile Lactose Agar (VRBLA), by the plate method, in duplicate (LOQ = 1 log UFC per g). For *E. coli* determination, the medium was supplemented with 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide (MUG). The plates were further incubated in a reversed position at 30 °C for 48 h and counted according to the ISO 4832:2006 standard.[27]

Yeasts and molds. 0.2 mL of each suspension was spread in Petri dishes containing 20 mL of Agar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol Base (DRBC), in duplicate (LOQ = 1.7 log UFC per g). The plates were further incubated in an upright position at 25 °C for: 72 h for yeast counting and 120 h for mold counting, according to the ISO 21527-2:2008 standard.[28]

Psychrotrophic bacteria. 1 mL of each suspension was mixed with 20 mL of Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS), by the plate method, in duplicate. The medium was allowed to solidify, and another 5 mL of medium was added to create anaerobiosis (LOQ = 1 log UFC per g). The plates were incubated in an upright position at 22 °C for 5 days and counted according to the International Organization for Standardization (ISO) number 4832:2006.[27]

***Staphylococcus aureus*.** 0.2 mL of each suspension was spread in Petri dishes containing 20 mL of Baird Parker Agar Base (BP), in duplicate (LOQ = 1.7 log UFC per g). The plates were further incubated at 36 °C for 24 h for the counting of colonies according to ISO 6888-1.[29]

Texture analysis

Texture profile analysis of the *H. pluvialis*-enriched filloa samples, synthetic dye, and control group was determined using a TA-XT plus texture analyzer from Stable Micro Systems (Vienna Court, Godalming, UK), equipped with a 5 kg load cell, using a 1″ spherical P/1S aluminium probe and a smooth HDP/TPB ring holder. A compression force analysis was performed on the samples, with a trigger force of 5 g and a speed of 4.0 mm s^{-1}, as a pre-test and 1 mm s^{-1} as the test speed. The samples were spread evenly in a hollow holder (8 cm diameter and 0.9 cm high) and tested in the objective mode. The probe distance was set to 40 mm, and force was applied in the concentric central zone until rupture. The toughness and extensibility values were measured with an acquisition rate of 200 points per second, obtaining a maximum variation of ±12 g and ±1.9 mm, respectively. All analyses were performed in triplicate on each day of analysis; the results were expressed as the mean ± standard deviation (SD). The data obtained were generated and analyzed using Exponent Stable Micro System software, version 6.16.18.0.

Color analysis

The color measurements were carried out using a portable colorimeter model CR400 (Konica Minolta Sensing, Chiyoda, Tokyo, Japan) with 10° and 8 mm aperture viewing angles. To account for the heterogeneous color of the filloa surface, the color was measured at 10 different points, distributing 5 ring measurements in the central zone and 5 in the outer zone. Each analysis was carried out in triplicate through the considered storage sampling times. The recorded values were generated using the standard space defined by the International Commission on Illumination (CIE) $L^*a^*b^*$ of 1976, where L^* represents the lightness from black (0) to white (100), a^* the variation in redness (green-red) and b^* between blue and yellow shades. Measurements were conducted under the standard illuminant CIE D65. All data were analyzed using the Color Image Processing plug-in of MATLAB® software. For a qualitative study, the values obtained were converted to their corresponding values on a hexadecimal scale (HEX) and their hue was then generated for visual analysis.

Physicochemical analysis

To quantify the variation in the physical integrity of the filloas, the internal thickness, diameter and external thickness were measured on different days of storage. A digital vernier was used for this purpose, taking each measurement in triplicate. To observe the deterioration qualitatively, the variation on the different study days was documented by using image acquisition. Water activity (a_w) measurements of the filloas were obtained using an Aqualab water activity analyzer (4TE Decagon, Munich, Germany). The measurements were conducted at three different points of each sample.

To determine the moisture content of the samples, 2 g were extracted from three areas of the feed at equidistant points along the radius of the meal. The samples were placed on metal determination plates inside the moisture analyzer (Adam Equipment, PMB 163). The moisture content was removed through a progressive temperature ramp-up to 110 °C, where it remained stable for an average time of 20 minutes. The test ends when the variation in the mass of the feed due to moisture, within 1 min, is less than 0.001 g. The moisture value is represented as the percentage ratio $1 - (m_o \cdot m_f^{-1})$, where m_o is the value of the initial mass and m_f is the mass of the food after its moisture removal.

Nutritional value

Ash, fat, and protein contents were evaluated according to the official Association of Official Analytical Chemists (AOAC) food analysis methods.[30] The macro-Kjeldahl method was used to estimate the crude protein content ($N \times 6.25$); crude fat was extracted using a Soxhlet apparatus using petroleum ether as a solvent; the ash content was assessed by incineration of the filloa samples at 550 ± 10 °C. The total carbohydrate content (g per 100 g_{DW}) was determined by difference as follows: 100 − (g protein + g fat + g ash). Energy (kcal per 100 g_{DW}) was calcu-

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2023
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

lated according to the Regulation (EU) no. 1169/2011[31] as follows: 4 (g protein + g carbohydrate) + 9 (g fat).

Statistical analysis

All data were expressed as mean ± standard deviation, and tests were run in triplicate. For microbial data, after confirming the homoscedasticity of the samples, an analysis of variance (ANOVA) was performed using a mixed effects model with a Dunnett's test to classify differences according to the control group. For physicochemical parameters (texture, color, pH, water activity and physical integrity), a general linear ANOVA was carried out and Dunnett's method was also applied for classification. All analyses were performed using Minitab, LLC. 20.3. All statistical operations were performed at a significance level of 5%.

Results and discussion

Nutritional composition

The nutritional composition of the filloa samples is shown in Table 1. The incorporation of synthetic dyes did not lead to any nutritional modification of the food. The fat content increased with the proportion of *H. pluvialis* paste, showing a statistically significant variation ($p < 0.05$) when compared to the control group. This can be explained by the composition of *H. pluvialis*, with up to 37% of lipids, mainly essential fatty acids.[18] The ash and protein contents did not vary between samples. The carbohydrate content decreased in the supplemented samples due to their lower content of flour. On the other hand, the caloric value (kcal per 100 g) was higher in samples containing the microalga paste. Fat intake of about 35% of total energy, with a concomitant reduction in carbohydrate intake, could reduce the risk of dietary diseases.[32] Thus, the results obtained show an important attractiveness of *H. pluvialis* as a food additive, providing a nutritional contribution, increasing the content of fatty acids mainly from the omega-3 and 6 families, as well as a decrease of the carbohydrate content without modifying the protein content and providing a higher caloric content.

Bioactive compounds

Carotenoids. The concentrations of the carotenoids determined in the filloa samples are depicted in Fig. 1. As expected, the results show that both HPW7 and HPW13 samples were significantly enriched ($p < 0.05$) (Table 2) in carotenoids from *H. pluvialis*, with a total carotenoid concentration of 330 μg g^{-1} and 798 μg g^{-1}, respectively. Obviously, the addition of dyes did not generate any modification on the carotenoid content of the samples.

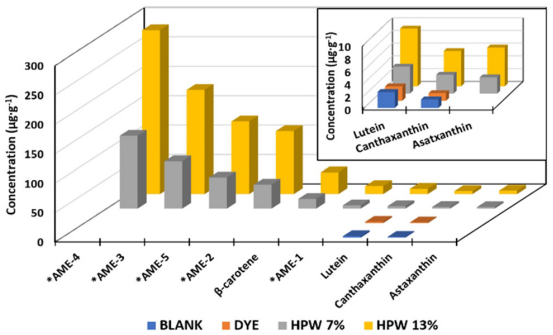


Fig. 1 Concentration of the carotenoid compounds and their esters identified in the filloa samples. Blank: the control group; dye: the synthetic colorant; HPW7 and HPW13: addition of wet *H. pluvialis* at concentrations of 7% and 13% ($g_{microalgaDW}$ g_{flour}^{-1}), respectively. *AME: astaxanthin monoesters.

The ability of *H. pluvialis* to store high amounts of astaxanthin is well known, with 5% in free form and 95% esterified as astaxanthin monoesters (AME).[18] Fig. 2 shows a typical chromatogram of the samples tested, showing 5 intense peaks identified as AME in the two enriched samples. This profile agrees with that previously characterized, identifying the peaks as astaxanthin esters of the fatty acids C18:4 (AME1), C18:3 (AME2), C18:2 (AME3), C18:1 (AME4) and C16:0 (AME5).[15] Thus, the enriched samples show the PUFA > MUFA > SFA ratio with the omega-9,6 and 3 families.

Small concentrations of lutein and canthaxanthin were present in the control sample, attributed to the content *per se* in the egg yolk. These values do not show significant differences when the artificial dye is added, in contrast to the two supplemented samples, in which the concentration of lutein and canthaxanthin increased 2 to 4 times. A significant contribution of β-carotene from the microalga paste is also evident at concentrations up to 36 μg g^{-1}.

Table 1 Energy and nutritional profile of the filloa samples

Sample	Fat (g per 100 g)	Ash (g per 100 g)	Proteins (g per 100 g)	Carbohydrates (g per 100 g)	Energy (kcal per 100g)
Blank	4.39 ± 0.3	4.63 ± 0.36	8.7 ± 0.2	82.3 ± 0.9	403 ± 7.7
Dye	4.11 ± 0.12	4.48 ± 0.36	8.1 ± 0.5	83.3 ± 0.9	402± 6.7
HPW7	5.08 ± 0.48	4.59 ± 0.29	8.7 ± 0.1	81.6 ± 0.9	407± 8.3
HPW13	6.51 ± 0.3*	4.59 ± 0.33	9.1 ± 0.3	79.5 ± 0.9*	414± 7.5*
Dunnett's test *p*-value ($n = 12$)	0.009	>0.05	>0.05	0.048	0.021

Blank: the control group; dye: the synthetic colorant; HPW7 and HPW13: addition of wet *H. pluvialis* at concentrations of 7% and 13% ($g_{microalgaDW}$ g_{flour}^{-1}), respectively. *: significant effect.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2023

Table 2 Concentration of carotenoid compounds and their esters identified in the filloa samples

	Concentration (μg g^{-1})									
Type	AME-4	AME-3	AME-5	AME-2	β-Carotene	AME-1	Lutein	Cantha.	Asta.	Total
Blank	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	2.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1	<DL	3.9 ± 0.1
Dye	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	2.3 ± 0.2	1.2 ± 0.1	<DL	3.5 ± 0.2
HPW7	123.8 ± 0.8*	80 ± 3*	52.9 ± 0.5*	40 ± 2*	17 ± 1*	5.9 ± 0.3*	4.3 ± 0.1*	3.0 ± 0.2*	2.6 ± 0.1*	330 ± 3*
HPW13	317 ± 2*	172 ± 12*	131 ± 15*	105 ± 5*	36 ± 5*	14 ± 1*	8.9 ± 0.5*	5.5 ± 0.1*	5.8 ± 0.6*	798 ± 12*
Dunnett's test *p*-value (*n* = 12)	<0.001	<0.002	0.001	<0.001	0.004	0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001

Blank: the control sample; dye: the synthetic dye; HPW7 and HPW13: addition of wet *H. pluvialis* at concentrations of 7% and 13% ($g_{microalgaDW}$ g_{flour}^{-1}), respectively. Cantha: canthaxanthin. Asta: astaxanthin. AME: astaxanthin monoesters. DL: detection limit. *: significant effect.

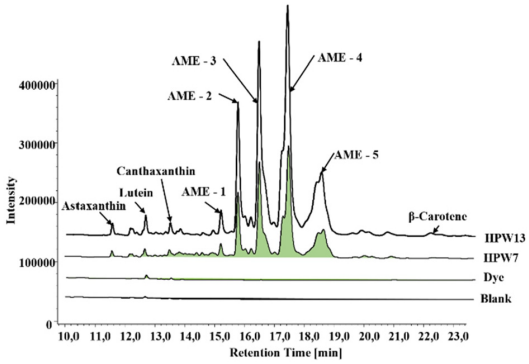


Fig. 2 Chromatographic profile obtained at 450 nm *via* UHPLC-DAD of the filloa samples. Blank: the control group; dye: the synthetic colorant; HPW7 and HPW13: addition of wet *H. pluvialis* at concentrations of 7% and 13% ($g_{microalgaDW}$ g_{flour}^{-1}), respectively. AME: astaxanthin monoesters.

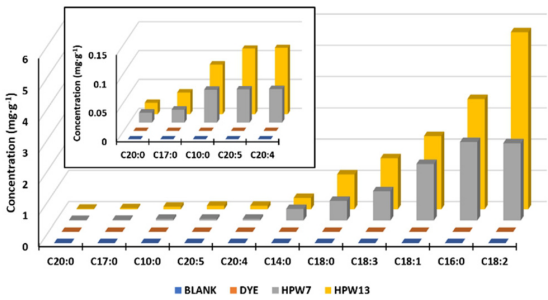


Fig. 3 Normalized concentrations of fatty acids (concentration of the sample − concentration of the blank) in the filloa samples. Blank: the control group; dye: the synthetic colorant; HPW7 and HPW13: addition of wet *H. pluvialis* at concentrations of 7% and 13% ($g_{microalgaDW}$ g_{flour}^{-1}), respectively.

The carotenoid profile obtained here, although outstanding, is complex to compare with other similar studies addressing the incorporation of bioactive compounds from *H. pluvialis* into food matrices. This is because only a single tracer, astaxanthin, is reported. In turn, this is generated by the singular focus towards the isolation of a single compound (free astaxanthin), which is usually added to food matrices in the form of powder enriched in this carotenoid derived from *H. pluvialis*. Some foods such as cookies or bread have been enriched in concentrations of 0.4 to 15% of pure astaxanthin.[20,33] However, the synergistic activity of astaxanthin is known when combined with other carotenoids such as lutein, canthaxanthin, as well as carotenoids of lower polarity such as β-carotene.[34,35] In addition, the esterified form of astaxanthin has shown greater stability and bioavailability compared to its free structure and has also shown increased solubility when bound to amphipathic fatty chains.[17,36]

Fatty acids. Twelve fatty acids were determined, and the results are shown in Fig. 3 as normalized concentrations. As discussed above, the addition of *H. pluvialis* paste increases the fat content of the samples from an initial value of 61 mg g^{-1} for the control filloa to 69 and 76 mg g^{-1} for the samples supplemented with 7 and 13%, respectively (Table 3). Specifically, the sample with the highest microalgae paste content showed an increase of more than 20% of C18:2, C16:0, C16:0, C16:0, C18:1, C18:3, C18:0, C16:0, C20:5 and C20:4 fatty acids, especially linoleic acid (C18:2). The major fatty acids are C18:3, C18:2, C18:1, C18:0 and C16:0, representing 95% of the total lipid content, which clearly correlates with the profiles observed for the AME compounds.

This lipid profile is closely related to the astaxanthin concentration in the microalga. During the culture phase of *H. pluvialis*, nutrient starvation conditions are induced which trigger both carotenogenesis (astaxanthin formation) and lipid deposition. In turn, traditional approaches to microalga production tend to focus on a single product, with very limited viability, being maintained only by high-value products such as astaxanthin.[37] In response to this, the application of wet paste that simultaneously binds high-value carotenoids as bioactive lipid chains exemplified here, from a single microalga feedstock, is shown to be the best option.

Moreover, this multi-extractive approach provides an additional synergy, as astaxanthin-rich red blood cells, as well

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2023
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 3 Fatty acid concentrations in the filloa samples. Blank: the control group; dye: the synthetic colorant; HPW7 and HPW13: addition of wet *H. pluvialis* at concentrations of 7% and 13% ($g_{microalgaDW}\ g_{flour}^{-1}$), respectively

	Concentration (mg g^{-1})												
Type	C6:0	C10:0	C16:0	C14:0	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:4	C20:5	Total
Blank	1.7 ± 0.68	0.71 ± 0.04	21.2 ± 0.17	3 ± 1.0	0.22 ± 0.01	4.9 ± 0.19	11.3 ± 0.47	15.1 ± 0.9	1.6 ± 0.1	0.11 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.43 ± 0.02	61 ± 3
Dye	1.5 ± 0.64	0.72 ± 0.01	21.21 ± 0.05	3.5 ± 0.4	0.23 ± 0.01	4.9 ± 0.10	11.6 ± 0.20	15.1 ± 0.2	1.7 ± 0.1	0.11 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.43 ± 0.01	61.0 ± 0.6
HPW7	1.3 ± 0.35	0.77 ± 0.08	22.7 ± 0.34	4 ± 1.87	0.25 ± 0.01*	5.5 ± 0.41*	13.1 ± 0.89*	17.6 ± 0.8*	2.5 ± 0.1*	0.13 ± 0.01*	0.52 ± 0.02*	0.47 ± 0.01*	69 ± 4*
HPW13	1.5 ± 0.47	0.76 ± 0.06	24.7 ± 0.21*	4 ± 1.12	0.26 ± 0.01*	6.0 ± 0.25*	13.6 ± 0.44*	20.8 ± 0.8*	3.2 ± 0.2*	0.13 ± 0.01*	0.60 ± 0.04*	0.55 ± 0.01*	76 ± 2*
Dunnett's test *p*-value (n = 12)	>0.05	>0.05	0.001	>0.05	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.005

Blank: the control sample; dye: the synthetic dye; HPW7 and HPW13: addition of wet *H. pluvialis* at concentrations of 7% and 13% ($g_{microalgaDW}\ g_{flour}^{-1}$), respectively. *: significant effect.

as fatty acids such as oleic acid, have shown higher bioactivity and appear to be more suitable for human consumption in nutraceuticals or pharmaceuticals.[38] These compounds show a symbiotic behavior, modulating lipid degradation, thanks to the antioxidant capacity of carotenoids, while maintaining greater stability and bioactivity in compounds such as astaxanthin when in esterified form.[39] This is a clear advantage of using microalga in a paste form (as a whole), as opposed to isolating a single compound by extraction.

Stability study

Color. To evaluate the isolated effect of the factors sample enrichment (type) and storage time (day) on the color of the filloas, a summary of the ANOVA using Dunnett's method is shown in Table 4. The upper part of the table shows only the effect of the time variable on the overall response of the parameters L^*, a^*, and b^*. The lower part of the table shows the overall effect of the different addition levels on these hue values. Using the comparative study of the control points (day 0 and blank), the L^*, a^* and b^* values are represented as the mean value for each factor. As expected, the addition of dyes and microalgae paste generated significant variability related to the control group in the measured parameters L^*, a^* and b^*, redness (a^*) being the one showing the highest difference. The brightness value (L^*) showed significant variability from the sixth day of storage, which resulted in general darkening of the samples. This darkening is represented in Table 5, showing the daily average corresponding hue for each sample.

The blank underwent greater darkening in contrast to the other samples, being critical from the sixth day, as shown in Fig. 4a. The dyed sample behaved similarly to the HPW13 sample. In turn, HPW7 maintained the brightness with only a difference of less than 2% concerning the dyed sample.

Although the a^* and b^* values did not demonstrate significant modifications with storage time, these parameters were represented (Fig. 4b and c) for the different levels of addition of the filloas to evaluate their tendency. Therefore, a balanced

Table 4 ANOVA study of the CIE $L^*a^*b^*$ color profile of the filloa samples at storage days 0, 3, 6 and 9

		L^*	a^*	b^*
Day	0	53.6 ± 0.4	19.2 ± 0.2	22.4 ± 0.3
	3	53.0 ± 0.3	19.3 ± 0.2	23.9 ± 0.1
	6	51.2 ± 0.3*	19.2 ± 0.1	22.2 ± 0.5
	9	48.6 ± 0.3*	19.1 ± 0.1	22.8 ± 0.3
p-Value (n = 120)	Dunnett's test	<0.001	>0.05	>0.05
Type	Blank	68.8 ± 0.3	2.4 ± 0.3	29.1 ± 0.4
	Dye	50.9 ± 0.3*	30.2 ± 0.2*	24.9 ± 0.2*
	HPW7	46.7 ± 0.3*	22.6 ± 0.3*	18.8 ± 0.4*
	HPW13	40.0 ± 0.3*	21.8 ± 0.3*	16.3 ± 0.5*
p-Value (n = 120)	Dunnett's test	>0.001	>0.001	>0.001

Blank: the control sample; dye: the synthetic dye; HPW7 and HPW13: addition of wet *H. pluvialis* at concentrations of 7% and 13% ($g_{microalgaDW}\ g_{flour}^{-1}$), respectively. *: significant effect.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2023

Table 5 CIE $L^*a^*b^*$ parameters at storage days 0, 3, 6 and 9

	Hue (brightness; redness; yellowness)			
Sample	Day 0	Day 3	Day 6	Day 9
Blank	72.5;1.3;30.3	73.2;2.1;30	67.2;2.6;29.1	62.4;4.41;27.1
Dye	52.4,30.8,24.6	51.4;29.9;23.8	51.6;31.0;27.9	48.3;29.2;23.6
HPW7	48.5,22.4,19.2	47.5;22.2;19.2	46.0;21.7;18.6	44.6;20.8;18.3
HPW13	41.0;22.3;15.2	40.0;22.4;15.6	40.1;22.7;16.6	39.0;22.4;17.8

Blank: the control sample; dye: the synthetic dye; HPW7 and HPW13: addition of wet *H. pluvialis* at concentrations of 7% and 13% ($g_{microalgaDW}$ g_{flour}^{-1}), respectively.

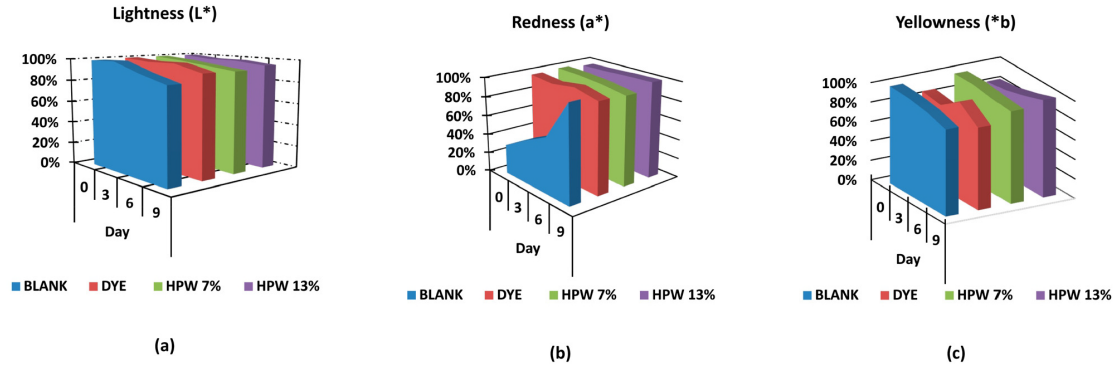


Fig. 4 Evolution of CIE. (a) Lightness L^*, (b) redness a^*, and (c) yellowness b^* parameters of the samples at storage days 0, 3, 6 and 9. Blank: the control sample; dye: the synthetic dye; HPW7 and HPW13: addition of wet *H. pluvialis* at concentrations of 7% and 13% ($g_{microalgaDW}$ g_{flour}^{-1}), respectively.

profile of the parameter a^* for all levels of addition is highlighted in contrast to the control, which acquires high reddening from the 6th day of analysis onwards. HPW7 and HPW13 samples showed a lower variability of the a^* and b values in contrast to the dye addition.

The comparative analysis with other studies that address the stability in the coloration provided by *H. pluvialis* in food is complex, due to the scarce information, being the main focus, the coloration provided by the microalgae but not the behavior of the color as a function of time in the food. An investigation evaluating the coloring capacity of dried *H. pluvialis* in food emulsions shows, analogous to this study, a significant loss in the brightness of the enriched food sample. In turn, it also exhibits significant variations of the a^* and b^* parameters in the sample.[40] This may be due to the pre-processing performed on the algae prior to its addition to the food matrix. A negative effect on the stability of the carotenoids in the drying process has been demonstrated, as well as the above-mentioned increased instability due to the removal of lipid chains in the search for pure astaxanthin. The application of the wet paste, without drying or subsequent pretreatment, may therefore result in a longer duration of color in the food. Likewise, as already mentioned, the addition of this drying step involves additional costs that make it economically incompatible at industrial scales.[41] Moreover, the industrial approach to a single compound, such as astaxanthin for the generation of color in food, loses value compared to the possibility of exploiting the microalgae in its wet paste form, which simultaneously binds other high-value carotenoids as bioactive lipid chains, as proposed here.

Texture. The analysis of maximum strength and breaking distance values by applying a load is one of the most common methods for determining the mechanical behavior of foods such as pancakes, tortillas, and cookies.[42–44] Therefore, the toughness and extensibility values generated through compressive tests applied to the filloas on the different days of the study were quantified. In the same way, the response values were obtained: diameter, internal thickness, and external thickness, which delimit the physical integrity of the filloas. These values were analyzed following the same statistical guidelines used in the colorimetric analysis and are summarized in Table 6. Analogous to Table 4, the upper part of Table 6 shows only the effect of the time variable on the overall response of the exposed rheological parameters. The lower part of the table shows the overall effect of the different addition levels on these rheological parameters.

In relation to the storage time, significant modifications are generated mainly in the extensibility (day 3), toughness (day 6) and external thickness (day 9). As the days go by, the filloas increase rigidity, decreasing their elongation capacity.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2023
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 6 Response to mechanical stress applied to the filloa samples represented as toughness (g) and extensibility (mm), and the structural parameters – diameter, internal and external thickness – at days 0, 3, 6 and 9 corresponding to the stability study

		Toughness (g)	Extensibility (mm)	Diameter (mm)	Internal thickness (mm)	External thickness (mm)
Day	0	364 ± 14	21.6 ± 0.4	107.5 ± 0.1	1.23 ± 0.03	0.24 ± 0.01
	3	352 ± 23	17.1 ± 0.6*	107.3 ± 0.6	1.15 ± 0.05	0.16 ± 0.08*
	6	278 ± 24*	13.7 ± 0.7*	105.7 ± 0.7	1.14 ± 0.05	0.21 ± 0.03
	9	132 ± 25*	10.0 ± 0.7*	108.9 ± 0.6	1.07 ± 0.05	0.15 ± 0.09*
p-Value (n = 12)	Dunnett's test	<0.003	<0.002	<0.200	<1.000	>0.001
Type	Blank	215 ± 14	13.7 ± 0.4	110 ± 3	1.12 ± 0.03	0.25 ± 0.01
	Dye	287 ± 24 *	14.8 ± 0.7	106 ± 1*	1.15 ± 0.04	0.20 ± 0.02*
	HPW7	307 ± 25*	16.1 ± 0.7*	106 ± 1*	1.17 ± 0.04	0.18 ± 0.02*
	HPW13	319 ± 24 *	16.8 ± 0.7*	106 ± 1*	1.14 ± 0.04	0.14 ± 0.02*
p-Value (n = 12)	Dunnett's test	<0.015	<0.004	>0.001	<1.000	>0.008

Blank: the control group; dye: the synthetic colorant; HPW7 and HPW13: addition of wet *H. pluvialis* at concentrations of 7% and 13% ($g_{microalgaDW}\ g_{flour}^{-1}$), respectively. *: significant effect.

Similarly, they lose strength, being more susceptible to breakage. All these parameters are significantly modulated by the addition of microalgae paste, which, unlike dye, can maintain the extensibility in percentages higher than 38% and 20% relative to the blank for the levels HPW7 and HPW13, respectively. At the same time, an inverse relationship (Fig. 5a) is shown between the addition of the microalgae paste and the external thickness of the filloas. In contrast, the control group shows

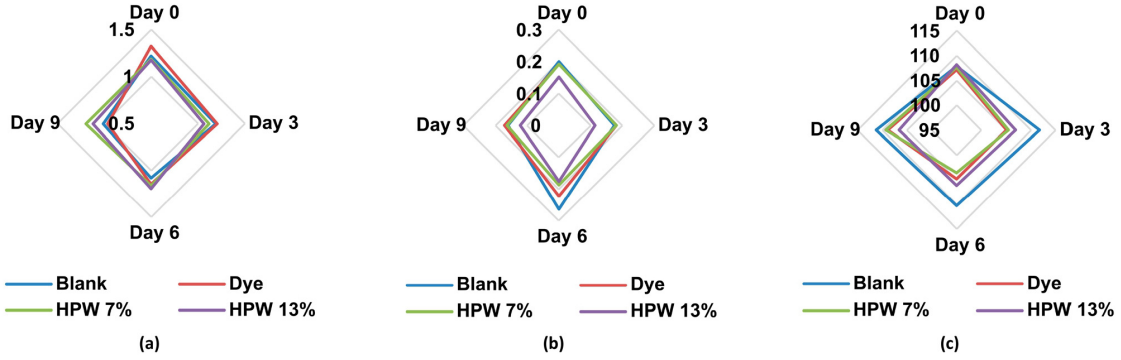


Fig. 5 Variability of the structural parameters: (a) external thickness (mm), (b) internal thickness (mm), and (c) diameter (mm) at different levels of addition in the filloas at days 0, 3, 6 and 9 corresponding to the stability study. Blank: the control group; dye: the synthetic colorant; HPW7 and HPW13: addition of wet *H. pluvialis* at concentrations of 7% and 13% ($g_{microalgaDW}\ g_{flour}^{-1}$), respectively.

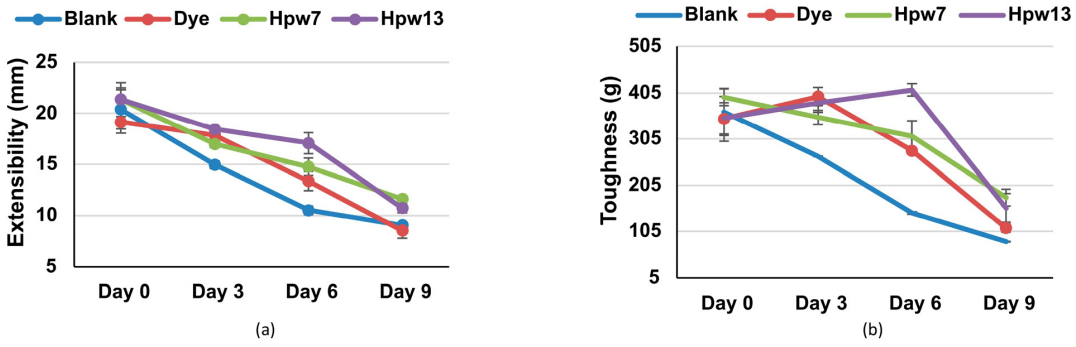


Fig. 6 Variability of the response to mechanical stress applied to the filloa samples represented as (a) toughness and (b) extensibility at different levels of addition in the filloas at days 0, 3, 6 and 9 corresponding to the stability study. Blank: the control group; dye: the synthetic colorant; HPW7 and HPW13: addition of wet *H. pluvialis* at concentrations of 7% and 13% ($g_{microalgaDW}\ g_{flour}^{-1}$), respectively.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

an overall growth of the external thickness, presenting a maximum on the sixth day of storage, decreasing in the form blank > dye > HPW7 > HPW13. This can be explained by the fact that the thickness revealed a labile structure, fragmenting over the days, and giving a different contour that increased radially. Therefore, a thinner and more durable consistency could be associated with higher structural preservation of the food. This behavior is assumed to be due to the contribution of carotenoids by the microalgae, which are known to influence the rheological properties of foods.[45] Both the internal thickness and diameter of the filloas were not significantly altered by storage time. In contrast, less variability is shown in these parameters (Fig. 5b and c) when the concentration of microalgae in the filloas is increased.

Regarding the toughness of the filloas, a significant decrease is evident after the sixth day of storage (Fig. 6), reaching a decrease of 55% for the blank throughout the 9 days of analysis. Both dye and HPW7 and HPW13 show significant effects on this property, improving as follows: HPW13 > HPW7 > dye. The stabilizing effect by the dye is assumable due to concentrations of E202 (potassium sorbate) used as a preservative in producing this type of dye. The action of E202 in modifying starch films is known to improve their elongation at break when the concentration of sorbate is increased.[46]

Microbial counts. The statistical analysis for the evaluation of the stability of the filloas (days 0, 3, 6 and 9) in relation to the growth of mesophilic aerobic microorganisms and *Bacillus cereus* is summarized in Table 7. Together, the response values for moisture, pH, and water activity, which have a significant correlation with the development of these pathogens, are shown. Molds, yeast, and *Staphylococcus* were not detected in any of the samples as well as on the different days of evaluation. Both total APC counts and *Bacillus cereus* growth increased on the different study days (Fig. 7a and b, respectively). In turn, only the lowest level of addition of *H. pluvialis* provided a significant decrease in the APC count. Interestingly, an increase in the amount of microalgae paste did not result in a greater inhibition of APC content. This can be explained by a lower flour content in the food for the maximum level of microalgae paste addition, decreasing its free water retention

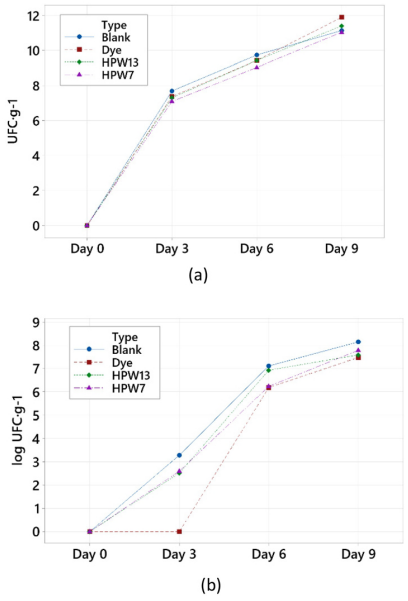


Fig. 7 Inhibitory effect on the development of (a) mesophilic aerobic microorganisms and (b) *Bacillus cereus* at different levels of addition in the filloas at days 0, 3, 6 and 9 corresponding to the stability study. Blank: the control group; dye: the synthetic colorant; HPW7 and HPW13: addition of wet *H. pluvialis* at concentrations of 7% and 13% ($g_{microalgaDW}\ g_{flour}^{-1}$), respectively.

capacity. In addition, Table 7 shows a higher water activity contained in HPW13 in relation to HPW7. Hossain *et al.*, 2017 reported a similar effect when incorporating *H. pluvialis* powder as a flour substitute in cookies, obtaining a lower water retention capacity to different flours tested.[20] Thus, an excess of free water could slightly favor pathogen growth. In relation to the growth of *Bacillus cereus*, the addition of the microalgae paste does not present significant differences overall. In contrast, when the inter-day action is evaluated (Fig. 7), a negative displacement in the growth of this microorganism can be observed for the levels HPW7 and HPW13 in

Table 7 Total aerobic plate count (APC) and log10 colony-forming units per gram of sample log10 (CFU g^{-1}) for the microorganism *Bacillus cereus*, as well as the pH, moisture, and water activity of the filloa samples at days 0, 3, 6 and 9 corresponding to the stability study

		APC	*B. cereus*	pH	Moisture (%)	Water activity
Day	0	N/D	0.0 ± 0.2	6.60 ± 0.01	50.7 ± 0.3	0.959 ± 0.004
	3	7.4 ± 0.3*	2.1 ± 0.2*	6.65 ± 0.02*	48.7 ± 0.3	0.962 ± 0.007
	6	9.4 ± 0.5*	6.6 ± 0.2*	6.65 ± 0.01*	49.8 ± 0.1	0.964 ± 0.005
	9	11.4 ± 0.2*	7.8 ± 0.3*	6.75 ± 0.02*	52.2 ± 0.2	0.906 ± 0.007*
p-Value (n = 12)	Dunnett's test	<0.001	<0.001	<0.050	>1.000	<0.015
Type	Blank	7.1 ± 0.1	4.6 ± 0.2	6.69 ± 0.02	50.3 ± 0.2	0.961 ± 0.004
	Dye	7.2 ± 0.2	3.4 ± 0.2*	6.66 ± 0.03	50.1 ± 0.5	0.953 ± 0.005
	HPW7	6.8 ± 0.1*	4.1 ± 0.2	6.71 ± 0.02	50.2 ± 0.1	0.938 ± 0.007*
	HPW13	7.0 ± 0.1	4.3 ± 0.3	6.59 ± 0.02*	50.8 ± 0.2	0.940 ± 0.007*
p-Value (n = 12)	Dunnett's test	>0.015	<0.001	<0.001	>0.900	<0.001

Blank: the control group; dye: the synthetic colorant; HPW7 and HPW13: addition of wet *H. pluvialis* at concentrations of 7% and 13% ($g_{microalgaDW}\ g_{flour}^{-1}$), respectively. *: significant effect.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2023
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

comparison with the control group. Although *H. pluvialis* has shown antibacterial potential mainly on bacteria such as *B. subtilis* and *E. coli*, extracts of this microalga have been able to generate a significant reduction of *B. cereus*.[47,48] *B. cereus* is known to be able to proliferate in a wide range of conditions, with optimal pH values of growth close to 8, being able to modulate the acidity of the culture medium.[49] In parallel, it can be maintained in media with a minimum water content of 0.93.[50] Hence, comparing Fig. 7b, Fig. 8a, and Fig. 8b, one can see the correlation between the growth of *B. cereus* with increasing pH and the maintenance of water activity at values above 0.94 in the case of the blank. In turn, a greater decrease of the total water content by HPW7 for the last day and a higher modulation of the pH by HPW13 in the first 3 days of the study (0, 3 and 6) result in a potential inhibition of this microorganism. It is important to note a total inhibition of *B. cereus* growth on day 3 of the study when the food dye is used. This inhibition is assumable due to concentrations of E202 (potassium sorbate) used as a preservative in the commercial dye. At percentages lower than 0.5%, E202 has been shown to inhibit the growth of microorganisms such as *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* in various foods.[51] At the same time, the dye contains citric acid as an acidifier, which shows a booster action in inhibiting microorganisms when combined with stabilizers such as sorbic acid in foods.[52] In contrast, no literature has been found, which shows an inhibitory power on the growth of pathogens by the individual action of artificial colors such as E122 and E102. In contrast, the analogous action of HPW7 and HPW13 for the following days (6 and 9) in relation to the dye is remarkable, without the need to be enriched with additional stabilizers and acidifiers.

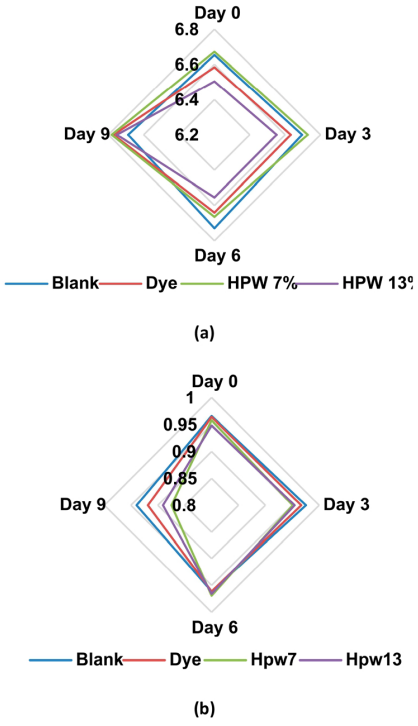


Fig. 8 Variability of the response values (a) pH and (b) water activity at different levels of addition in the filloas at days 0, 3, 6 and 9 corresponding to the stability study. Blank: the control group; dye: the synthetic colorant; HPW7 and HPW13: addition of wet *H. pluvialis* at concentrations of 7% and 13% ($g_{microalgaDW}\ g_{flour}^{-1}$), respectively.

Conclusions

The ability of the microalgae *H. pluvialis* as a multifunctional food ingredient for the improvement of the color, nutritional profile, and functional properties of foods, in contrast to a single-purpose synthetic additive, was demonstrated. The addition of *H. pluvialis* wet paste generated an attractive and homogeneous mixture, which improved the physical profile of the food (filloa). In contrast to the unique coloring effect of the dye in the food, a minimum level of addition of the microalgae wet paste (7 $g_{microalga\ DW}$ 100 g_{flour}^{-1}) provided a total free astaxanthin content of 2.6 μg g^{-1} and an esterified astaxanthin content of 303 μg g^{-1}, as well as an overall carotenoid contribution of 330 μg g^{-1}; this increase was proportional to a higher level of addition. Furthermore, the significant enrichment of omega-6 and omega-3 essential fatty acids by adding *H. pluvialis* in the filloas, especially linoleic, palmitic, and oleic acids, increased the original lipid content by 20%. In addition to the high bioactive contribution, the microalgae paste, through a global action, generated a long-lasting coloring of greater luminosity and an important modulation of the physicochemical properties, obtaining a filloa of greater extensibility and integrity than its synthetic alternative up to 6 days after storage. On the other hand, the content of stabilizers and preservatives present in the synthetic dye showed a high inhibitory effect on the growth of *B. cereus* in the food, but was not significant in the case of total aerobic mesophilic microorganisms (TAM). At the same time, the addition of the minimum level of the microalgae paste generated an inhibitory action on TAM, as well as a significant decrease in water activity in the filloas, thus hindering potential bacterial growth. In addition, the incorporation of wet microalgae biomass without drying and pretreatment steps, using its pool of bioactive compounds, offers a promising avenue for its use on the industrial scale.

Author contributions

Conceptualization, L.B., M.L. and C.G.-J.; methodology, T.C.F., S.A.H., P.R., and F.A.F.; software, A.C.; formal analysis, A.C.; investigation, A.C. and T.C.F.; resources, S.P., M.L., C.G.-J., and L.B.; writing—original draft preparation, A.C.; writing—review and editing, A.C., T.C.F., M.L., C.G.-J., and L.B.; supervision, T.C.F., F.A.F., P.R., and S.A.H.; project administration, S.A.H., P.R., T.C.F., and L.B.; funding acquisition, L.B., C.G.-J., and M.L.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2023

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This research was funded by project ED431 2020/06 (Galician Competitive Research Groups Xunta de Galicia). All these programmes are co-funded by FEDER (EU). The authors are also grateful to the Foundation for Science and Technology (FCT; Portugal) for financial support through national funds FCT/MCTES (PIDDAC) to CIMO (UIDB/00690/2020 and UIDP/00690/2020) and SusTEC (LA/P/0007/2021). Castillo A. acknowledges the support of the European Grouping of Territorial Cooperation Galicia-Norte Portugal (GNP, EGTC) under the IACOBUS Program and the MCI of Spain for his contract part of the grant DIN2021-011976 funded by the MCIN/AEI/10.13039/501100011033. L. Barros and S. Heleno acknowledge the national funding by FCT, P. I., through the institutional scientific employment program-contract for their contracts, and Filipa A. Fernandes for the PhD grant (SFRH/BD/145467/2019).

References

1 M. Paakki, I. Aaltojärvi, M. Sandell and A. Hopia, *Int. J. Gastron. Food Sci.*, 2019, **16**, 100131.
2 J. H. Han, *Innovations in Food Packaging: Second Edition*, 2014, pp. 213–255.
3 Grand View Research, *Food Additives Market Size, Share & Trends Analysis Report*, San Francisco, United States, 2022.
4 N. Martins, C. L. Roriz, P. Morales, L. Barros and I. C. F. R. Ferreira, *Trends Food Sci. Technol.*, 2016, **52**, 1–15.
5 L. J. Stevens, J. R. Burgess, M. A. Stochelski and T. Kuczek, *Clin. Pediatr.*, 2014, **53**, 133–140.
6 M. Oplatowska-Stachowiak and C. T. Elliott, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2016, **57**, 524–548.
7 E. Guerra, M. Llompart and C. Garcia-Jares, *J. Chromatogr. A*, 2017, **1529**, 29–38.
8 M. L. Wells, P. Potin, J. S. Craigie, J. A. Raven, S. S. Merchant, K. E. Helliwell, A. G. Smith, M. E. Camire and S. H. Brawley, *J. Appl. Phycol.*, 2017, **29**, 949.
9 J. Matos, C. Cardoso, N. M. Bandarra and C. Afonso, *Food Funct.*, 2017, **8**, 2672–2685.
10 B. F. Lucas, M. G. de Morais, T. D. Santos and J. A. V. Costa, *LWT–Food Sci. Technol.*, 2018, **90**, 270–276.
11 M. Fradique, A. P. Batista, M. C. Nunes, L. Gouveia, N. M. Bandarra and A. Raymundo, *J. Sci. Food Agric.*, 2010, **90**, 1656–1664.
12 A. Niccolai, M. Venturi, V. Galli, N. Pini, L. Rodolfi, N. Biondi, M. D'Ottavio, A. P. Batista, A. Raymundo, L. Granchi and M. R. Tredici, *Sci. Rep.*, 2019, **9**, 19433–19445.
13 W. Meng, T. Mu and G.-V. Marco, *Future Foods*, 2022, 183–201.
14 Y. Torres-Tiji, F. J. Fields and S. P. Mayfield, *Biotechnol. Adv.*, 2020, **41**, 107536.
15 A. Castillo, S. Pereira, A. Otero, S. Fiol, C. Garcia-Jares and M. Lores, *RSC Adv.*, 2020, **10**, 27995–28006.
16 K. Jomova and M. Valko, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **70**, 102–110.
17 A. Castillo, S. Pereira, A. Otero, C. Garcia-Jares and M. Lores, *J. Appl. Phycol.*, 2022, **36**, 1–17.
18 M. M. R. Shah, Y. Liang, J. J. Cheng and M. Daroch, *Front. Plant Sci.*, 2016, **7**, 531.
19 T. Zhou, X. Wang, Y. Ju, C. Shi and G. Kan, *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*, 2018, **394**, 022007.
20 A. K. M. M. Hossain, M. A. Brennan, S. L. Mason, X. Guo, X. A. Zeng and C. S. Brennan, *Foods*, 2017, **6**, 1–10.
21 F. Ahmed, Y. Li, K. Fanning, M. Netzel and P. M. Schenk, *Food Res. Int.*, 2015, **74**, 231–236.
22 S. Pereira and A. Otero, *Algal Res.*, 2020, **51**, 102027.
23 A. D. Bettge, *Cereal Foods World*, 2014, **59**, 26–29.
24 D. Turck, J. Castenmiller, S. de Henauw, K. I. Hirsch-Ernst, J. Kearney, A. Maciuk, I. Mangelsdorf, H. J. McArdle, A. Naska, C. Pelaez, K. Pentieva, A. Siani, F. Thies, S. Tsabouri, M. Vinceti, F. Cubadda, K. H. Engel, T. Frenzel, M. Heinonen, R. Marchelli, M. Neuhäuser-Berthold, M. Poulsen, Y. Sanz, J. R. Schlatter, H. van Loveren, R. Ackerl, W. Gelbmann, H. Steinkellner and H. K. Knutsen, *EFSA J.*, 2020, **18**, 5993–60002.
25 L. Rubio, J. P. Lamas, M. Lores and C. Garcia-Jares, *Food Anal. Methods*, 2018, **11**, 3235–3242.
26 ISO, *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enum Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique*, 2013.
27 ISO, *ISO 4832 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique.*, 2006.
28 ISO, *ISO 21527-1/2:2008 – Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds (1st ed.). Switzerland: International Standardization Organization.*, 2008.
29 ISO, *ISO 6888-1:1999- Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) – Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. International Organization for StandardizatioN*, 1999.
30 AOAC International, *Official methods of analysis of AOAC International*, AOAC International, Maryland, USA, 20th edn., 2016.
31 European Union, Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the 634 Council of 25 October 2011. *Official Journal of the European Union*, 2011.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2023
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

32 M. Dehghan, A. Mente, X. Zhang, S. Swaminathan, W. Li, V. Mohan, R. Iqbal, R. Kumar, E. Wentzel-Viljoen, A. Rosengren, L. I. Amma, A. Avezum, J. Chifamba, R. Diaz, R. Khatib, S. Lear, P. Lopez-Jaramillo, X. Liu, R. Gupta, N. Mohammadifard, N. Gao, A. Oguz, A. S. Ramli, P. Seron, Y. Sun, A. Szuba, L. Tsolekile, A. Wielgosz, R. Yusuf, A. H. Yusufali, K.K. Teo, S. Rangarajan, G. Dagenais, S. I. Bangdiwala, S. Islam, S. S. Anand and S. Yusuf, *Lancet*, 2017, **390**, 2050–2062.

33 Y. Ohi, T. Namiki, M. Katatae, H. Tsukahara and A. Kitamura, *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 2009, **56**, 579–584.

34 W. Stahl, A. Junghans, B. De Boer, E. S. Driomina, K. Briviba and H. Sies, *FEBS Lett.*, 1998, **427**, 305–308.

35 J. Liang, Y. X. Tian, F. Yang, J. P. Zhang and L. H. Skibsted, *Food Chem.*, 2009, **115**, 1437–1442.

36 Q. Zhou, J. Xu, L. Yang, C. Gu and C. Xue, *J. Sci. Food Agric.*, 2019, **99**, 3662–3671.

37 M. M. R. Shah, Y. Liang, J. J. Cheng and M. Daroch, *Front. Plant Sci.*, 2016, **7**, 531.

38 M. C. Cerón, M. C. García-Malea, J. Rivas, F. G. Acien, J. M. Fernandez, E. del Río, M. G. Guerrero and E. Molina, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, **74**, 1112–1119.

39 K. A. Keene, R. M. Ruddy and M. J. Fhaner, *ACS Omega*, 2019, **4**, 983–991.

40 L. Gouveia, A. Raymundo, A. P. Batista, I. Sousa and J. Empis, *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, **222**, 362–367.

41 L. M. Wendt, C. Kinchin, B. D. Wahlen, R. Davis, T. A. Dempster and H. Gerken, *Biotechnol. Biofuels*, 2019, **12**, 1–14.

42 H. Dizlek, A. L. Girard and J. M. Awika, *LWT–Food Sci. Technol.*, 2022, **160**, 113320.

43 B. Akshata, D. Indrani and P. Prabhasankar, *J. Food Process. Preserv.*, 2019, **43**, e14129.

44 E. Argüello García, L. Córdova Téllez, J. Martínez Herrera, O. Sánchez Sánchez, P. Pérez Herrera and J. M. Zaldívar Cruz, *J. Food Sci. Technol.*, 2020, **57**, 3502.

45 E. Domian and M. Szczepaniak, *J. Food Eng.*, 2020, **274**, 109827.

46 H. Barzegar, M. H. Azizi, M. Barzegar and Z. Hamidi-Esfahani, *Carbohydr. Polym.*, 2014, **110**, 26–31.

47 A. R. Rao, A. H. Reddy and S. M. Aradhya, *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.*, 2010, **4**, 807–817.

48 A. H. Rather, S. Singh and S. Choudhary, *J. Drug Delivery Ther.*, 2021, **11**, 28–30.

49 V. Hlordzi, F. K. A. Kuebutornye, G. Afriyie, E. D. Abarike, Y. Lu, S. Chi and M. A. Anokyewaa, *Aquac. Rep.*, 2020, **18**, 100503.

50 D. Rodrigo, C. M. Rosell and A. Martinez, *Foods*, 2021, **10**, 302.

51 M. Raevuori, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1976, **2**, 205–213.

52 M. del Torre, M. della Corte and M. L. Stecchini, *Int. J. Food Microbiol.*, 2001, **63**, 199–207.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2023

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

IV-II. SECCIÓN DE TRABAJOS NO PUBLICADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3.2. EXTRACTOS AGROINDUSTRIALES

3.2.1. Tracking *in vivo* bioconversion of polyphenols through the digestive system of swine fed a grape marc extract-enriched diet (Trabajo no publicado)

Aly Castillo, Maria Celeiro, Beatriz Martínez-Vallespín, Laura Rubio, Diego González-Iglesias, Rocío Facorro, Carmen Garcia-Jares, Jürgen Zentek, Marta Lores

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tracking *in vivo* Bioconversion of Polyphenols Through the Digestive System of Swine Fed a Grape Marc Extract-Enriched Diet

Aly Castillo[1,2,3], Maria Celeiro[3], Beatriz Martínez-Vallespín[4], Laura Rubio[1], Diego González-Iglesias[1,2], Rocío Facorro[1], Carmen Garcia-Jares[3], Jürgen Zentek[4], Marta Lores[2]

[1]i-Grape Laboratory S.L., Via Isaac Peral 32, 15890, Santiago de Compostela, España
[2]LIDSA, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain
[3]CRETUS, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain
[4]Institute of Animal Nutrition, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

ABSTRACT

A substantial amount of agricultural resources is allocated to meeting livestock feed demand. Utilizing functional components in feed presents an increasingly viable approach. Actual expectations demand that such sub substances used in animal feed are of high quality and prioritize animal welfare. The quantification of these functional effects is hampered by the lack of an overall analytical methodology. In this context, this work evaluates the effect of the addition of the polyphenol-rich bioactive extract "e-Vitis" derived from grape marc, the main by-product of the wine industry, in feed for swine. The transit of bioactive compounds through the digestive tract of pigs fed with the enriched feed compared to a standard diet was analysed. To this end, the matrix solid-phase dispersion (MSPD) technique was used to extract bioactive compounds from samples of gastric content, duodenum, jejunum, ileum, caecum, colon, faeces and urine from these animals. By using high-resolution mass spectrometry QTOF (Quadrupole Time-of-Flight) and metabolomics tools, 245 biomarkers were identified, clearly differentiating the two groups of swine (with and without enriched feed). The results show significant effects of the e-Vitis feed through the presence of oxidative stress reduction markers, modulators of energy metabolism and prebiotic compounds stimulating microbiota bioconversion processes. Consequently, this study provides a comprehensive methodology applicable to diverse biological matrices, allowing a deeper understanding of polyphenol metabolism mechanisms and their value as bioindicators for the determination of effective doses in the addition of by-products in animal diets.

INTRODUCTION

Current crop and livestock production is facing increasing competition to support the demand for food and feed. To supply the nutritional needs of more than 26 billion animals[1] or human consumption, 6 billion tonnes of feed are required, containing 32% of global cereal production and occupying 3.2 billion hectares of agricultural land, representing two-thirds of the world's total agricultural area[2]. Better integration of livestock into the circular bioeconomy can be achieved by increasing the proportion of by-products, that humans are unable to eat, in the livestock feed ration. In contrast, correct but strict policies require better feed standards that turn the addition of by-products complex. Regulations place their focus on quality feed, avoiding the addition of synthetic additives for growth enhancement, to improve animal development and health[3].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A variety of agricultural by-products such as corn gluten from starch extraction, beet pulp derived from sugar production and defatted soya meal obtained as a result of oil processing are the main pillars of livestock feed[4]. This simple mix of ingredients is mainly focused on yhe increased growth and fattening of the animal, being necessary the addition of functional supplements to enhance the nutritional profile[5]. Thus, one of the ideas is to enrich feed with agro-industrial by-products naturally rich in polyphenols[6]. These compounds, which exhibit high antioxidant activity, add value to the feed, not only by reducing direct costs by taking advantage of a by-product, but also improving indirect benefits by promoting farm animal welfare.

In the agricultural sector, grape marc is an important by-product whose valorisation has raised the interest of farmers and stockbreeders, mainly in the search for its reintroduction into the production chain. Grape marc is composed of the remaining material from the winemaking process, (skins, pips and stems) and meets two important requirements for use as an ingredient in animal feed. Firstly, this by-product is characterised by a high bioactive profile led by flavonoids and phenolic acids. These families of compounds have antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties that have the potential to improve animal welfare. Secondly, this by-product represents a source of dietary fibre that may enhance digestibility and intestinal health of animals. The marc represents 20-25 % of the total grape used for wine, i.e. more than 10 million tonnes per year worldwide, and is a cause of concern for winemakers due to its complex management. Careless storage can lead to a significant phytotoxic effect, such as fermentation processes, not only wasting its intrinsic potential but also negatively modifying the environment where it is disposed of. In response to this scenario, several studies carried out in the last two decades have proposed ways to make the most of it, such as the use of marc extracts in farm animal feed[7–9]. One of the main drawbacks met in these studies is to be able to determine optimal feeding doses to different animals, ensuring their safety while guaranteeing their functional properties, due to the heterogeneous polyphenolic profile in different types of marc, as well as in other agri-food waste[10].

Several approaches aim to homogenise a methodology to quantify the effect of polyphenolic compounds in farm animals. Techniques such as ultrasound-assisted extraction, liquid-liquid extraction and supercritical fluids have been used to extract these compounds from biological matrices. But animal specimens are very complex due to the heterogeneous nature of both solid samples, such as liver, colon or faeces, and liquid samples, mainly urine and plasma. Most techniques require large amounts of solvents and/or reconcentration and purification steps, which negatively impacts the recovery of these analytes. A simple process, applied to a wide range of solid, semi-solid and liquid samples, that combines the extraction and filtration stages in a single step is matrix solid-phase dispersion (MSPD). This technique, proposed by Barker *et al.,* (1988)[11], has been applied in numerous studies focused on the extraction of bioactive compounds, including phenolic chains, from various plants and organic matrices. However, there is no data on the previous application of this technique to the recovery of polyphenolic compounds in biological samples of animal origin, such as those considered in this work.

Another promising development in understanding the impact of polyphenolic compounds on animal digestion is the ability to detect these compounds using advanced chromatographic and spectrometric technologies. Since the development of time-of-flight mass spectrometry two decades ago, it has been possible to detect and understand through metabolomic analysis the

USC DE COMPOSTELA

polyphenolic distribution in different plant and fruit extracts. Using algorithms based on its high detection capacity and mass accuracy, phenolic compounds have been identified in matrices where their potential to contain them was unknown[12]. Hence, the interest in the application of this high-resolution technology to monitor the pathway through the digestive system of polyphenol intake in farm animals, their metabolism and potential effects.

This study aims to evaluate the impact of the addition of the white grape marc bioactive extract "e-Vitis" in swine feed. For this purpose, the MSPD technique is applied for the first time to biological samples from the digestive system of pigs, providing a fast and simple sample treatment methodology with high selectivity towards the main bioactive compounds. In addition, a comprehensive analysis involving high-resolution chromatographic techniques coupled to quadrupole-time-of-flight (QTOF) mass analysers was applied to provide a global view of the specific presence of the marker compounds and/or their metabolites in each sector of the digestive system.

MATERIALS AND METHODS

e-Vitis Extract

The extract used in this study (e-Vitis) was obtained from white grape marc of Albariño grape variety by i-Grape Laboratory S.L. These grapes, characteristic of Rías Baixas appellation of origin, were grown and collected in the 2021 harvest, in O Salnés subzone, and processed at Mar de Frades winery. A patented process known as Medium Scale Ambient Temperature (MSAT)[13] was used for the extraction, obtaining a highly concentrated liquid, which exhibits the general polyphenolic profile detailed in **Table 1**.

Table 1 Standard polyphenolic profile of e-Vitis* extract

Polyphenol	**mg/L**
Gallic acid	15-19
2,4,6-trihydroxybenzoic acid	2-3
Caftaric acid	0,5-1
Quercetin	0,1-0-7
Quercetin-3-glucoside	40-44
Quercetin-3-glucuronide	30-31
Quercetin-3-rutinoside	3-4
Kaempferol	0,2-0,7
Catechin	112-123
Epicatechin	120-139
Epicatechingallate	30-43
Epigallocatechin gallate	0,2-0,4
∑ **Procyanidines** (B1+B2+C1)	217-259

*Data supplied by i-Grape Laboratory S.L.

Nutritional profile of the standard feed

To feed the swine, a base mix of ingredients (**Table 2**) rich in protein, carbohydrates, and lipids, such as HP (High Protein Content) soybean meal and oil, corn, wheat, beet pulp and skimmed milk powder, is used. Other ingredients incorporated in the feed are the essential

USC DE COMPOSTELA

amino acids threonine, methionine, lysine, and tryptophan; lignocellulose as a source of fibre with a prebiotic effect; and calcium monophosphate and calcium carbonate salts as direct sources of calcium and phosphorus. The feed included an indigestible tracer (TiO2) used for determining the apparent nutrient digestibility which was one of the parameters of interest of the trial (not included in the current study).

Table 2 Nutritional composition of the basic feed for pigs

Ingredients	%
Maize	29,99
Wheat	29,29
Soy flour HP	11,40
Skimmed milk powder	10,00
Beet pulp	8,00
Soybean oil	4.50
Calcium monophosphate	0,83
Lysine	0,78
Calcium carbonate	1,07
Methionine	0,47
Threonine	0,54
Tryptophan	0,23
FU-Mineral	1,71
Lignocellulose	1,00
TiO_2	0,20
Total	100

Animal samples

The experimental protocol was approved by the State Office of Health and Social Affairs Berlin (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, Germany,Reg. No. StN 014/22). The animal trial was performed at the Institute of Animal Nutrition, Freie Universität Berlin, Germany. All samples were obtained from a standardised trial with animals reared under identical and standard breeding conditions. Piglets selected for analysis were randomly distributed in pens at weaning day (42 ± 2 days of age), with two piglets per pen. Piglets received the basal diet for 11 days and, after that, animals in one box received the polyphenolic extract enriched feed for three days. The control group receiving the non-enriched feed was kept in a separate pen under identical conditions. Daily monitoring of health status was carried out, paying special attention to the detection of digestive disorders. Two weeks after weaning, piglets were sedated followed by euthanasia by intracardiac injection and samples of gastric content, jejunum, ileum, caecum, colon, faeces and urine were collected.

MSPD extraction of biological samples

The main feed ingredients (beet and soya), whole feed and biological specimens were removed from storage at -20°C, tempered and weighed in 1 g portions. The disruptive process

was carried out in a mortar, where the sample was combined with 8 g of SiO_2 (particle size 0,707 mm) and crushed for 5 minutes to a homogeneous paste. The extraction was carried out using a 15 mL TELOS® column containing a 10 µm x Ø16 mm PTFE filter, previously conditioned with a 1 g SiO_2 layer. The sample was transferred to the column and gently compacted, adding a top layer of 1 g of SiO_2 to act as an eluent distributor. Finally, the extract was eluted with 5 mL of a 50:50 methanol:water solvent mixture, maintaining a controlled flow rate of 1 mL/min by a regulating valve.

Metabolites detection

Samples were analysed by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to a compact quadrupole time-of-flight (QTOF) mass spectrometer (Bruker Daltonics). An Intensity Solo column (2.0 µm, 100 mm × 2.1 mm) maintained at a constant temperature of 40°C was used. The mobile phase consisted of a solution of 4 mM formic acid in water (A) and methanol (B). Each acquisition was complemented by an injection of a standard calibrant for mass deviation correction containing NaOH at a concentration of $1 \cdot 10^{-3}$M in a 1:1 H_2O:2-Propanol ratio and 0,2 % formic acid. The total acquisition time was 20 minutes with a flow rate of 0,20 mL-min-1. The elution gradient started with a 95 % (A)/5 % (B) ratio for 0,4 min (calibrant injection interval), followed by a gradual increase of phase B in the following phase and time intervals (%:min): 30:4,5; 37:8,0; 50:9,0; 90:11,0; 90:14,0; reaching the initial conditions again at 16 min and hold for 4 min.

Using an electrospray ionisation (ESI) source and an AutoMS/MS mode acquisition with negative polarity, mainly pseudomolecular [M-H]- ions were detected, according to the method described by Castillo et al16. Briefly, an acquisition rate of 8 Hz spectra in 1s cycles through a voltage ramp of 10-105 eV and a filtered mass range of 20-1000 m/z was used. Compass HyStar and DataAnalysis version 5.1 (Build 201.2.4019) software were employed for data acquisition and preprocessing respectively. Undirected annotations were performed using the software MetaboSacpe 4.0.4 (Build 19). Using the SmartFormula tool, algorithms based on intensity, isotopic profile and mass error were applied for the identification of the multiple compounds acquired. For the generation of molecular formulae, the mass deviation error was set to 5mDa, and mSigma value <50 in all cases. To confirm the identifications generated, they were checked against online databases of chemical compounds: National Center for Biotechnology Information (NCBI)[14] and Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI)[15]. Analysis of the fragmentation products of the compounds was also carried out by in silico predictions using the Compound Crawler and MetFrag tools. Mass spectra were automatically compared with spectral libraries: MassBank of North America (MoNA)[16], Mass Bank European Data Base[17].

Statistical Analysis

Through MetaboScape® Version 4.0.4 (Build 19) using the T-REX 3D algorithm, the raw data of more than 200 chromatograms were filtered, categorising the different study groups. The MetaboScape® built-in statistical package was used to screen the results by means of an unsupervised PCA model, using Pareto as the scaling algorithm with a 10 % cross validation mode and a minimum variance explanation of 98 %.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

For further analysis, all previously generated data were exported to the online software MetaboAnalyst 6.0 [18]. Permutation tests with 2000 replicates were performed to validate the accuracy of the multivariate statistical models and to rule out possible randomness ($p<0,05$) in the generated separation. The set of potential biomarkers selected in the study group (swine fed by e-Vitis-enriched feed) fulfilled all criteria in both test and validation datasets. The global analysis of the different digestive stages, excreta samples, and enriched feed was carried out using Heatmapper[19] online software, distributing the biomarkers in a heat map and in dendrograms, taking Complete Linkage as the grouping method, and Manhattan distance as the method of measurement.

RESULTS AND DISCUSSION

A comprehensive non-targeted study was conducted to highlight the potential effect of the addition of e-Vitis extract in the feed of swine and its transit through the digestive tract. This approach aimed to identify the metabolic effects generated by the ingestion of the enriched feed compared to swine fed a standard diet. The study was organised in several stages: first, multivariate analysis process to group and classify the different types of samples. Secondly, feed biomarkers in the upper digestive tract were discussed and analysed. Finally, in the lower digestive tract and excreta samples, polyphenolic biomarkers and their metabolites were followed up. The combined study of the results allows to propose and discuss several metabolic pathways of interest and their connection with the potential benefits for piglets fed with white grape marc extract.

Biomarkers selection: Principal Component Analysis (PCA)

Through the MSPD-UHPLC-QTOF linkage, the chromatographic profile of each sample was generated, obtaining more than 4000 analytes distributed in the different study groups. The segmentation of these categories was performed by principal component analysis (PCA) summarised below by the scores (**Figure 1**) and loadings (**Figure 2**) plots. In this distribution, the main ingredients that constitute the feed, such as soybean and beetroot, as well as the base feed (Std Feed) and the enriched feed (e-Vitis Feed), are represented. Similarly, different sections of the digestive tract of the swine (gastric contents, duodenum, jejunum, ileum, caecum and colon), as well as excreta (faeces and urine) were evaluated, divided between piglets that received the base feed (Control pigs) and those that were fed the enriched feed (e-Vitis pigs). In each analysis, the response of the extraction solvent (methanol:water 50:50) was included as an instrumental blank.

Figure 1 presents a clear partitioning of the data, where each point reflects a sample chromatographic profile, and each colour corresponds to the same group of samples. This PCA process allows effective grouping of both experimental and instrumental replicates into small blocks. Fragmentation proved to be effective in most groups, with only a larger deviation observed between experimental replicates of jejunum and ileum samples.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

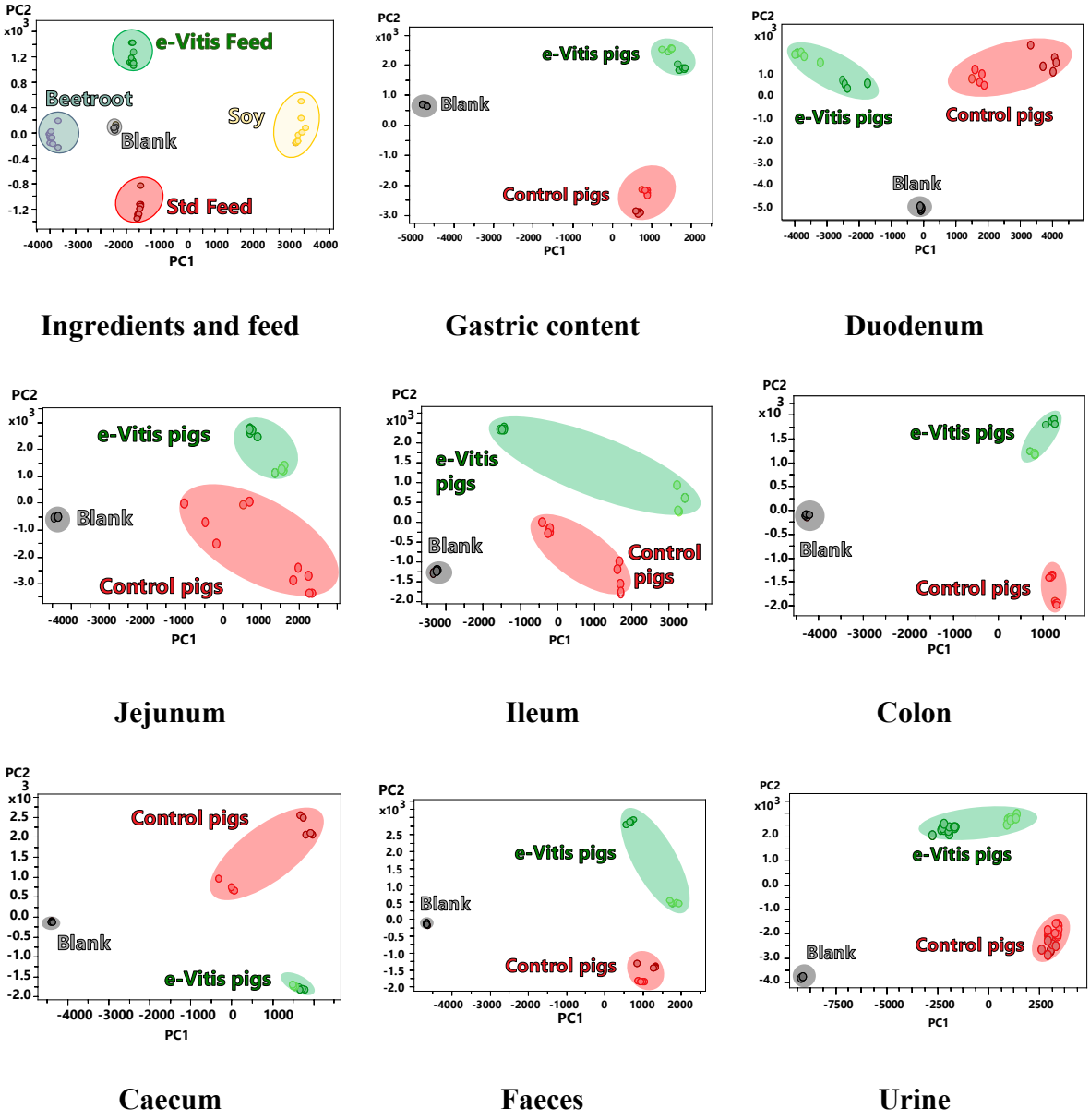


Figure 1 Principal Component Analysis (PCA) score plot of the feed, parts of the digestive transit, and excreta of pigs. Std Feed: base feed; e-Vitis feed: feed enriched with e-Vitis; Blank: instrumental blank; e-Vitis pigs: pigs fed with enriched feed. Control Pigs: pigs fed with base feed.

In a second phase of analysis the markers of each group were segmented through loading plots (**Figure 2**). The distribution of these analytes in the area delimited by the principal components PC1 and PC2 correlates with the distribution of each sample in the PC1/PC2 analogue space of the score plot. For a better understanding of this interrelation, each area is highlighted with the colour of the corresponding characteristic group. The selection criteria to determine the marker analytes of each group was those with PC1 and PC2 values with $p<0.05$ obtained from the t-test and ANOVA analyses.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

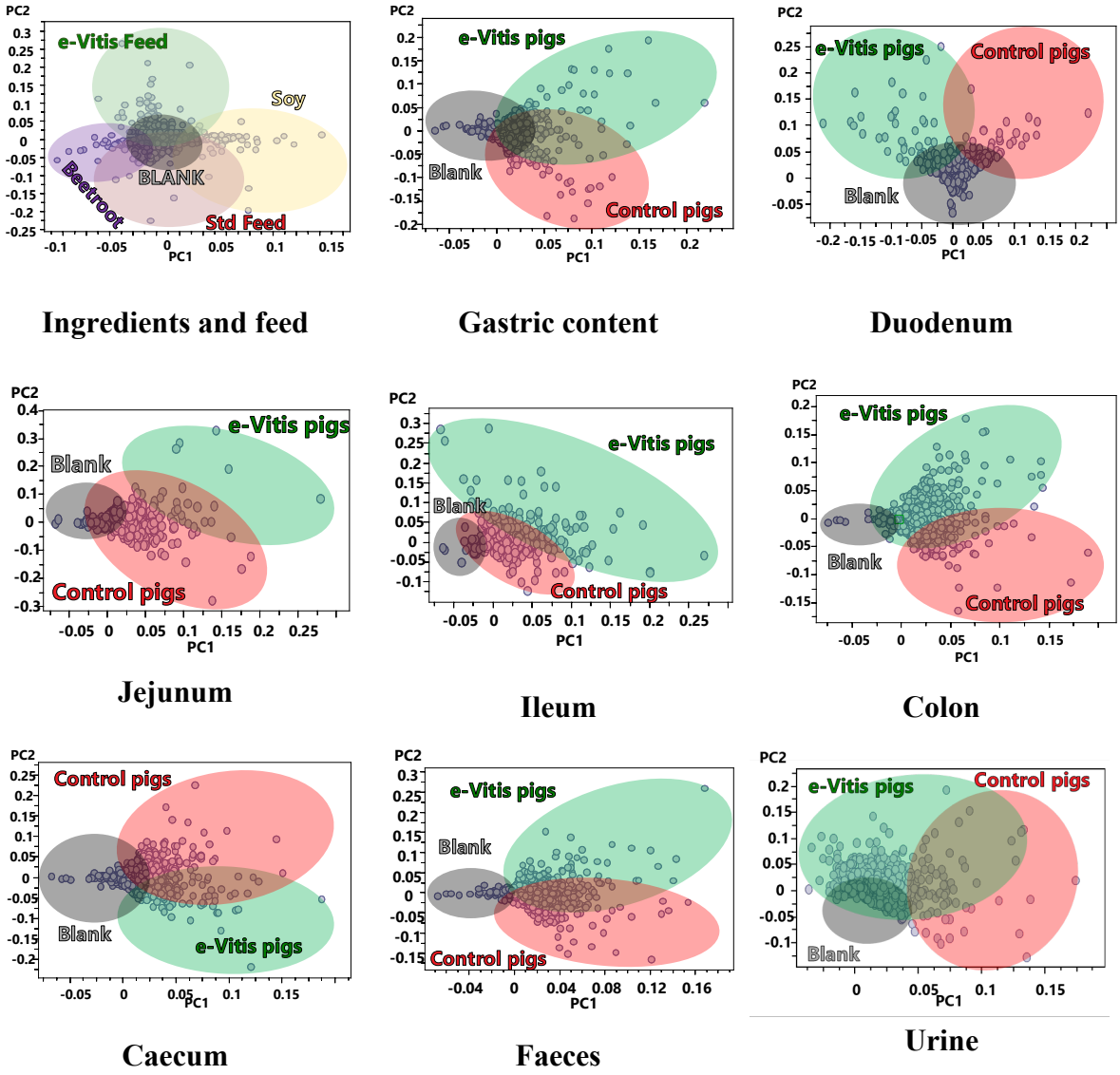


Figure 2 Principal Component Analysis (PCA) loadings plot of the feed, parts of the digestive transit, and excreta of pigs. Control Feed: standard feed e-Vitis feed: feed enriched with e-Vitis; Blank: instrumental blank; e-Vitis pigs: pigs fed with enriched feed. Control Pigs: pigs fed with standard feed.

Table 3 summarises the biomarker compounds identified in e-Vitis-enriched feed.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 3 Marker compounds identified in e-Vitis-enriched feed and their traceability in the digestive tract.

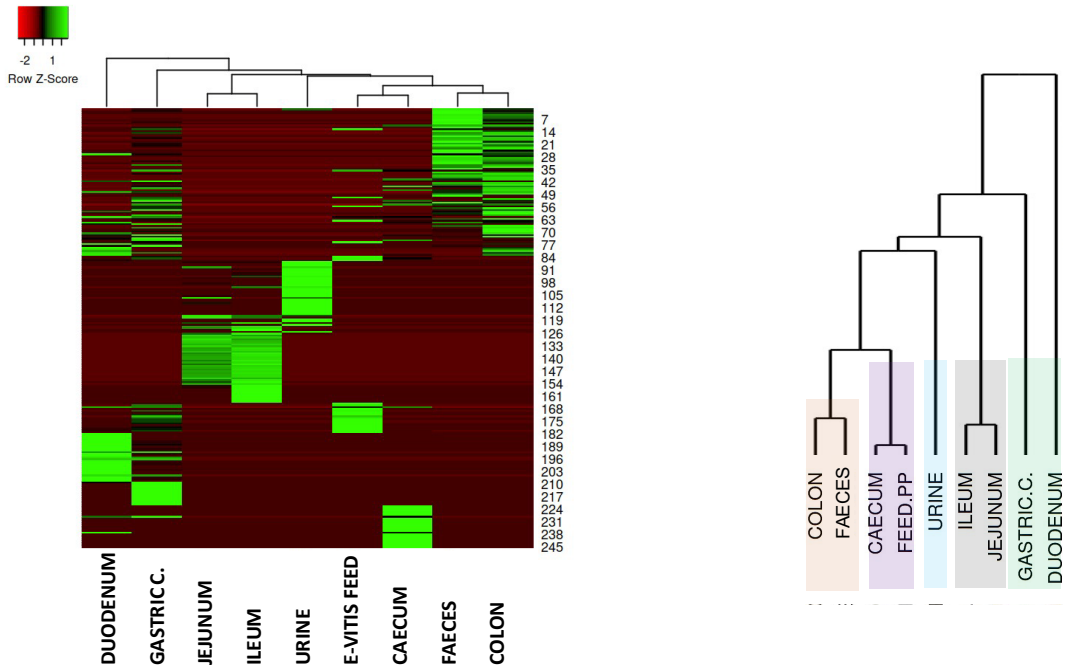
Nº	Name	Family	RT [min]	Formula	Mass (Da)	m/z	mSigma	m/z [mDa]	Fragments	e-Vitis	GC	D	J	I	CO	CE	F	U
1	**Glucose + fructose**	Carbohydrates	1,46	$C_6H_{12}O_6$	180,06	179,05	16,2	1,53	89 (100) 73 (72) 59 (71) 44 (65) 75 (63) 59 (57) 78 (46) 96 (35) 85 (25) 71 (25)	X	X	-	-	-	-	-	-	-
2	**Mannitol + sorbitol**		1,36	$C_6H_{13}ClO_6$	218,05	217,04	8,90	1,43	34 (100) 36 (76) 78 (46) 96 (45) 181 (38) 59 (17) 89 (14) 71 (9) 101 (5) 170 (5)	X	-	-	-	X	-	-	-	-
3	**2-furoic acid**	Carboxylic Acids	2,79	$C_5H_4O_3$	112,01	111,01	4,73	1,53	78 (100) 67 (53) 41 (43) 73 (41) 44 (36) 71 (21) 39 (18) 111 (17) 41 (17) 116 (12)	X	X	-	-	-	-	-	-	-
4	**Gluconic acid isomer**		1,37	$C_6H_{12}O_7$	196,06	195,05	7,16	1,33	75 (100) 78 (26) 59 (25) 195 (24) 96 (19) 99 (11) 129 (11) 87 (9) 85 (7) 57 (6)	X	X	-	-	-	-	-	-	-
5	**Gluconic acid isomer**		1,95	$C_6H_{12}O_7$	196,06	195,05	9,49	1,18	87 (100) 111 (77) 75 (58) 85 (53) 46 (31) 59 (30) 57 (29) 195 (18) 129 (16) 112 (15)	X	X	-	-	-	X		X	-
6	**Gluconic acid derivate**		1,37	$C_{18}H_{34}O_{18}$	538,17	537,17	33,35	0,20	195 (100) 75 (11) 196 (6) 129 (5) 96 (3) 99 (2) 59 (2) 179 (2) 159 (1) 180 (1)	X	X	-	-	-	-	-	-	-
7	**2-isopropylmalic acid**		6,08	$C_7H_{12}O_5$	176,07	175,06	8,16	1,15	115 (100) 157 (52) 113 (49) 85 (38) 59 (29) 175 (29) 59 (23) 103 (14) 72 (14) 44 (13)	X	-	-	-	-	-	-	-	-
8	**Malic acid isomer**		1,85	$C_4H_6O_5$	134,02	133,01	6,40	1,88	71 (100) 41 (80) 72 (63) 44 (50) 44 (50) 71 (42) 114 (41) 133 (41) 73 (40) 36 (39)	X	X	-	-	-	-	-	-	-
9	**Malic acid isomer**		1,43	$C_4H_6O_5$	134,02	133,01	6,41	2,04	78 (100) 42 (80) 71 (80) 74 (70) 67 (45) 62 (26) 72 (25) 43 (18) 68 (15) 41 (14)	X	X	-	-	-	-	-	-	X
10	**Citric acid**		2,81	$C_6H_8O_7$	192,03	191,02	13,72	1,40	87 (100) 111 (82) 85 (65) 57 (17) 129 (5) 191 (3) 112 (3) 59 (3) 75 (3) 88 (2)	X	X	X	-	-	-	-	-	X
11	**Gallic acid glucoside**	Flavonoids	4,31	$C_{13}H_{16}O_{10}$	332,08	331,07	14,85	2,03	169 (100) 125 (55) 334 (52) 44 (43) 283 (29) 331 (24) 71 (16) 78 (14) 282 (14) 89 (14)	X	-	-	-	-	-	-	-	-
12	**Quercetin glucuronide**		10,44	$C_{21}H_{18}O_{13}$	478,08	477,07	4,07	4,30	269 (100) 301 (70) 477 (50) 270 (25) 151 (20) 431 (18) 268 (16) 306 (13) 59 (13) 478 (11)	X	X	X	-	-	-	-	-	-
13	**Catechin**		5,6	$C_{15}H_{14}O_6$	290,08	289,07	2,40	0,48	89 (100) 289 (66) 132 (53) 245 (29) 109 (23) 135 (19) 59 (15) 125 (13) 203 (13) 286 (11)	X	X	X	-	-	-	-	-	-
14	**Catechin glucoside acetate**		5,6	$C_{24}H_{26}O_{11}$	494,17	493,16	21,43	9,07	289 (100) 290 (11) 203 (7) 245 (7) 125 (6) 109 (6) 205 (6) 221 (6) 123 (5) 137 (5)	X	X	-	-	-	-	-	-	-
15	**Dihydroquercetin rhamnoside**		9,79	$C_{21}H_{22}O_{11}$	450,12	449,11	28,56	1,05	449 (100) 285 (43) 151 (43) 253 (32) 303 (31) 447 (29) 59 (26) 150 (23) 152 (21) 57 (20)	X	X	X	-	-	-	-	-	-
16	**Epicatechin**		6,72	$C_{15}H_{14}O_6$	290,08	289,07	1,32	1,15	293 (100) 289 (57) 128 (54) 59 (43) 164 (39) 275 (34) 245 (34) 131 (24) 203 (22) 89 (19)	X	X	X	-	-	-	-	-	-
17	**Kaempferol glucoside**		11,17	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448,01	447,09	10,56	0,84	447 (999) 227 (555) 255 (529) 448 (244) 285 (174) 446 (147) 284 (133) 256 (89) 447 (87) 228 (68)	X	X	X						
18	**Quercetin galactoside**		10,47	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464,10	463,09	7,02	1,50	463 (100) 271 (54) 300 (41) 253 (30) 255 (24) 301 (21) 254 (21) 464 (17) 306 (13) 243 (12)	X	X	X	-	-	-	-	-	-
19	**Quercetin glucoside**		9,17	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464,10	463,09	21,04	2,92	253 (999) 252 (390) 415 (344) 44 (273) 85 (164) 254 (159) 248 (109) 129 (100) 57 (85) 57 (85)	X	X	X	-	-	-	-	-	-
20	**N-HODE dimer**	Fatty Acids	13,48	$(C_{18}H_{32}O_3)_2$	592,47	591,46	10,62	1,07	295 (100) 293 (27) 296 (21) 277 (20) 195 (11) 294 (4) 278 (3) 171 (2) 297 (1) 113 (1)	X	-	-	-	-	-	-	-	-
21	**N-HODE**		13,48	$C_{18}H_{32}O_3$	296,23	295,23	16,02	0,10	329 (100) 327 (16) 330 (15) 295 (10) 283 (8) 325 (7) 183 (7) 44 (7) 229 (6) 211 (5)	X	-	-	-	-	-	-	-	-
22	**N-HOTrE**		13,28	$C_{18}H_{30}O_3$	294,22	293,21	14,55	0,65	293 (100) 291 (96) 275 (85) 295 (43) 292 (18) 96 (18) 276 (15) 294 (15) 297 (14) 121 (14)	X	-	-	-	-	-	-	-	-
23	**N-TriHOME**		12,57	$C_{18}H_{34}O_5$	330,24	329,23	11,87	0,06	329 (100) 331 (33) 327 (29) 330 (17) 328 (7) 171 (5) 332 (4) 34 (4) 36 (3) 209 (3)	X	-	-	-	-	-	-	-	-
24	**Procyanidin b1**	Procyanidins	5,42	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578,14	577,14	12,87	2,11	577 (100) 125 (80) 425 (77) 289 (62) 407 (42) 578 (30) 161 (25) 109 (24) 451 (23) 57 (21)	X	X	X	-	-	-	-	-	-
25	**Procyanidin b2**		4,9	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578,14	577,14	33,12	1,41	250 (100) 594 (94) 272 (31) 132 (30) 125 (30) 143 (28) 595 (23) 128 (22) 183 (20) 305 (18)	X	X	X	-	-	-	-	-	-

e-Vitis: feed enriched with e-Vitis extract; GC - Gastric content; D - duodenum; J – Jejunum; I – Ileum; CO – Colon; CE – Caecum; F – Faeces; U – Urine.

Classification of samples

To determine the effect of the enriched extract in contrast to the nutritional profile provided by the base feed, 245 compounds only contained in the PCA spaces characteristic of e-Vitis groups (with $p<0,05$) and in the different stages of the digestive tract and excreta of the pigs under study were selected. Twenty-five of them correspond to the feed biomarkers shown in table 3; the additional 220 markers appear in the samples of animal origin. As a graphical tool to visualise the pathway of these selected analytes, including the starting compounds of the e-Vitis extract and their metabolites and/or derived products, a heat map with dendrograms (**Figure 3.A**) is generated. This graphical tool facilitates the identification of clear clusters, as seen in **Figure 3.B**, highlighting obvious connections between adjacent stages, such as gastric contents and duodenum, jejunum and ileum, as well as colon and faeces. Urine exhibits a characteristic profile, with no direct connection to other segments, while caecum shows a higher correlation with the e-Vitis feed.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



(A) (B)

Figure 3 Comprehensive analysis of the transit of bioactive compounds and their metabolites generated by feed enriched with e-Vitis extract through the multiple regions of the digestive tract and excreta of pigs. Representation by: A) heat map and B) dendrogram classification.

This analysis also enables the localisation of each of the 25 feed markers in the different digestive sectors and excreta samples, as also outlined in table 3, making monitoring much easier. To obtain a comprehensive analysis of the metabolic processes involved, the identification of each family of analytes, their pathways and potential metabolites is presented, focusing on those that are most prevalent. As shown in **Figure 3.A**, a common trace can be maintained between the e-Vitis feed and the early stages of digestion, comprising gastric and duodenal contents, which in turn are closely related. However, in the subsequent digestive stages, there is not such an obvious correspondence, and instead new bands are seen in the heat map, generated by potential additional metabolic processes. Thus, a first discussion of the pathway of tracer compounds from the feed to the adjacent gastric and duodenal stages of the swine is established. To follow by an in-depth analysis of the metabolites in the lower digestive system and excreta samples.

Biomarkers: Feed and Upper digestive system

Feed

The identification of the 25 specific marker compounds of the enriched feed, classified by families of compounds, is shown in **Table 3**. Among these families, flavonoids and procyanidins predominate, headed by catechin, epicatechin and procyanidins B1-B2, polyphenols characteristic of grape marc from white grapes and already identified in e-Vitis (Table 1). Two quercetin derivatives were also identified, quercetin-3-O-glucuronide (477 m/z) and quercetin-3-O-glucoside (463 m/z) producing the typical 301 m/z ion due to the loss of the glucuronic group (-176 Da) and the hexoxide (-162 Da) respectively (**Figure 4.A**)[20]. Similarly, compound 15, dihydroquercetin-O-rhamnoside or astilbin (449 m/z) displays 303

and 285 m/z ions resulting from the loss of a rhamnose moiety (-146 Da) and subsequent loss of water (-18 Da) (**Figure 4.B**)[21].

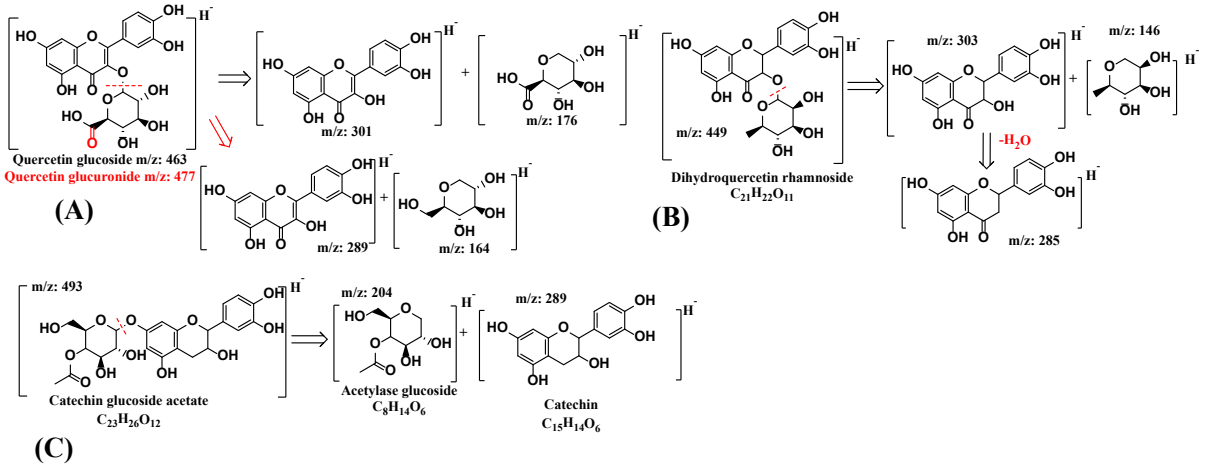


Figure 4 Fragmentation pathways of glycosylated phenolic compounds. A) Quercetin glucuronide and quercetin glucoside; B) dihydroquercetin-O-rhamnoside; C) Catechin glucoside acetate.

Catechin and its glycoside linked to an acetate group (compounds 13 and 14, respectively) are identified by the catechin ion 289 m/z and its characteristic fragments 245 and 203 m/z resulting from the loss of the OH- group in the C-ring and subsequent rearrangement in the A-ring, as well as the breakage of the C-ring respectively. In the case of catechin-O-glucoside acetate, fragmentation 493→289 due to the characteristic loss of glucoside from the -204 Da acetylase is evident (**Figure 4.C**)[22].

On the other hand, ions 181, 79 and 97 m/z, identified as glucose and the polyols sorbitol and mannitol respectively, have one of the highest distinct responses in the enriched feed, assumed by the addition of the extract. Grape marc is known to possess significant amounts of sugars such as glucose and fructose, as well as enzymes such as sorbitol dehydrogenase. It has been reported that post-harvest treatments of grapes, in which their water concentration is altered, can increase the conversion from glucose to fructose, generating sorbitol at an intermediate stage[23]. Furthermore, depending on the nature of the extractive solvent, enzymatic processes from glucose to fructose are favoured and the solubilisation of these sugars is reduced[24]. A modification of the enzymatic processes in the marc that increases the production of polyols and decreases the concentration of sugars can, therefore, be assumed.

Another notable group is that of the carboxylic acids composed of citric, malic and gluconic acids and their derivatives; common and highly present in grape marc[25]. Regarding fatty acids, long chain oxidation products of hydroxyoctadecadienoic (HODE) and trihydroxyoctadecenoic (TriHOME) acids are identified by the characteristic major ions 171, 229, 183 m/z[26–28]. These oxylipin chains are associated with pest and pathogen protection processes in plants[29]. Different derivatives of HODE and TriHOME are also involved in anti-tumour processes, inhibiting metastatic processes[30], or as regulators of respiratory processes in diseases such as asthma[31]. Although these compounds have been identified in plants and in beverages such as beer, where they influence its characteristic bitter taste[27], their presence and function in grape marc is still emerging.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Gastric Content

The gastric content of the experimental group pigs presented the closest match to the profile of the enriched feed in contrast to the other stages of the digestive tract, exhibiting an evident passage of the marker compounds. In a pseudotarget screening, using the spectral library generated from the 25 markers contained in the e-Vitis feed, 18 of these compounds were detected in the gastric contents (**Table 3, GC column**).

Except for gallic glycoside, all polyphenolic compounds were transported and detected with high intensity in the gastric fluid. Besides analysing the tracers, an untargeted search was also performed to identify the main indicators ($p<0,05$) defining the PCA analysis group of the gastric contents of the study swine. Ion families 448, 446, 496, 498, 797 and 815 m/z (**Table 4**) were the most abundant in the PCA zone corresponding to the swine supplied with e-Vitis feed (**Figure 5.A**). Correspondingly, the MS/MS matches analysis (**Figure 5.B**) indicated a clear relationship between the mass profile of all these ions.

Table 4 Biomarker compounds identified in the gastric content of pigs fed with e-Vitis.

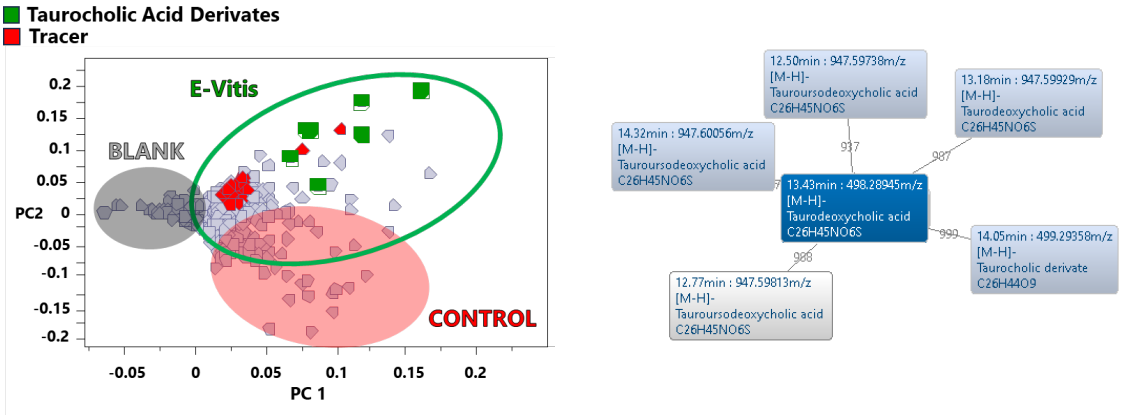
Nº	Name	Neutral Formula	RT	M calc,	m/z calc,	mSigma	Δm/z [mDa]	Fragments	GC	D	J	I	CE	C	F	U
1	Taurodeoxycholic Acid	$C_{26}H_{45}NO_6S$	13,43	499,30	498,29	11,54	0,16	124-107-80	X	X	-	X	-	-	-	-
2	Taurohyodeoxycholic acid	$C_{26}H_{45}NO_6S$	14,86	499,30	498,29	11,93	0,37	124-107-80-44	X	X	-	X	-	-	-	-
4	7-oxotaurolithocholic acid	$C_{26}H_{43}NO_6S$	13,31	497,28	496,27	59,24	0,51	124-107-80	X	X	X	X	-	-	-	-
5	Glycoursodeoxycholic acid	$C_{26}H_{43}NO_5$	12,75	449,31	448,31	6,56	0,68	386-84-74	X	X	X	X	-	-	-	X
7	Glycocholic acid	$C_{26}H_{43}NO_6$	12,67	465,31	446,29	31,00	0,18	402-386-344-84-74	X	X	X	X	-	-	-	X
8	Cholic Acid Dimer	$(C_{26}H_{43}NO_5)_2$	13,02	816,57	815,57	5,92	1,18	425-407	X	X	-	-	-	-	-	-
9	Deoxicholic Acid derivate	-	13,13	798,56	797,57	-	-	425-407-389-80	X	-	-	-	-	-	-	-
10	Taurocholic Acid	$C_{26}H_{45}NO_7S$	13,32	515,29	514,28	7,61	0,49	124-107-80	X	X	X	X	X	-	-	-

GC: gastric content, D: duodenum, J: jejunum, I: ileum, CE: caecum, C: colon, F: faeces , U: urine.

From this group of analytes, the most intense ions, 498 and 496 m/z, were designated by the SmartFormula tool as $C_{26}H_{45}NO_6S$ (498 m/z) and $C_{26}H_{43}NO_6S$ (496 m/z). Also, the mass spectra of each structure are contrasted by detecting the common ions 124, 107 and 80 m/z. Both structures and fragments are characteristic of taurine-conjugated bile acids, specifically taurodeoxycholic acid and isomers for the 498 m/z ion, and 7-oxotauroliotocholic acid for the 496 m/z ion. Reported fragments have been described as feature ions of taurine bile acids corresponding to 124 m/z ($H_2NC_2H_4SO_3^-$), 107 m/z ($CH_2CHSO_3^-$) and 80 m/z (SO_3^-) [32]. Ion 514 m/z, with the presence of fragments 107 and 80 m/z is clearly identified as taurocholic acid with formula $C_{26}H_{45}NO_7$.

Fragments 797 and 815 m/z, sharing product ions 389, 391, 405, 407 and 425 m/z, are related to the bile acid family. These ions are distinctive for dimers of cholic acid (815 m/z) and protonated deoxycholic acid (797 m/z) of the form [cholic+H^-+cholic]$^-$ and [cholic+H^-+deoxyholic]$^-$, respectively[33]. Ions 448 and 446 m/z were labelled as $C_{26}H_{43}NO_5$ and $C_{26}H_{43}NO_6$. Both ions share a major ion, 74 m/z, common to compounds with glycine. In turn, these analytes show affinity through MS/MS matches with several bile acids, being particularly identified as bile acid glycosides, specifically glucodeoxycholic acid (448 m/z) and glycocholic acid (446 m/z).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



(A) (B)

Figure 5 Distribution of tracers and taurine bile acid derivatives in the gastric contents of swine fed with e-Vitis. Display in the PCA plot (A) and their MS/MS correlations (B).

The increased concentration of these bile acids in the test group is attributed to the high polyphenolic load of the enriched feed. Due to a proven sequestering effect of the phenolic chains towards the bile acids, mainly of typical grape compounds as catechin and epicatechin, their absorption in the stomach is limited. This action results in a greater distribution of bile acids through the digestive tract, showing a higher bioavailability in bacterial deconjugation processes in the colon[34].

Duodenum

Duodenum analysis results in a strong correlation with the gastric content (**Figure 3.B**) and similarities with the enriched feed, as shown by the heat map (**Figure 3.A**). When tracing the 25 tracers (**Table 3, D column**), a reduction of the identified analytes compared to the gastric content is found, resulting in a total of 10 compounds. It is interesting to note that 9 of these analytes are phenolic structures, having a prevalence capacity in the digestive tract. Following a pseudo-targeted search, using the marker analytes in the gastric content as tracers, taurocholic acid derivatives were again detected in the duodenum. A comparison of the topographical map of the duodenum (**Figure 6.A**) with the respective gastric contents (**Figure 6.B**) indicates a higher abundance of taurocholic acid-derived compounds in the duodenum. Mainly in the zone of ions above 900 m/z where a higher density of analytes is exhibited. These compounds were used as markers to identify several derivatives of taurocholic acid by means of MS/MS matches (**Table 5**). The representation of these bile acids in the loading plot (**Figure 6.C**) appears as the main differentiating group in the area corresponding to the swine fed with e-Vitis. This supports the initial assumption of a wider availability of these compounds in other sectors of the digestive tract.

Medium-sized cholic acid derivatives between 400-600 Da were identified in the duodenum as isomers and derivatives of glucodeoxycholic and taurodeoxycholic acids. Compounds 1 and 2 (Table 5) show the fragmentations already seen in the gastric content (449→386→84→74 m/z y 499→124→107→80 m/z) for both acids. Compounds 3 and 4 present ions 499 and 515 m/z, identified as derivatives of protonated taurodeoxycholic and taurocholic acids.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

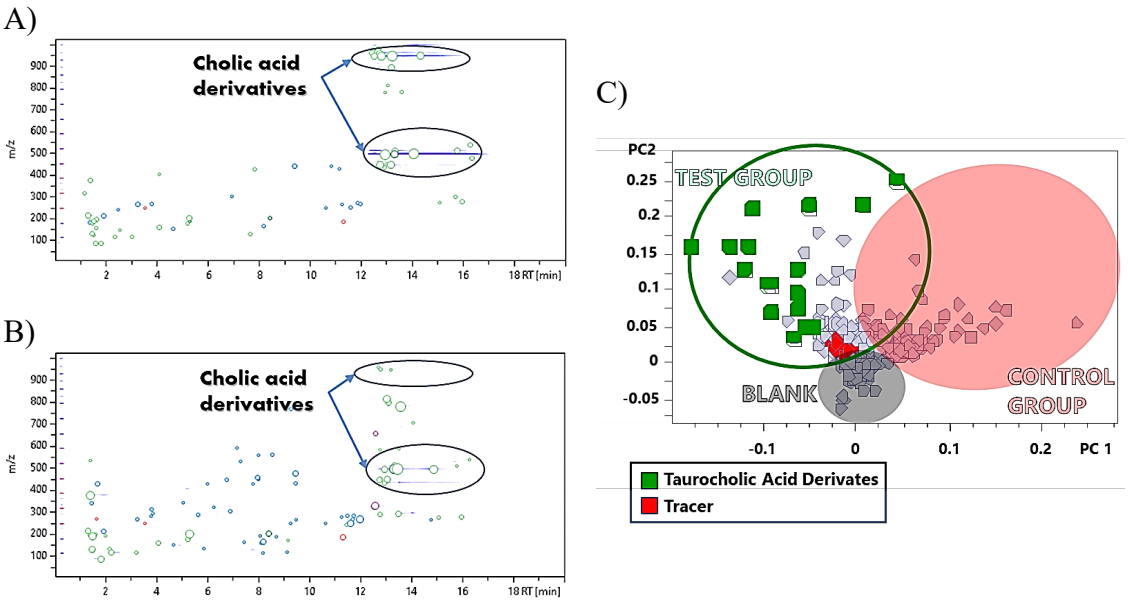


Figure 6 Distribution of tracers and taurine bile acid derivatives in the duodenum of swine fed e-Vitis feed: Topographical map (A) of the duodenal section and its correlation with the topographical map of the gastric contents (B), and Load diagram (C) of the duodenal section

In the 800 to 1000 Da range, dimers and derivatives of taurocholic, glucodeoxycholic and taurodeoxycholic acids are detected, fragmenting into the monomeric ions 514, 448 and 498 m/z, together with the characteristic product ions 124 and 74 m/z.

Table 5 Biomarker compounds identified in the duodenum of swine supplied with e-Vitis feed.

Nº	Name	Molecular Formula	RT	M calc,	m/z calc,	mSigma	Δm/z [mDa]	Fragments	D	J	I	CE	C	F	U
1	Glycodeoxycholic acid isomer	-	13,14	449,31	448,31	-	-	386-330-84-74-72	X	X	X	-	-	-	-
2	Taurodeoxycholic Acid isomer	-	16,34	499,30	498,29	-	-	124-106-79	X	-	X	X	-	-	X
3	Taurodeoxycholic acid derivate	-	14,05	500,30	499,29	-	-	124-107-80	X	-	-	-	-	-	-
4	Taurocholic Acid derivate	-	15,77	516,31	515,30	-	-	124-96-80	X	-	-	-	-	-	-
5	Glycodeoxycholic acid dime	-	16,77	898,63	897,62	-	-	498-448-402-386-281-255-167-74	X	X	X	-	-	-	-
6	Glycodeoxycholic acid derivate	-	13,63	912,61	911,6	-	-	499-464-448-446-196	X	X	X	-	-	-	X
7	Tauroursodeoxycholic acid derivate	-	13,53	932,61	931,61	-	-	498-482-390-372-283-196-74	X	-	-	-	-	-	
8	Taurodeoxycholic acid derivate	-	12,50	948,61	947,60	-	-	500-498-496-124-79	X	-	X	-	-	-	-
9	Tauroursodeoxycholic acid derivate	-	12,44	964,60	963,59	-	-	514-498-484-464-124-106-74	X	X	X	-	-	-	-
10	Taurocholic derivate	-	12,41	980,59	979,59	-	-	514-498-482-446-122-113	X	-	-	-	-	-	
11	7-oxotaurolithocholic acid derivate	-	12,59	998,59	997,58	-	-	514-498-446-124-106-96-79	X	-	X	-	-	-	-
12	Apigenin 7-O-glucuronide	$C_{21}H_{18}O_{11}$	10,81	446,08	445,07	0,998	29	269-113-74-175-59-85	X	-	-	-	-	-	X
13	Apigenin	$C_{15}H_{10}O_5$	11,68	270,05	269,04	0,119	13,8	113-74-175-59-85	X	-	-	-	-	-	X

D: duodenum, J: jejunum, I: ileum, CE: caecum, C: colon, F: faeces , U: urine

Additionally to the high response of bile acids, ions 445 m/z and 269 m/z stand out. Compound 13 (269 m/z) shows product ions 175 and 113 m/z indicative of apigenin fragmentation[35,36]. The structure corresponding to the 445 m/z ion, on the other hand, shows a difference with apigenin of 176 Da, representative of the glucuronide group, while showing the same product ions.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

They are thus established as apigenin and apigenin glucuronide. The origin of these polyphenolic and glucosylated chains, which are not present in the raw feed, can be deduced as a bioconversion of the ingested phenolic chains. Significant modifications of these phenolic chains have been reported, mainly in flavonoids, in digestive processes, generating new flavonoid compounds[37]. Glycosylated flavonoid chains such as quercetin derivatives are affected by gastric pH, degrading and becoming more stable as glycosylated apigenin and kaempherol[38].

Metabolites: Lower digestive system and Excreta

Jejunum

Jejunum analysis provides less segmentation of the data than the upper sections of the digestive tract (**Figure 1.D**). Here, tracer compounds of the e-Vitis-enriched feed are no longer detected. This can be assumed due to the upstream absorption of the compounds, the degradation per se in the jejunum and the transport of nutrients into the blood through the villi of this section of the small intestine. However, a clear clustering of the e-Vitis group can be discerned in the score plot (**Figure 1.D**), together with the presence of a small point cloud of characteristic analytes in the loading plot (**Figure 2.D**) that differentiates the groups studied. **Table 6** details the differentiating compounds of the e-Vitis Group for the jejunum, highlighting a group of 7 compounds consisting of taurocholic acid and its derivatives, and bile acid glycosides.

Table 6 Biomarker compounds identified in the jejunum of swine supplied with e-Vitis feed.

Nº	Name	Family	RT [min]	M meas,	m/z meas,	Fragments	J	I	CE	C	F	U
1	Glycodesoxycholic acid derivative	Bile Acids	12,6	483,28	482,27	-	X	X	X	-	-	-
2	Glycodesoxycholic acid isomers		12,71	449,31	448,30	-	X	-	-	-	-	-
3	Glycodesoxycholic acid isomers		12,44	449,31	448,30	-	X	-	-	-	-	-
4	Tauronorursodeoxycholic acid		13,89	485,28	484,27	-	X	-	-	-	-	-
5	Isomers of taurodeoxycholic acid		12,92	499,29	498,28	-	X	-	-	-	-	-
6	Taurodeoxycholic acid isomer		14,93	499,29	498,28	-	X	-	-	-	-	-
7	Taurocholic acid isomer		14,27	515,29	514,28	-	X	-	-	-	-	-
8	Hippuric acid	Organic Acids	5,94	179,05	178,04	134-132-113-85-77-56-41	X	X	-	-	-	X
9	Indole-3-lactic acid		8,36	205,07	204,06	186-164-158-142-116	X	X	-	-	-	-
10	Isoliquiritigenin glucuronide	Phenolic glucosides	11,89	432,20	431,19	387-255-251-193-175-127-113-85-75-59	X	X	-	-	-	X
11	Conjugated glucuronide of davidigenin		12,11	434,21	433,20	387-257-193-175-127-113-85-75-59	X	-	-	-	-	X

J: jejunum, I: ileum, CE: caecum, C: colon, F: faeces , U: urine.

Another ion of interest, 433 m/z (compound 11 in **Table 6**), exhibits fragments similar to those found in flavonoids such as apigenin, such as 175, 113, 85 and 59 m/z. This is a large flavonoid associated with a glycosylated derivative, showing a typical loss of -176 Da which generates the 257 m/z ion, consistent with a davidigenin glycoside. A known route for davidigenin formation involves dehydroxylation of flavanone glycosides via liquiritigenin or hydrogenation of flavanone glycosides via isoliquiritigenin[39]. This latter, isoliquiritigenin, is detected with the ion 431 m/z (compound 10 in **Table 6**), showing a product-characteristic ion profile in these glycosylated flavonoid chains already analysed. Dehydroxylation and hydrolysis processes of phenolic compounds mediated by the microbiota of the human digestive system have been observed[40]. It

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

is therefore feasible to assume that bioconversion of longer compounds, such as apigenin and quercetin glycosides detected in earlier stages of the digestive system, originate this compound.

Figure 7 depicts a possible metabolic pathway starting from apigenin, generating naringenin by hydrogenation, followed by loss of a hydroxyl group by dehydroxylation to produce liquiritigenin, and finally ring cleavage to form davidigenin. Similar bioconversions have been documented in in vivo assays in rats[39] and in human digestive models[38]. Both davidigenin and isoliquiritigenin have demonstrated significant anti-inflammatory and antispasmodic action, inhibiting negative contraction processes in the duodenum and ileum[41].

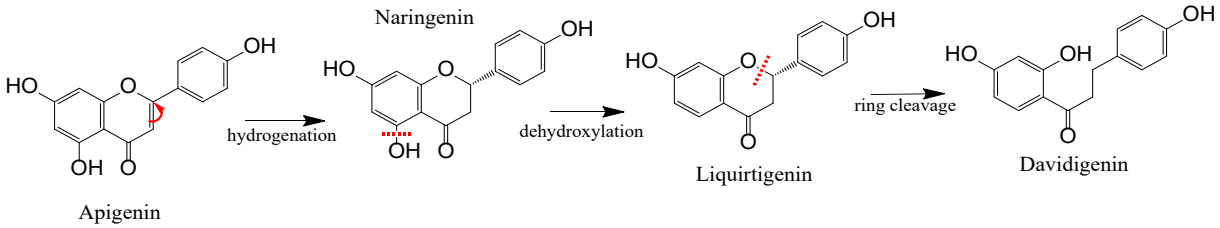


Figure 7 Metabolic pathway from apigenin to davidigenin.

An additional metabolite of note is represented by ion 204 m/z with product ions 186, 164, 158, 142, and 116 m/z; all previously reported as characteristic of the compound indole-3-lactic acid (ILA) [42]. This product of tryptophan metabolism has been linked to the intake of phenolic compounds from wine[43]. In turn, it shows high anti-inflammatory capacities, exhibiting an inhibitory effect on the release of inflammatory cytokines in intestinal epithelial cells[44].

One of the most remarkable compounds determined in the jejunum of the e-Vitis Group, as well as in ileum and urine, is represented by the 179 m/z ion. It has been identified as hippuric acid by comparison of its mass spectrum with the Human Metabolome Database (HMDB, identifier HMDB0000714), yielding its 7 product ions (134, 132, 113, 85, 77, 56 and 41 m/z). This organic acid is an acylglycine produced by the conjugation of benzoic acid and glycine, which is found as a normal component in urine[45]. This metabolite is considered a marker for the catabolism of dietary polyphenols. It is associated with the ingestion of foods or beverages with a high polyphenol load, showing elevated concentrations of this acid in both serum and urine[46–48]. Although its identification is mainly associated with urinary fluids, rats with a high intake of quercetin-4'-O-glucoside showed high concentrations of hippuric acid and derivatives in parts of the digestive tract such as jejunum and ileum, and also in urine and plasma[49]. Hippuric acid demonstrates several bioactivities such as antibacterial, fungicidal and cytotoxic; it maintains the acidity of urine and is used in pharmaceuticals for the treatment of urinary tract disorders against E. coli, enterococci and staphylococci pathogens[50].

Ileum

Analogous to the jejunum, the ileum has a complex segmentation in its cluster distribution in the PCA plot (**Figure 1.E**). In contrast, a higher pooling is reflected in the load plot (**Figure 2.E**), differentiating more clearly the group fed with enriched feed from the base feed. Bile acid derivatives are the most numerous biomarkers, as in jejunum (**Table 7**). They are shown with the 515 and 498 m/z ions derived from taurocholic acid, presenting the 124, 107 and 80 m/z fragments characteristic of these acids. The 498 m/z ion is specifically designated as a tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) derivative, and exhibits important activities as an anti-inflammatory,

neuroprotective and antioxidant agent[51]. Likewise, an oxotaurolithocholic acid derivative is shown, with the above-associated fragments 124, 96 and 79 m/z. In the ileum, larger bile acid chains are also evident, as in the duodenum (**Table 5**), with a new derivative of glycohyocholic acid with the ion 929 m/z and the product ions 464 and 74 m/z, already evident in these chains in the previous digestive stages.

Table 7 Biomarker compounds identified in the ileum of swine supplied with e-Vitis feed.

N	Name	RT [min]	M meas,	m/z meas,	Fragments	I	CE	C	F	U
1	Glycohyocholic acid derivate	12,63	930,61	929,60	464-74	X	-	-	-	X
2	Taurocholic acid derivare	13,61	515,29	496,27	124-106-79	X	-	-	-	-
3	Taurocholic acid isomer	13,88	515,29	514,28	124-106-79	X	-	-	-	X
4	Taurodeoxycholic acid isomers	13,99	499,29	498,28	432-124-106-79	X	-	-	-	-
5	Hyodeoxycholic acid	14,57	438,30	437,29	409-392-373-355-345-160-96-79-44	X	X	X	X	
6	Oxotaurolithocholic acid derivate	15,85	489,16	488,15	453-162-124-96-79-44	X	-	-	-	X

I: ileum, CE: caecum, C: colon, F: faeces , U: urine.

By comparison with MassBank of North America (MoNA) databases, the identification of hyodeoxycholic acid (437 m/z) was obtained, validating the product ions 391, 373, 392, 355 m/z. This secondary bile acid, previously detected in bile salts from poultry and pigs[52], is associated with a decrease in LDL concentration, an improvement in hepatic cholesterol biosynthesis and modulation of cholesterol content in faeces[53].

Caecum

Principal Component Analysis (PCA) of the caecum (**Figure 1.F** and **Figure 2.F**) indicates a clear differentiation between the groups studied, together with a defined concentration of analytes in the e-Vitis Group. In contrast, when compared to different segments of the digestive tract, the caecum exhibits a distinct singularity, characterised by a number of unique compounds that are not shared with the other samples analysed, observing only a small set of common analytes in the heat map (**Figure 3**). Thus, **Table 8** details the distinctive compounds identified in the caecum of animals fed an e-Vitis-enriched diet, validated through the identification algorithm proposed in this study and confirmed in the different spectral databases.

From the amino acid family, the identification of the compounds N-acetyl-L-methionine (190 m/z), ketoisocaproic acid (129) and their derivatives is proposed. Both compounds are common analytes derived from metabolic processes of Escherichia coli and their identification has been validated through the E. coli Metabolome Database (ECMDB). An additional compound identified, derived from the metabolism of bacteria that are part of the intestinal flora, is the auxin indolelactic acid (204 m/z). This organic compound is formed by the bonding of an indole ring with lactic acid, which is also identified with the ion 89 m/z. Indolelactic acid or indole-3-lactic acid displays intestinal probiotic functions such as antioxidant activity, immune regulation and reduction of inflammation[54]. Other derivatives of microbial metabolic processes are the analytes identified as 2-hydroxybutyric carboxylic acid (103 m/z) and futalosine (251 m/z). 2-Hydroxybutyric acid plays a role in regulating the gut microbiota and has a protective effect on liver damage[55]. In turn, futalosine plays a key role in the binding of menaquinone (vitamin K2) by bacteria in the intestinal tract[56]. Regarding the tracing of bile acids along the digestive tract, the caecum reveals a high number of cholic acid derivatives, including the acid itself (799 m/z) and validated with its characteristic fragmentation 425, 407, 391, 315, 299 and 185 m/z.

Table 8 Biomarker compounds identified in the caecum of pigs fed e-Vitis feed.

Nº	Name	Family	RT	Neutral Formula	M calc,	m/z calc,	Fragments	CE	C	F	U
1	Ketoisocaproic acid	Aminoacids and derivates	6,00	$C_6H_{10}O_3$	130,06	129,05	101-91-87-85-83-69-57-44	X	X	X	
2	Ketoisocaproic acid derivate		5,57	$C_6H_{10}O_3$	130,06	129,05	87-85-71-59-45-41	X	X	X	
3	N-acetyl-L-methionine		5,27	$C_7H_{13}NO_3S$	191,06	190,05	148-142-111-98-84-56-46	X	X	X	
4	Indolelactic acid	Auxins	8,41	$C_{11}H_{11}NO_3$	205,07	204,06	186-158-142-130-128-116-72-56-44	X			
5	Cholic acid derivate	Bile Acids	13,36	$C_{25}H_{42}O_7$	454,29	453,28	425-407-389-345-251	X	X		
6	Cholic acid derivate		14,46	-	454,29	453,28	425-407-389-283-61-44	X			
7	Cholic acid derivate		13,85	-	454,29	453,28	425-407-389-283-61-44	X			
8	Taurocholic acid isomer		13,61	$C_{26}H_{45}NO_7S$	515,29	514,28	514-407-390-372-124-106-95-79-61	X			
9	Cholic acid derivate		14,05	-	708,55	707,54	425-407-391-315-299-185	X			
10	Cholic acid derivate		13,57	-	784,58	783,57	425-407-391-315-299-185	X	X		
11	Cholic acid derivate		13,13	-	798,56	797,55	425-407-391-315-299-185	X			
12	Cholic acid derivate		13,56	-	800,58	799,57	425-407-391-315-299-185	X	X		
13	Cholic acid		12,78	$C_{24}H_{40}O_5$	812,54	811,53	407-387-293-171-11-80-59-44	X			
14	Bile acid derivate		13,38	$C_{48}H_{80}O_{10}$	816,57	815,56	425-407-361-321-59	X	X		
15	D-erythro-L-galacto-Nonulose	Carbohydrate derivative	1,54	$C_9H_{18}O_9$	270,09	269,08	179-119-113-101-92-89-78-71-59-43	X			
16	2-Hydroxybutyric acid	Carboxilic Acids	2,47	$C_4H_8O_3$	104,04	103,0401	59-57-45	X			
17	6-Hydroxyisocaproic acid		7,34	$C_6H_{12}O_3$	132,07	131,0714	131-129-113-89-86-85-12-71-69-44	X			
18	3-hydroxypentanoic acid	Fatty Acids	4,94	$C_5H_{10}O_3$	118,06	117,05	117-73-72-71-44	X			
19	Arachidonic acid		15,7	$C_{20}H_{32}O_2$	304,24	303,23	259-205-79-59	X			
20	Futalosine	Inosine derivative	3,50	$C_{19}H_{18}N_4O_7$	252,08	251,07	161-135-118-108-92-80-65-59	X	X	X	
21	Lactic Acid isomer	Organic Acids	1,56	$C_3H_6O_3$	90,03	89,02	-	X			
22	Lactic Acid isomer		1,79	$C_3H_6O_3$	90,03	89,02	-	X			
23	Lactic Acid isomer		2,77	$C_3H_6O_3$	90,03	89,02	-	X			
24	Maleylacetic acid		1,61	$C_6H_6O_5$	158,02	157,01	114-89-70-44	X			
25	Hydroxyphenylacetic acid	Phenolics	6,11	$C_8H_8O_3$	152,04	151,04	123-115-107-79-65-46	X			
26	Hydroxyphenyllactic acid		5,20	$C_9H_{10}O_4$	182,05	181,05	179-163-135-119-107-93-89-72-59-44	X			
27	Daidzein		11,58	$C_{15}H_{10}O_4$	254,05	253,05	223-208-195-149-132-91	X			X

CE: caecum, C: colon, F: faeces , U: urine.

Colon and Faeces

Table 9 illustrates the pooled analysis of the marker compounds present in colon and faeces from pigs supplied with e-Vitis-enriched feed. The analysis of these samples is performed together due to the close similarity of the analytes present in each one.

Table 9 Biomarker compounds identified in the colon of pigs fed e-Vitis feed.

Nº	Name	Family	RT	Neutral Formula	M meas	m/z meas,	mSigma	Δm/z [mDa]	Fragments	C	F	U
1	Phenylalanine	Aminoacids	4,05	$C_9H_{11}NO_2$	165,07	164,07	0,57	1,513	147-103-91-72	X	X	
2	Phenylacetic acid		9,46	$C_8H_8O_2$	136,05	135,04	4,35	1,93	91-85-59	-	X	
3	Hydroxyphenilacetic		6,57	$C_8H_8O_3$	152,04	151,03	7,09	2,05	121-107-93-77-65		X	
4	Cholic acid derivate	Bile Acids	12,8	-	454,30	453,29	-	-	425-407-389-361-345-59-44	X	X	X
5	Hyodeoxycholic acid derivate		12,91	-	784,58	783,58	-	-	409-391	X	X	
6	Cholic acid derivate		13,95	$C_{52}H_{80}O_4$	768,60	767,59	19,79	6,3916	407-391-375-299	X	X	
7	Hyodeoxycholic acid dimer		12,91	$C_{48}H_{80}O_8$	784,58	783,57	16,94	0,1538	409-391-377-110-59	X	X	
8	Cholic acid derivate		13,72	$C_{55}H_{88}O_5$	828,66	827,65	45,70	5,0089	433-407-391-265	X	X	
9	Taurine derivate		4,77	-	209,07	208,06	-	-	160-146-142-124-117-106-94-89-79-73-66-59-44	X	X	
10	Hyodeoxycholic acid derivate		14,16	-	438,29	437,29	-	,	409-391-44	X	X	
11	Cholic acid derivate		13,1	-	800,57	799,57	-	-	425-407-391-265	X	X	
12	Sugar chloride derivate	Carbohydrates	1,30	$C_6H_{13}ClO_6$	216,04	215,03	24,25	0,8582	181-154-145-128-104-96-92-89-78-59-34	X	X	
13	Mallic acid derivate	Carboxilic Acids	1,49	-	129,04	128,03	-	-	115-89-82-72-71-45	X	X	
14	Methylglutaric acid		5,01	$C_6H_{10}O_4$	146,05	145,04	6,02	1,7395	127-101-83-81	X	X	
15	Suberic acid		9,13	$C_8H_{14}O_4$	174,08	173,08	1,97	1,1414	129-11-109-83-57		X	
16	Sebacic acid		11,96	$C_{10}H_{18}O_4$	202,12	201,11	8,10	0,94	183-139-111-57	X	X	X
17	Pimelic acid		6,76	$C_7H_{12}O_4$	160,07	159,06	6,37	1,6758	141-115-97-95-81	X	X	

C: colon, F: faeces , U: urine.

Amino acids identified with ions 164, 135 and 151 m/z presented the main differentiation both in the colon and faeces of e-Vitis pigs in contrast to those fed the base feed. The 164 m/z ion was characterised as phenylalanine due to its distinctive fragmentation 164→147m/z, resulting from the elimination of the N-terminal glycine as a neutral amide to form deprotonated cinnamic acid (Figure 8), which subsequently loses CO_2 to form deprotonated styrene (103 m/z)[57]. Subsequently, its benzyl ring is observed (91 m/z), as well as its fragmentation into smaller structures (72 m/z)[58]. Ions 135 m/z and 151 m/z, labelled as phenylacetic acid and hydroxyphenylacetic acid respectively, were associated by spectral matches with phenylalanine, as well as by querying the MoNA database.

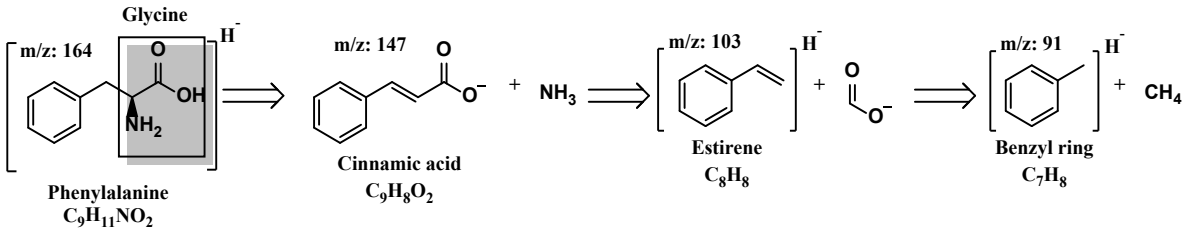


Figure 8 Phenylalanine fragmentation pathway.

This family of phenylacetic auxin-derived acids has been established as markers in rutin- and quercetin-rich diets, being the main metabolites of microbial degradation of these phenolic compounds. In in vivo assays, their presence has been demonstrated in the colon and urine of rats fed high doses of quercetin and rutin, quantifying their antioxidant functionality mainly due to induced microbial metabolisation rather than the direct effect of the polyphenols originating from this metabolisation[59].

The protective effect assumed by phenolic chains on taurocholic, and cholic bile acid derivatives is evident from gastric contents to this point, both in colon and faeces. A total of 8 bile acid derivatives are identified in colon and faeces through the common fragmentation 425→409→407→391 m/z that all these compounds present in general.

As mentioned above, carbohydrates such as glucose, fructose, mannitol and sorbitol stand out among the nutrients provided to the swine by the enriched feed. Thus, a chlorine adduct of these sugars $(M+Cl)^-$ is detected both in colon and faeces with the ion 215 m/z and evidenced by the fragmentation 215→181 due to the loss of a Cl_2 group (35 mDa) and leaving the ion 181 m/z corresponding to the compounds sorbitol and mannitol already recognised in the feed.

Another important family of metabolites identified are the carboxylic acid group, including suberic acid (173 m/z), sebacic acid (202 m/z), pimelic acid (160 m/z) and methylglutaric acid (145 m/z). These acids are associated with metabolic processes of fatty acid oxidation, through the activation of nuclear receptors that regulate energy metabolism. A modulating effect of phenolic chains such as catechin on these nuclear receptors has also been demonstrated, which may similarly lead to increased excretion of carboxylic acids [60].

Urine

During the study of the various digestive stages in swine, a variety of compounds have also been identified as being present in urine. Starting with the profile of the enriched feed, malic and citric acids detected in e-Vitis feed are also found in urine. In the gastric content, bile acid

derivatives are shared with urine; while taurocholic acid derivatives as well as the flavone apigenin and its glycosylated derivatives have been detected in duodenum and urine. The hydrochalcone davidigenin and hippuric acid associated with polyphenolic-containing diets were detected in both jejunum and urine. In the ileum and caecum, taurocholic compounds, amino acids and the isoflavone daidzein were observed and excreted in urinary samples. Finally, in the faeces and colon, cholic acid derivatives and a significant response of the carboxylic acid sebacic acid, also present in the urine, have been identified.

In contrast to the other digestive stages, urine like caecum shows an isolated profile represented in the dendrogram plot (**Figure 3.B**), however, it shows a stronger relationship mainly with the ileum and jejunum stages where a common zone is observed in the heat map. This similarity is assumed to be due to the fact that a large part of the metabolites present in urine are derived from the gut microbiota[61].

In terms of metabolic products, unique markers shown in Table 10 are present exclusively or with a significant ($p<0,05$) higher response in the urine of swine supplied with e-Vitis feed. Besides the carboxylic acids previously identified in urine as citric, malic, hippuric, and sebacic acids; azelaic, succinic, α-ketoglutaric, itaconic and aconitic acids were also identified with ions 187, 117, 145, 129 and 174 m/z, respectively. Many of these organic acid derivatives are related to the consumption of diets with a high polyphenolic content. Especially, azelaic acid demonstrates significant levels in urine without undergoing metabolisation at other stages of the digestive system due to metabolic modification induced by phenolic compounds. In previous studies in which hypercholesterolaemic pigs were fed with feed rich in phenolic compounds, higher levels of azelaic acid and sebacic derivatives were quantified in contrast to the control group[62].

Table 10 Biomarker compounds identified in the urine of pigs fed e-Vitis feed.

Nº	Name	Family	Rt (min)	Neutral Formula	M meas	m/z meas,	mSigma	Δm/z [mDa]	Fragments
1	Azelaic acid	Carboxylic Acids & Derivates	11,26	$C_9H_{16}O_4$	188,10	187,09	1,26	7,68	169-143-125-57
2	Succinic acid		1,8	$C_4H_6O_4$	118,03	117,02	5,27	2,14	99-74-73-55
3	Ketoglutaric acid		1,51	$C_5H_6O_5$	146,02	145,01	7,22	1,66	129-101-73-57
4	Itaconic acid		1,74	$C_5H_6O_4$	130,03	129,02	5,76	1,82	126-115-88-85-74-71-59
5	Aconitic acid		1,76	$C_6H_6O_6$	174,02	173,01	9,89	1,77	157-129-11-87-85
6	Benzoic acid	Carboxilic Phenolics compounds	8,66	$C_7H_6O_2$	122,04	121,03	4,49	1,33	119-101-79-77-71
7	Hydroxyphenyl acetic acid		4,93	$C_9H_{10}O_4$	182,06	181,05	2,93	1,22	178-163-135-119-72

Other carboxylic acids with phenolic structure were identified with ions 181 and 121 m/z belonging to hydroxyphenyl acetic and benzoic acids. These compounds and related acids have been found to be strongly linked to the consumption of phenolic compounds, generating mediations in the bacterial metabolism of the digestive system. Urinary excretion of phenolic acids, such as 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, has been associated with the consumption of diets rich in polyphenolic compounds resistant to depolymerisation in the stomach, presenting a higher bioavailability in posterior stage of the digestive tract where they are absorbed as smaller phenolic acids[63].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONCLUSIONS

The functional impact of the addition of the e-Vitis extract, derived from white grape marc and rich in phenolic compounds, to swine feed was evaluated. The proposed extractive technique, MSPD, proved to be a powerful tool in the extraction of bioactive compounds from diverse samples of feed and feed ingredients, as well as from biological samples including different sections of the swine digestive tract (gastric content, duodenum, ileum, jejunum, caecum and colon) and excreta (faeces and urine). The application of MSPD in conjunction with high performance liquid chromatography coupled to high performance mass spectrometry (UHPLC-QTOF) allowed the selection of 25 tracer compounds from the feed and their comprehensive tracking through the digestive tract and excreta. Furthermore, 220 additional differentiating biomarkers were identified between the swine fed the standard diet and those fed the e-Vitis enriched feed. A predominance of e-Vitis polyphenolic compounds was observed throughout the digestive system of the swine, with more than 80 % of these compounds detected in the gastric and duodenal contents.

Several metabolic markers were also identified and tracked along the digestive tract and excreta. Their study has led to the proposal or confirmation of several metabolic processes undergone by grape polyphenols and to relate them to potential effects on the gastrointestinal health of piglets. Thus, a protective action of phenolic compounds on bile acids, especially those derived from taurine or bound to amino acids such as glycine, was evidenced in the early stages of the digestive system. This resulted in increased bioavailability at later stages, validated by detection of these compounds and their derivatives throughout the digestive system. In addition, important bioconversion processes were identified, where the initial phenolic structures, led by catechins, procyanidins and glycosidic derivatives of quercetin, were transformed into other phenolic chains that enhanced the action of the microbiota, evidenced mainly by the generation of increased amounts of carboxylic acids. These carboxylic biomarkers, associated with diets rich in phenolic compounds, included suberic acid, sebacic acid, pimelic acid and methylglutaric acid. To date, there is no reported work on the functional study of phenolic-enriched feeds that employs a global metabolomics approach to comprehensively address the digestive system of farm animals. This is also the first study to propose a unified approach to extract and analyse markers and their metabolites from all types of samples: plant-based ingredients, whole feed, all sections of the piglet digestive system and excreta. Therefore, the results of this study could be of significant relevance for understanding the mechanisms of action of plant phenolics on farm animal health, and also for identifying potential biomarkers to provide a parameter to measure the effectiveness of the doses delivered.

FUNDING

This research has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 101036768 (NeoGiANT project). This work was also funded by project ED431 2020/06 (Galician Competitive Research Groups Xunta de Galicia). All these programmes are co-funded by FEDER (EU). This article is based upon work from the Sample Preparation Study Group and Network, supported by the Division of Analytical Chemistry of the European Chemical Society. Castillo A. acknowledges the support of the Program and the MCI of Spain for his contract part of the grant DIN2021-011976 funded by the MCIN/AEI/10.13039/501100011033.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ACKNOWLEDGMENTS

The authors of this work acknowledge Mar de Frades winery for its contribution supplying the Albariño white grape marc and i-Grape Laboratory for providing the corresponding grape marc extracts.

REFERENCES

[1] FAO. 2022. FAO publications catalogue 2022 – October. Rome. https://doi.org/10.4060/CC2323EN.

[2] FAO. 2021. Land use statistics and indicators statistics. Global, regional and country trends 1990– 2019. FAOSTAT Analytical Brief Series No 28. Rome.

[3] Durmic Z, Blache D. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. Animal Feed Science and Technology 2012;176:150–62. https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2012.07.018.

[4] Vastolo A, Calabrò S, Cutrignelli MI. A review on the use of agro-industrial CO-products in animals' diets. Italian Journal of Animal Science 2022;21:577–94. https://doi.org/10.1080/1828051X.2022.2039562.

[5] Sandström V, Chrysafi A, Lamminen M, Troell M, Jalava M, Piipponen J, *et al.* Food system by-products upcycled in livestock and aquaculture feeds can increase global food supply. Nature Food 2022;3:729–40. https://doi.org/10.1038/s43016-022-00589-6.

[6] Correddu F, Lunesu MF, Buffa G, Atzori AS, Nudda A, Battacone G, *et al.* Can Agro-Industrial By-Products Rich in Polyphenols be Advantageously Used in the Feeding and Nutrition of Dairy Small Ruminants? Animals 2020;10:131. https://doi.org/10.3390/ANI10010131.

[7] Suescun-Ospina ST, Vera N, Astudillo R, Yunda C, Williams P, Allende R, *et al.* Effects of País grape marc inclusion in high and low forage diets: ruminal fermentation, methane production and volatile fatty acids. Italian Journal of Animal Science 2022;21:924–33. https://doi.org/10.1080/1828051X.2022.2076620.

[8] Wu H, Zhang P, Zhang F, Shishir MSR, Chauhan SS, Rugoho I, *et al.* Effect of Grape Marc Added Diet on Live Weight Gain, Blood Parameters, Nitrogen Excretion, and Behaviour of Sheep. Animals 2022;12:225. https://doi.org/10.3390/ANI12030225.

[9] Moate PJ, Jacobs JL, Hixson JL, Deighton MH, Hannah MC, Morris GL, *et al.* Effects of Feeding either Red or White Grape Marc on Milk Production and Methane Emissions from Early-Lactation Dairy Cows. Animals 2020;10:976. https://doi.org/10.3390/ANI10060976.

[10] Serra V, Salvatori G, Pastorelli G. Dietary Polyphenol Supplementation in Food Producing Animals: Effects on the Quality of Derived Products. Animals 2021;11:1–44. https://doi.org/10.3390/ANI11020401.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[11] Barker SA, Long AR, Short CR. A New Approach to Tissue Residue Analyses. Proceedings of the 6th Biennial Symposium of the American Academy of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 1988: 55–6.

[12] Castillo A, Pereira S, Otero A, Garcia-Jares C, Lores M. Multicomponent bioactive extract from red stage *Haematococcus pluvialis* wet paste: avoiding the drying step and toxic solvents. Journal of Applied Phycology 2022;36:1–17. https://doi.org/10.1007/S10811-022-02712-3.

[13] Lores Aguin M, Garcia Jares C, Alvarez Casas M, Llompart Maria. Polyphenol Extract From White-Grape Residue. Spain. Patent WO 2014013122, January 23, 2018. Spain Patent, ES2443547B2, 2018.

[14] National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [cited 2024 Apr 14]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/.

[15] Hastings J, Owen G, Dekker A, Ennis M, Kale N, Muthukrishnan V, *et al.* ChEBI in 2016: Improved services and an expanding collection of metabolites. Nucleic Acids Research 2015;44:D1214-9. https://doi.org/10.1093/NAR/GKV1031.

[16] MassBank of North America. [cited 2024 Apr 14]. Available from: https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/.

[17] MassBank | MassBank Europe Mass Spectral DataBase [cited 2024 Apr 14]. Available from: https://massbank.eu/MassBank/.

[18] MetaboAnalyst. [cited 2024 Apr 14]. Available from: https://www.metaboanalyst.ca.

[19] Babicki S, Arndt D, Marcu A, Liang Y, Grant JR, Maciejewski A, *et al.* Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. Nucleic Acids Research 2016;44:W147–53. https://doi.org/10.1093/NAR/GKW419.

[20] Simirgiotis MJ, Benites J, Areche C, Sepu B. Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic *Nolana* Species by HPLC-PDA-ESI-MS. Molecules 2015;20:11490. https://doi.org/10.3390/MOLECULES200611490.

[21] Escobar-Avello D, Lozano-Castellón J, Mardones C, Pérez AJ, Saéz V, Riquelme S, *et al.* Phenolic Profile of Grape Canes: Novel Compounds Identified by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. Molecules 2019;24:3763. https://doi.org/10.3390/MOLECULES24203763.

[22] Zhao HY, Fan MX, Wu X, Wang HJ, Yang J, Si N, *et al.* Chemical Profiling of the Chinese Herb Formula Xiao-Cheng-Qi Decoction Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Journal of Chromatographic Science 2013;51:273–85. https://doi.org/10.1093/CHROMSCI/BMS138.

[23] Conde A, Soares F, Breia R, Gerós H. Postharvest dehydration induces variable changes in the primary metabolism of grape berries. Food Research International 2018;105:261–70. https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.11.052.

USC DE COMPOSTELA

[24] Vilonen KM, Vuolanto A, Jokela J, Leisola MSA, Krause AOI. Enhanced Glucose to Fructose Conversion in Acetone with Xylose Isomerase Stabilized by Crystallization and Cross-Linking. Biotechnology Progress 2004;20:1555–60. https://doi.org/10.1021/BP049927J.

[25] Jelley RE, Deed RC, Barker D, Parish-Virtue K, Fedrizzi B. Fermentation of Sauvignon blanc grape marc extract yields important wine aroma 3-sulfanylhexan-1-ol (3SH). LWT 2020;131:109653. https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109653.

[26] Cong W, Tello E, Simons CT, Peterson DG. Identification of Non-Volatile Compounds That Impact Flavor Disliking of Whole Wheat Bread Made with Aged Flours. Molecules 2022;27:1331. https://doi.org/10.3390/MOLECULES27041331.

[27] Fuchs D, Hamberg M, SkÃ Cm, Wheelock sa M, Wheelock CE. An LC-MS/MS workflow to characterize 16 regio- and stereoisomeric trihydroxyoctadecenoic acids[S]. Journal Lipid Research 2018;59:2025–33. https://doi.org/10.1194/jlr.D087429.

[28] Razola-Díaz MDC, Gómez-Caravaca AM, Guerra-Hernández EJ, Garcia-Villanova B, Verardo V. New Advances in the Phenolic Composition of Tiger Nut (*Cyperus esculentus* L.) by-Products. Foods 2022;11. https://doi.org/10.3390/FOODS11030343.

[29] Prost I, Dhondt S, Rothe G, Vicente J, Rodriguez MJ, Kift N, *et al.* Evaluation of the Antimicrobial Activities of Plant Oxylipins Supports Their Involvement in Defense against Pathogens. Plant Physiol 2005;139:1902–13. https://doi.org/10.1104/PP.105.066274.

[30] DF H, VA Z. The importance of linoleic acid metabolites in cancer metastasis and in the synthesis and actions of 13-HODE. Recent Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research 1997;433:291–4. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1810-9_61.

[31] Fuchs D, Tang X, Johnsson AK, Dahlén SE, Hamberg M, Wheelock CE. Eosinophils synthesize trihydroxyoctadecenoic acids (TriHOMEs) via a 15-lipoxygenase dependent process. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 2020;1865:158611. https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2020.158611.

[32] Griffiths WJ, Sjövall J. Bile acids: analysis in biological fluids and tissues. Journal of lipid research 2010;51:23. https://doi.org/10.1194/JLR.R001941-JLR200.

[33] Bortolini O, Fantin G, Ferretti V, Fogagnolo M, Giovannini PP, Medici A. Relative acidity scale of bile acids through ESI-MS measurements. Organic & Biomolecular Chemistry 2010;8:3674–7. https://doi.org/10.1039/C003137B.

[34] Holt RR, Barile D, Wang SC, Munafo JP, Arvik T, Li X, *et al.* Chardonnay Marc as a New Model for Upcycled Co-products in the Food Industry: Concentration of Diverse Natural Products Chemistry for Consumer Health and Sensory Benefits. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2022;70:15007. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.2C04519.

[35] Cho K, Choi YJ, Ahn YH. Identification of Polyphenol Glucuronide Conjugates in *Glechoma hederacea* var. *longituba* Hot Water Extracts by High-Performance Liquid Chromatography-

USC DE COMPOSTELA

Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS). Molecules 2020;25:4713. https://doi.org/10.3390/MOLECULES25204713.

[36] Kunter İ, Tarabishi MT, Zabib N, Erçetin T, İlktaç M, Göger F, *et al.* New Data for Endemic Phlomis cypria Post from North Cyprus: Biological Activities and LC MS/MS Analysis. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research 2023;57:511–8. https://doi.org/10.5530/ijper.57.2.62.

[37] Ray SK, Mukherjee S. Evolving Interplay Between Dietary Polyphenols and Gut Microbiota—An Emerging Importance in Healthcare. Frontiers in Nutrition 2021;8:634944. https://doi.org/10.3389/FNUT.2021.634944.

[38] Rha CS, Seong H, Jung YS, Jang D, Kwak JG, Kim DO, *et al.* Stability and Fermentability of Green Tea Flavonols in In-Vitro-Simulated Gastrointestinal Digestion and Human Fecal Fermentation. International Journal of Molecular Sciences 2019;20:5890. https://doi.org/10.3390/IJMS20235890.

[39] Ammar RM, Pferschy-Wenzig EM, Van den Abbeele P, Verstrepen L, Ghyselinck J, Thumann T, *et al.* Possible role of the gut microbiome in mediating the beneficial effects of the six-herbal formulation STW 5-II on digestive health. Phytomedicine 2023;119:154996. https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2023.154996.

[40] Tomas-Barberan F, García-Villalba R, Quartieri A, Raimondi S, Amaretti A, Leonardi A, *et al.* In vitro transformation of chlorogenic acid by human gut microbiota. Molecular Nutrition & Food Research 2014;58:1122–31. https://doi.org/10.1002/MNFR.201300441.

[41] Desire O, Rivière C, Razafindrazaka R, Goossens L, Moreau S, Guillon J, *et al.* Antispasmodic and antioxidant activities of fractions and bioactive constituent davidigenin isolated from *Mascarenhasia arborescens*. Journal of Ethnopharmacology 2010;130:320–8. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.017.

[42] Meng D, Sommella E, Salviati E, Campiglia P, Ganguli K, Djebali K, *et al.* Indole-3-lactic acid, a metabolite of tryptophan, secreted by *Bifidobacterium longum* subspecies infantis is anti-inflammatory in the immature intestine. Pediatric Research 2020;88:209. https://doi.org/10.1038/S41390-019-0740-X.

[43] Lekka P, Fragopoulou E, Terpou A, Dasenaki M. Exploring Human Metabolome after Wine Intake-A Review. Molecules 2023;28:7616. https://doi.org/10.3390/MOLECULES28227616.

[44] Ehrlich AM, Pacheco AR, Henrick BM, Taft D, Xu G, Huda MN, *et al.* Indole-3-lactic acid associated with *Bifidobacterium*-dominated microbiota significantly decreases inflammation in intestinal epithelial cells. BMC Microbiology 2020;20:1–13. https://doi.org/10.1186/S12866-020-02023-Y.

[45] Ticinesi A, Guerra A, Nouvenne A, Meschi T, Maggi S. Disentangling the Complexity of Nutrition, Frailty and Gut Microbial Pathways during Aging: A Focus on Hippuric Acid. Nutrients 2023;15. https://doi.org/10.3390/NU15051138.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[46] Pereira-Caro G, Borges G, Van Der Hooft J, Clifford MN, Del Rio D, Lean MEJ, *et al.* Orange juice (poly)phenols are highly bioavailable in humans. American Journal of Clinical Nutrition 2014;100:1378–84. https://doi.org/10.3945/AJCN.114.090282.

[47] Feliciano RP, Boeres A, Massacessi L, Istas G, Ventura MR, Nunes Dos Santos C, *et al.* Identification and quantification of novel cranberry-derived plasma and urinary (poly)phenols. Arch Biochem Biophys 2016;599:31–41. https://doi.org/10.1016/J.ABB.2016.01.014.

[48] Liu H, Garrett TJ, Su Z, Khoo C, Zhao S, Gu L. Modifications of the urinary metabolome in young women after cranberry juice consumption were revealed using the UHPLC-Q-orbitrap-HRMS-based metabolomics approach. Food Funct 2020;11:2466–76. https://doi.org/10.1039/C9FO02266J.

[49] Mosele JI, Macià A, Motilva MJ. Metabolic and Microbial Modulation of the Large Intestine Ecosystem by Non-Absorbed Diet Phenolic Compounds: A Review. Molecules 2015;20:17429–68. https://doi.org/10.3390/MOLECULES200917429.

[50] Tahir T, Ashfaq M, Asghar H, Shahzad MI, Tabassum R, Ashfaq A. Medicinal Importance of Azo and Hippuric Acid Derivatives. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 2019;19:708–19. https://doi.org/10.2174/1389557518666180727162018.

[51] Vang S, Longley K, Steer CJ, Low WC. The Unexpected Uses of Urso- and Tauroursodeoxycholic Acid in the Treatment of Non-liver Diseases. Global Advances in Integrative Medicine and Health 2014;3:58. https://doi.org/10.7453/GAHMJ.2014.017.

[52] Haslewood GA. Bile salts of germ-free domestic fowl and pigs. Biochemical Journal 1971;123:15. https://doi.org/10.1042/BJ1230015.

[53] Cohen-Solal C, Parquet M, Férézou J, Sérougne C, Lutton C. Effects of hyodeoxycholic acid and α-hyocholic acid, two 6α-hydroxylated bile acids, on cholesterol and bile acid metabolism in the hamster. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism 1995;1257:189–97. https://doi.org/10.1016/0005-2760(95)00073-L.

[54] Zhou Q, Xie Z, Wu D, Liu L, Shi Y, Li P, *et al.* The Effect of Indole-3-Lactic Acid from Lactiplantibacillus plantarum ZJ316 on Human Intestinal Microbiota In Vitro. Foods 2022;11. https://doi.org/10.3390/FOODS11203302.

[55] Zheng N, Gu Y, Hong Y, Sheng L, Chen L, Zhang F, *et al.* Vancomycin pretreatment attenuates acetaminophen-induced liver injury through 2-hydroxybutyric acid. Journal of Pharmaceutical Analysis 2020;10:560–70. https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2019.11.003.

[56] Ding W, Ji X, Zhong Y, Xu K, Zhang Q. Adenosylation reactions catalyzed by the radical S-adenosylmethionine superfamily enzymes. Current Opinion in Chemical Biology 2020;55:86–95. https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2020.01.007.

[57] Harrison AG. Effect of phenylalanine on the fragmentation of deprotonated peptides. J Am Soc Mass Spectrometry 2002;13:1242–9. https://doi.org/10.1016/S1044-0305(02)00455-5.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[58] Hamany Djande CY, Steenkamp PA, Piater LA, Tugizimana F, Dubery IA. Hordatines and Associated Precursors Dominate Metabolite Profiles of Barley (*Hordeum vulgare L.*) Seedlings: A Metabolomics Study of Five Cultivars. Metabolites 2022;12. https://doi.org/10.3390/METABO12040310.

[59] Lee CY, Sim SM, Cheng HM. Phenylacetic acids were detected in the plasma and urine of rats administered with low-dose mulberry leaf extract. Nutrition Research 2008;28:555–63. https://doi.org/10.1016/J.NUTRES.2008.05.001.

[60] Quifer-Rada P, Chiva-Blanch G, Jáuregui O, Estruch R, Lamuela-Raventós RM. A discovery-driven approach to elucidate urinary metabolome changes after a regular and moderate consumption of beer and nonalcoholic beer in subjects at high cardiovascular risk. Molecular Nutrition Food Research 2017;61:1600980. https://doi.org/10.1002/MNFR.201600980.

[61] Zhang W, An Y, Qin X, Wu X, Wang X, Hou H, *et al.* Gut Microbiota-Derived Metabolites in Colorectal Cancer: The Bad and the Challenges. Frontiers in Oncology 2021;11:739648. https://doi.org/10.3389/FONC.2021.73968.

[62] Nørskov NP, Hedemann MS, Lærke HN, Knudsen KEB. Multicompartmental nontargeted LC-MS metabolomics: explorative study on the metabolic responses of rye fiber versus refined wheat fiber intake in plasma and urine of hypercholesterolemic pigs. Journal of Proteome Research 2013;12:2818–32. https://doi.org/10.1021/PR400164B.

[63] Rios LY, Gonthier MP, Rémésy C, Mila I, Lapierre C, Lazarus SA, *et al.* Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. The American Journal of Clinical Nutrition 2003;77:912–8. https://doi.org/10.1093/AJCN/77.4.912.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo 4. Escalado industrial de los extractos bioactivos (Datos no publicados)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La integración de propuestas provenientes del ámbito académico en un marco industrial se encuentra fundamentalmente condicionada por su capacidad de adaptación hacia los medios de producción ya establecidos. Los prototipos altamente especializados pueden ser incompatibles con los procesos a gran escala, especialmente cuando la tecnología necesaria es exclusiva de entornos de investigación y carece de alternativas viables para su aplicación en la industria. Por consiguiente, se vuelve esencial realizar una adaptación progresiva de las metodologías propuestas, partiendo de entornos controlados y empleando equipos de producción intermedios como transición hacia una implementación extensiva.

En plataformas piloto, se evalúan las líneas de producción propuestas mediante el consumo moderado de materias primas y energía, ofreciendo una simulación muy cercana a la realidad de los procesos industriales sin requerir así el derroche de materiales necesarios en procesos de envergadura. Sin embargo, el proceso de escalado hacia esta etapa piloto no suele ser lineal, existiendo potencialmente una disminución en la efectividad del proceso probado a pequeña escala, o bien, aunque con menor frecuencia, los resultados esperados pueden potenciarse exponencialmente.

Aunque optimizar las condiciones intermedias del desarrollo de un prototipo proporciona una base sólida para su implementación en la industria, los desafíos que surgen al trabajar con volúmenes de producción correspondientes a esta escala pueden revelar nuevos retos difíciles de visualizar en etapas anteriores. La coordinación y los medios de producción necesarios para el manejo de estas nuevas cantidades de materias primas, su almacenamiento y sus derivados, así como la correcta interconexión de nuevas líneas de proceso, representan algunos de los desafíos más complejos en este nuevo ámbito.

En este contexto y en concordancia con el desarrollo presentado en el **Capítulo 2** de este trabajo, donde se optimizó la técnica escalable MSAT para la generación del extracto e-Vitis, y posteriormente se evaluó en la alimentación animal en el capítulo 3, se procede ahora a su introducción en un caso de estudio industrial para la generación del extracto a gran escala. Este trabajo presenta un informe industrial realizado en la empresa i-Grape Laboratory como parte del programa de "Doctorado Industrial". De esta manera, se exponen, por un lado, los análisis de optimización a escala piloto del proceso extractivo para la obtención de e-Vitis a través de diseños experimentales de superficie de respuesta, obteniendo zonas óptimas de producción. Por otra parte, una vez validado el proceso, se procede a la transferencia de los resultados a una nueva escala, lo que implica consideraciones como el dimensionamiento de una nueva planta industrial y la definición de nuevas líneas de desarrollo, como la implementación de un nuevo prototipo de extracto sólido. Así, esta recopilación del trabajo realizado en i-Grape se presenta como la culminación de la aplicación práctica de todos los ensayos evaluados en este trabajo doctoral.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Caso de Estudio: i-Grape Laboratory

Los procesos extractivos de este trabajo se enmarcaron en 4 pilares principales comprendidos por la conceptualización, análisis, optimización y aplicación. En la conceptualización se proponen como origen de los extractos bioactivos tanto fuentes renovables desatendidas como subproductos de orígenes agroalimentarios. En el análisis se procede a evaluar las capacidades y a conocer el perfil característico de la matriz de estudio que luego será explotada en un tercer paso de optimización. La optimización comprende tanto el ajuste de los parámetros operacionales a escala laboratorio, como la inducción a procesos de escalado mediante la técnica de mediana escala MSAT. Y como último pilar, la aplicación de los extractos generados en productos finales evaluando su capacidad de integración y de enriquecimiento de las capacidades funcionales, así como el análisis del impacto final del consumo o uso de estas marices enriquecidas. En sí, estas 4 etapas son aplicadas de manera general en la validación de un prototipo, que, de mostrar su validez, es introducido en las líneas de fabricación.

En este capítulo se presenta la generación de un proceso piloto para la obtención del extracto e-Vitis evaluado en el capítulo anterior, desde su elaboración en equipos de transferencia, hasta su adecuación en etapas industriales. Así, son analizadas las diferentes tecnologías implicadas en el manejo de una elevada cantidad de subproductos vitivinícolas, los retos enfrentados en la extracción de una materia prima estacional, así como la generación de un extracto sólido adaptable a las diferentes aplicaciones del mercado industrial.

4.1. ANTECEDENTES

i-Grape Laboratory para el inicio de este trabajo contaba con una capacidad de procesamiento de subproductos de 10 kg/día, con un sistema de producción establecido representado en la **Figura 1.** Así, el proceso consta de dos etapas principales: un primer bloque comprendidos por las entradas de subproductos de la industria agroalimentaria, un medio dispersante que realiza la labor de fragmentar la estructura de las matrices a extraer, y una tercera entrada comprendida por los disolventes extractivos. En el segundo bloque, el proceso productivo, se muestran 4 etapas principales: triturado (1.2), mezclado de disolvente (3.2), mezclado de sólidos (4) y maceración y posterior extracción (5). Todas estas etapas respondían la demanda de producción mencionada, siendo un proceso sencillo con tecnologías pre-piloto, adecuando tanto equipos de utilidades pensadas para un marco de laboratorio como pequeños equipos manuales de procesamiento de la industria agroalimentaria que dieran respuesta a todas las etapas. Como producto final se obtiene un extracto líquido limpio, debido al filtrado inherente en la columna extractiva del proceso patentado MSAT.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

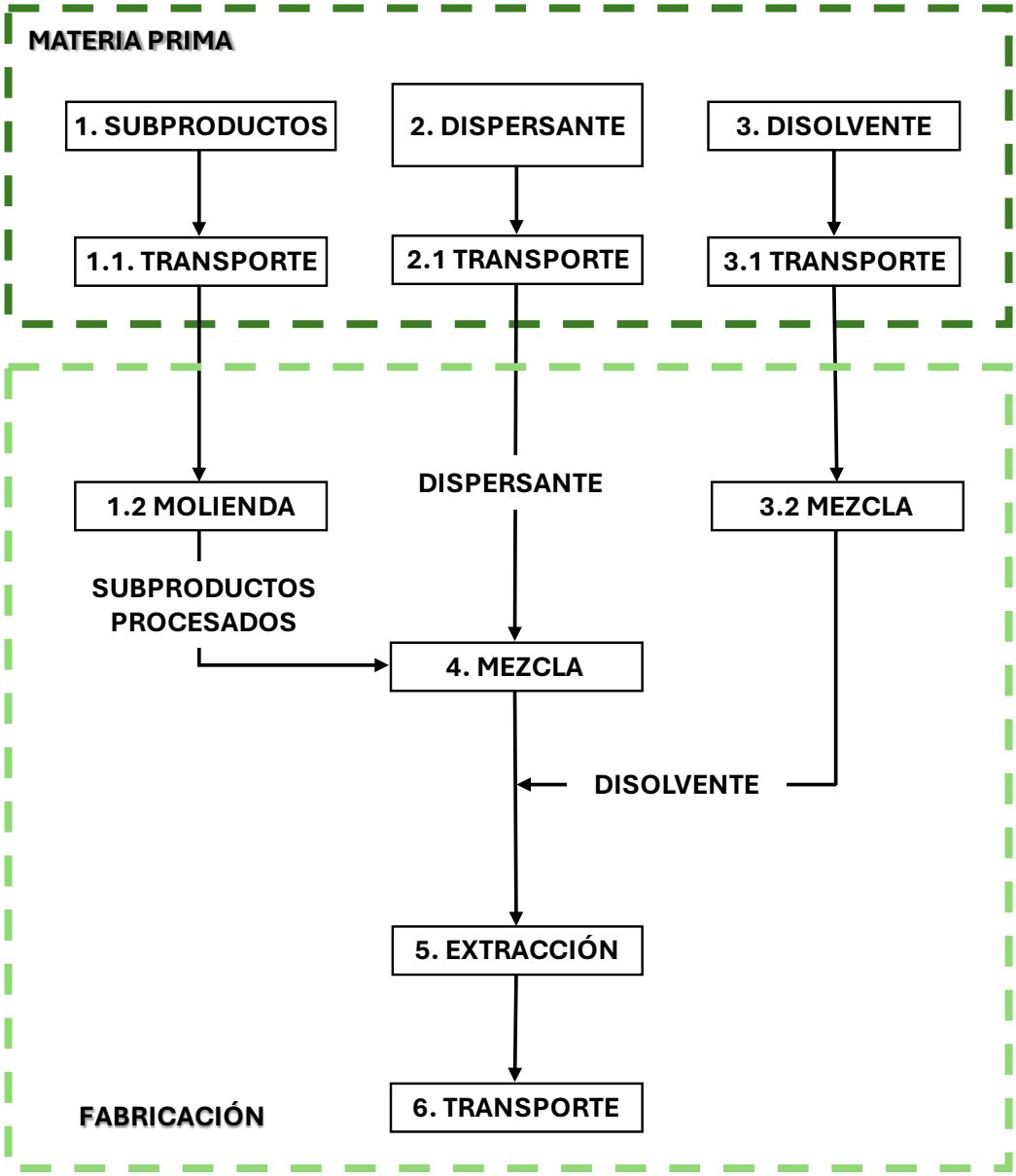


Figura 1 Sistema de producción de i-Grape Laboratory S.L.

El sistema de producción de i-Grape en el año 2021 fue propuesto y galardonado como el eje central de un proyecto de ámbito europeo denominado NeoGiANT, perteneciente al Programa Horizon 2020-Investigación y Desarrollo de la Unión Europea No. 101036768. El objetivo de NeoGiANT se basa en el desarrollo conjunto de productos funcionales (piensos para animales, productos de tratamiento, diluyentes de esperma) capaces de disminuir el uso de antibióticos en animales de granja y sustituir los conservantes sintéticos tradicionales. Estos productos serían desarrollados con la incorporación del extracto bioactivo e-Vitis producido por i-Grape. Al mismo tiempo, debido a la amplitud del proyecto, se espera que e-Vitis presente actividad funcional en diversos ámbitos, tales como enriquecer las dietas de los animales de granja, mejorar su salud a través de terapias complementarias, y modular los procesos de degradación en muestras de semen para la reproducción animal (**Figura 2**). Así, es reafirmada la concepción del extracto como *tailor-made*, donde el conjunto de parámetros que modifican las funcionalidades y aplicaciones de los extractos en el proceso patentado MSAT son seleccionados para la potenciación hacia un determinado fin.

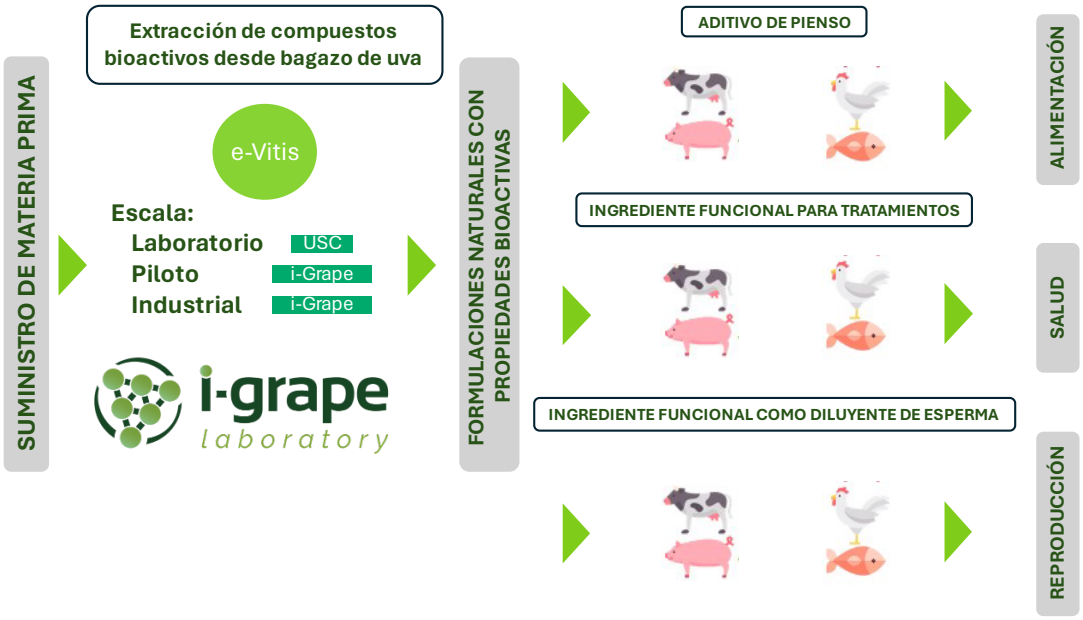


Figura 2 Concepto general de las actuaciones de i-Grape y de la Universidad de Santiago de Compostela (USC) en el proyecto NeoGiANT.

La generación de nuevos ensayos con e-Vitis para la expansión de las aplicaciones de este extracto funcional, exigieron nuevos mecanismos de elaboración derivando en el aumento de las capacidades productivas para un mayor volumen de extracto final, como modificaciones en su conformación, principalmente en el medio líquido donde es contenido, para su adaptabilidad en diferentes piensos o formulaciones, necesitando disolventes de viscosidades y volatilidades variadas, como un producto sólido.

4.2. Ensayos preliminares

4.2.1. Ausencia de compuestos no deseados

Para garantizar la seguridad de la materia prima de partida, y, por tanto, de los extractos obtenidos posteriormente, se realizó un análisis de los posibles residuos de fungicidas que pudiera contener el bagazo de uva NeoGiANT, para confirmar que están por debajo de los límites legales. Estos límites seleccionados se corresponden a los establecidos para la uva y no para el bagazo, ya que no existen regulaciones vigentes sobre el contenidos de funguicidas en los residuos vitivinícolas. A su vez, se entiende que el fruto sin procesar posee un contenido más concentrado de estos compuestos. Así, la materia prima se sometió a una metodología analítica previamente validada por el grupo de investigación donde es desarrollado este trabajo (Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Soluciones Analíticas, LIDSA). El bagazo de uva se extrajo con acetato de etilo y se analizó mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS). Los 17 fungicidas seleccionados son los más utilizados en los viñedos. La concentración detectada, expresada en ng/g (peso seco) se muestra en la **Tabla 1**. Los valores obtenidos se compararon con los límites máximos establecidos por la legislación de la UE para la uva de vinificación, garantizándose la seguridad del subproducto de vinificación utilizado.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1 Fungicidas objetivo, número CAS, concentración (ng/g) encontrada en la materia prima y límite máximo en uvas establecidos por el Reglamento Europeo*

Fungicida	CAS	Concentración (ng/g)	Límite Máximo en uvas (ng/g)*
Metalaxil	57837-19-1	34 ± 6	1000
Ciprodinil	121552-61-2	1760 ± 169	3000
Tolilfluanida	731-27-1	ND	20
Procimidona	32809-16-8	ND	10
Folpet	133-07-3	ND	20000
Fludioxonil	131341-86-1	377 ± 67	4000
Kresoxim-metilo	143390-89-0	ND	1500
Iprovalicarb (E+Z)	140923-17-7	740 ± 102	2000
Miclobutanil	88671-89-0	65 ± 9	1500
Trifloxistrobina	141517-21-7	104 ± 33	3000
Benalaxil	71626-11-4	ND	300
Fenhexamida	126833-17-8	4629 ± 1552	15000
Tebuconazol	80443-41-0	215 ± 47	1000
Piraclostrobina	175013-18-0	68 ± 27	2000
Azoxistrobina	131860-33-8	ND	3000
Dimetomorfo (E+Z)	113210-97-2	2046 ± 347	3000

ND: no detectado.

*EU Base de datos de pesticidas (v2.2). Disponible: https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/active-substances/?event=search.as.

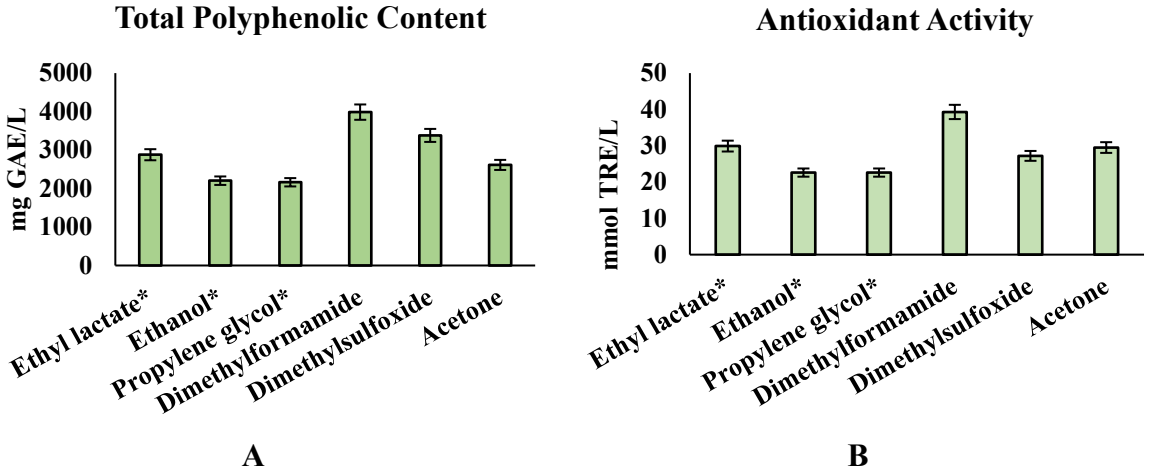
4.2.2. Selección de disolventes

La versatilidad del proceso productivo de i-Grape comprende principalmente el conjunto de variables que pueden ser modificadas para la mejora de las capacidades funcionales de los extractos generados, así como potenciar un grupo de actividades particulares de un extracto en específico. Estos parámetros como tiempo extractivo, disolvente, volumen de extracto, material dispersivo, masa de materia prima, entre otros; son analizados para el extracto de bagazo de uva blanca en la **Capítulo 3. Apartado 3.2.1** en los procesos de optimización de la extracción MSAT. En este contexto, para la elaboración del extracto e-Vitis fueron testados los disolventes ya mostrados: lactato de etilo, etanol, propilenglicol y agua; añadiendo además un disolvente GRAS a baja concentración como la acetona, así como el contraste con disolventes altamente reactivos y con mostrada toxicidad como dimetilformamida y dimetilsulfóxido (**Figura 3**).

Figura 3 Primeros extractos obtenidos a escala pre-piloto para los disolventes orgánicos ensayados y sus proporciones en las mezclas hidroorgánicas.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los ensayos preliminares fueron desarrollados en una escala pre-piloto abordada por i-Grape y destinada a la evaluación de sus extractos, utilizando cantidades másicas de 20 g y volúmenes extractivos de 50 mL. Como criterios de evaluación fueron tomados para los extractos sus índices polifenólicos totales, así como su actividad antioxidante (**Figura 4**).



A **B**

Figura 4 Índice polifenólico total (A) y actividad antioxidantes (B) para los ensayos preliminares de extractos obtenidos con diversos disolventes en escala pre-piloto. *Mezcla hidroalcohólica al 50 %.

Dentro de los disolventes analizados de la categoría GRAS, el lactato de etilo junto con la acetona muestra los índices bioactivos de mayor nivel, presentando un TPC de 2879 y 2614 mgGAE/L y una AA de 29,9 y 29,5 mmolTRE/L, respectivamente. De esta manera fue seleccionado el lactato de etilo en su mezcla acuosa isovolumétrica como disolvente extractivo en una primera optimización de extracción piloto.

4.3. Optimización a escala piloto

La escalabilidad de los procesos representa uno de los mayores desafíos en la implementación de nuevas técnicas o prototipos en el sector industrial. La capacidad de reproducir los resultados obtenidos en el marco del laboratorio en una escala mayor, manteniendo la viabilidad de los procesos, se erige como una de las principales barreras en el camino hacia la aplicación práctica de estos prototipos. En este contexto, como paso inicial hacia la producción de extractos a nivel industrial, se lleva a cabo la optimización del proceso extractivo a escala piloto, ajustando los parámetros experimentales más críticos que influyen en la eficacia de la extracción.

Como se detalló en el diseño de optimización a escala de laboratorio (**Capítulo 3, Apartado 3.2.1**), la masa de la muestra y el volumen del disolvente se identifican como los factores más influyentes en la modificación del contenido bioactivo del extracto final. Por consiguiente, se seleccionaron estos dos factores como prioritarios en el diseño, utilizando herramientas estadísticas de diseño de experimentos, y empleando una mezcla hidroalcohólica de lactato de etilo/agua (50:50, v/v) como disolvente de trabajo. Los niveles investigados para cada parámetro se detallan en la **Tabla 2**.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2 Optimización de los parámetros y niveles de extracción.

Factores	Bajo	Alto
Bagazo de uva (kg)	3	8
Volumen Extractivo (L)	2	10

Se llevó a cabo un estudio para evaluar el juego de valores masa/volumen que generan las mayores bioactividades en el extracto. Para ello, se realizó un diseño matricial de superficie central compuesta, utilizando como respuesta los índices TPC y AA. La matriz de diseño comprendió 15 ensayos extractivos, a partir de los cuales se obtuvo la superficie de respuesta para los 2 parámetros estudiados, tal como se ilustra en la **Figura 5**. En el análisis estadístico se identificaron dos condiciones óptimas, donde se alcanzaron los valores más altos de TPC y AA: 1) utilizando 3 kg de bagazo de uva y 2 L de disolvente, y 2) empleando 8 kg de bagazo de uva y 10 L de disolvente. La presencia de dos zonas de condiciones óptimas resulta especialmente útil, ya que permite generar diferentes cantidades volumétricas adaptándose a las capacidades de producción sin comprometer la calidad de los extractos.

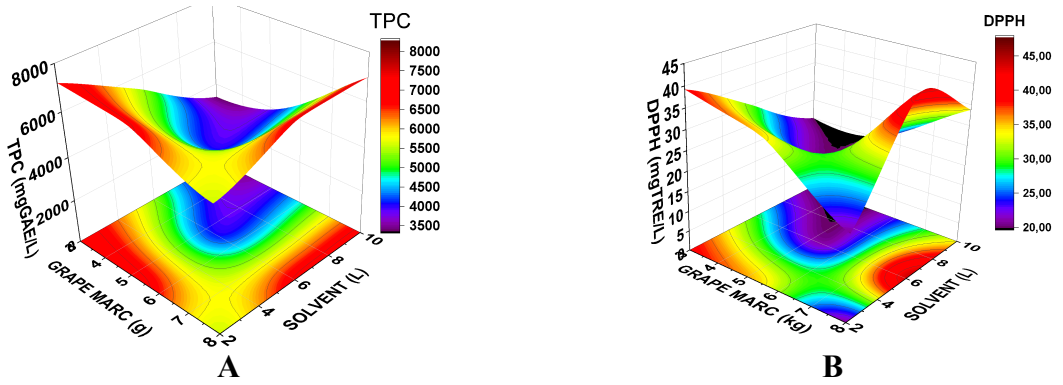


Figura 5 Gráficos de superficie de respuesta del diseño de optimización a escala piloto del extracto e-Vitis en función de los índices A) TPC y B) AA.

Con los valores óptimos obtenidos en la escala piloto, se llevaron a cabo diversas propuestas extractivas que implicaban modificaciones en los disolventes extractivos y en las proporciones de las mezclas hidroalcohólicas. Como resultado, se desarrollaron cuatro prototipos de extractos e-Vitis. Se comparó su desempeño bioactivo mediante los índices TPC y AA, tanto cuando se obtuvieron en condiciones operacionales de laboratorio como con el nuevo diseño piloto. Como se ilustra en la **Figura 6**, se observó una mayor bioactividad en el escalado, con valores generalmente duplicados en comparación con los ensayos a escala laboratorio.

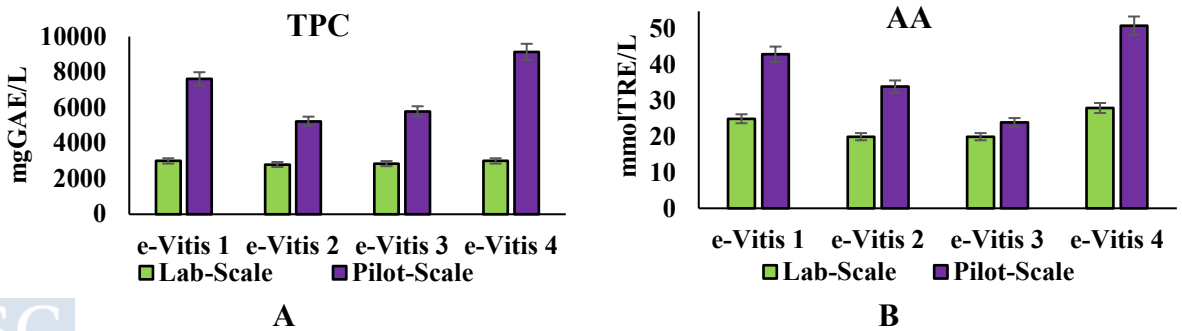


Figura 6 Comparación entre extractos a escala laboratorio frente al punto óptimo de la escala piloto del extracto e-Vitis en función a los índices A) TPC y B) AA.

4.4. PROYECCIÓN A LA PLATAFORMA INDUSTRIAL

Luego de atravesar una primera etapa de análisis a nivel laboratorio, y un primer escalado en una producción piloto, las mejoras funcionales del extracto cuantificadas a mayores volúmenes de producción dieron el paso a su introducción en un nivel industrial. Como se presentó en el apartado anterior, la producción piloto para la obtención de los extractos e-Vitis involucraba volúmenes no mayores a los 10 L por lote, así como un consumo de materias primas máximo de 10 kg/día. En esta nueva etapa se contempla la adecuación del proceso productivo a un ritmo de producción de 100 L/día mediante el incremento en todas las líneas de proceso (**Figura 1**), desde la obtención de las materias primas, hasta la gestión de almacenamiento de dichos volúmenes extractivos.

4.5. PREVISIÓN DE MATERIA PRIMA

El primer reto para abordar corresponde al aseguramiento del suministro de la materia prima estacional. El bagazo de la uva fresco es generado en los periodos de vendimia con una duración de 2 a 3 meses por año. A su vez, para dar respuesta a la producción inicial, eran requeridas cantidades másicas de 2 a 3 toneladas de bagazo de uva blanca por año. En contraste, el nuevo escalamiento estipulado supone cantidades de 20 a 30 toneladas de materia prima. En este contexto, el bagazo debe ser suministrado, transportado y almacenado en volúmenes manejables que permitan su posterior distribución en cámaras de conservación, sin la necesidad de disponer de todo el material conjunto, sino seccionado. Así, se seleccionan en una primera fase 20 toneladas de bagazo de la bodega de O Salnés "Mar de Frades", dividido en 80 contenedores alimentarios (**Figura 7**) y transportado desde las bodegas hasta las cámaras de almacenaje de i-Grape.

Figura 7 Recogida y transporte del bagazo de uva blanca albariño.

4.6. ALMACENAMIENTO DE MATERIA PRIMA

Así, el bagazo, ya exprimido y despalillado debe ser almacenado en congelación (-20ºC) para asegurar su estabilidad y disponibilidad hasta un nuevo periodo de vendimia o lo que es lo mismo, durante 12 meses. Inicialmente los procesos exigían requerimientos en el consumo de bagazo de uva blanca cercanos a los 2500 kg, los cuales comprendían un espacio de almacenamiento de 8 m^3. Este volumen, representa un cubículo estándar de dimensiones 2x2x2 m, y una energía para su congelación en un tiempo que asegure la calidad de la materia prima de 6 kW. A su vez, la nueva meta de escalado requiere un total de 20000 kg de materia prima representando un volumen cercano a los 80 m^3. Este espacio representa a su vez unas dimensiones cercanas a un tanque cisterna estándar o a un contenedor industrial de 2x12x3 m, como una energía de congelación cercana a los 60 kW. De acuerdo con las necesidades, el espacio fue optimizado en una camara de congelación de 8.5x8.5x3.4 m (**Figura 8**), así como

la energía de congelación, introduciendo el bagazo de forma inicial en un túnel de congelado bajando súbitamente su temperatura en un plazo de 24 h hasta los -20ºC con una energía requerida de 115 kW, y luego una energía de mantenimiento de 6 kW proporcionado por la cámara propuesta.

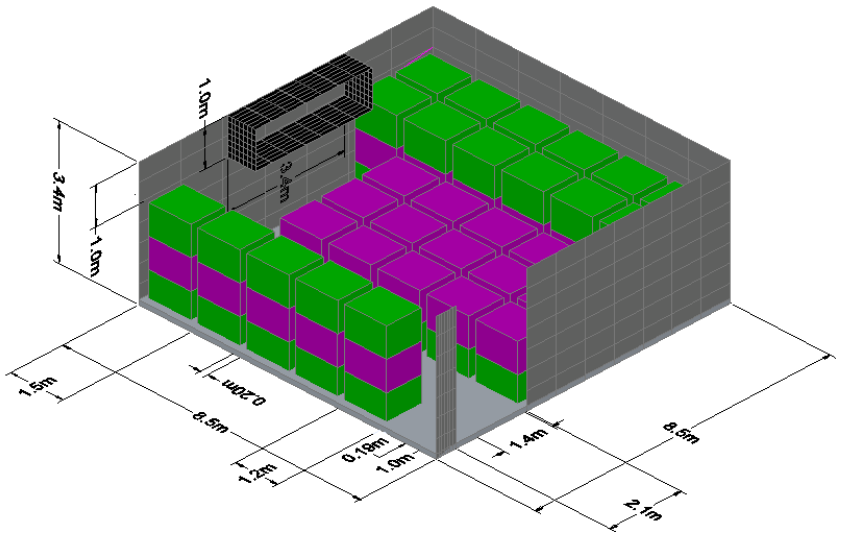


Figura 8 Diseño de cámara de congelación del bagazo de uva blanca.

4.7. ESCALADO DEL PROCESO PRODUCTIVO

El espacio destinado por i-Grape para la gestión de su producción inicial constaba de un laboratorio piloto de 50 m^2, constituido por una unidad de molienda por lotes de los subproductos procesados con capacidades de 5 kg/h, un mezclador de sólidos de capacidades de 10 kg de materia de mezclado con la necesidad de asistencia por el operario, procesos de mezclado de disolvente manual y columnas extractivas de 25 L. Así, se propone la adecuación del proceso productivo a un nuevo proyecto de planta industrial de 1000 m^2, que contemple todas las etapas del diseño básico requerido por i-Grape, así como la posibilidad de incluir nuevas líneas de proceso. La propuesta exige un proceso integral que incorpore el análisis de las líneas de entrada (materias primas) como de todas las etapas de producción y productor final (laboratorios de calidad). Así los equipos deben ajustarse a una producción inicial de 100 L/h. De esta manera, como se muestra en la **Figura 9**, se genera una propuesta de distribución de las líneas de proceso y desarrollo de i-Grape.

El diseño presentado contempla la integraciónde todas las líneas productivas, dividiendo en 4 principales espacios, el almacén de materias primas, los laboratorios, la zona de producción y el almacén de producto terminado. Así tambien, se procura la limitación del proceso productivo mediante zonas SAS (*Sterile Access System*), garantizando la seguridad durante el ingreso y despacho de materiales en una zona determinada como blanca para la generación de extractos con un uso alimentario/farmacéutico.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

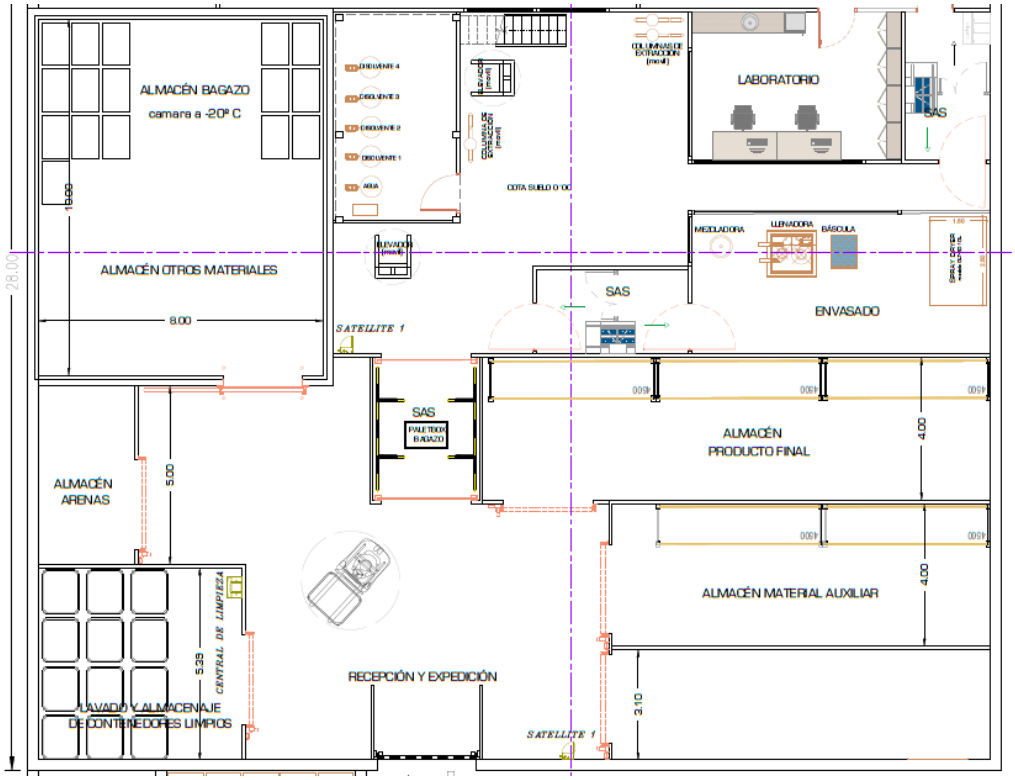


Figura 9 Diseño de planta industrial para la adecuación de los procesos productivos de i-Grape en un área de 1000 m^2.

En relación con el esquema productivo, se define en base a la nueva meta de producción un sistema semicontinuo como el representado en la **Figura 10**. Así en la línea principal, la materia prima es disruptada mediante un equipo continuo de triturado de capacidad de procesamiento de 1000 kg/h, que a su vez alimenta a un tambor rotario automatico en trabajo por lotes de 30 kg. Para la introducción de disolventes como las mezclas hidroorganicas se introduce un sistema de generación de agua desmineralizada, y un sistema de mezclado automatico y dosificación de disolventes. En la columna vertebral del proceso, se equipa la planta con 12 columnas extractivas de 50 L con capacidad de producción de 200 L/día, que desembocan en un equipo homogeneizador para el posterior envasado de e-Vitis.

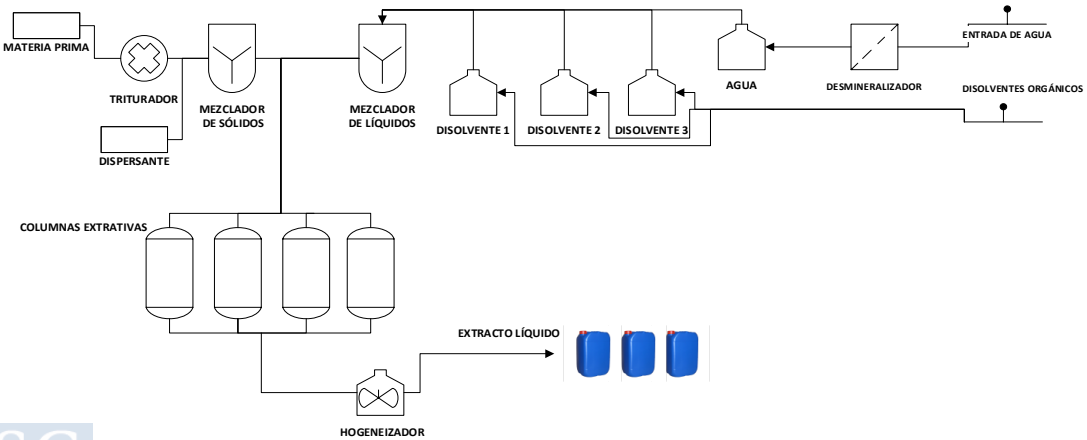


Figura 10 Esquema productivo de la planta industrial de i-Grape.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Este nuevo esquema de producción fue implementado de manera gradual al comienzo de esta propuesta de escalado, iniciando en el año 2022 y manteniéndose hasta la presentación de este trabajo. La adecuación de los equipos y la expansión de las líneas de producción a esta nueva escala han permitido aumentar la producción de i-Grape de 10 L/día y el procesamiento de materias primas cercano a los 200 kg/año, hasta lograr un crecimiento del 1100 % para la generación de 120 L/día y el procesamiento de más de 1 ton/año de subproductos (**Figura 11**).

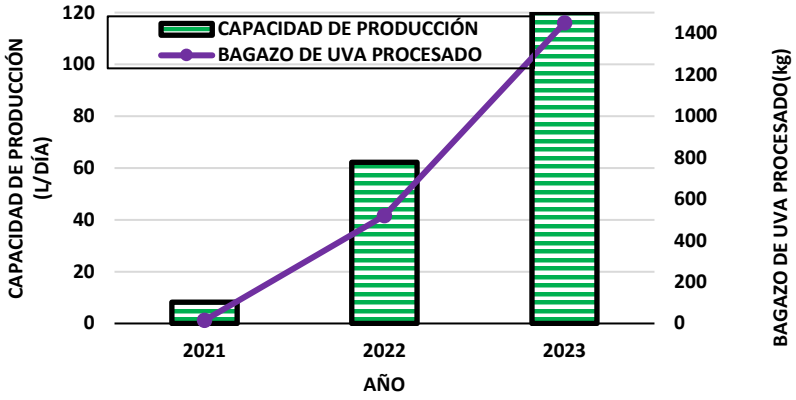


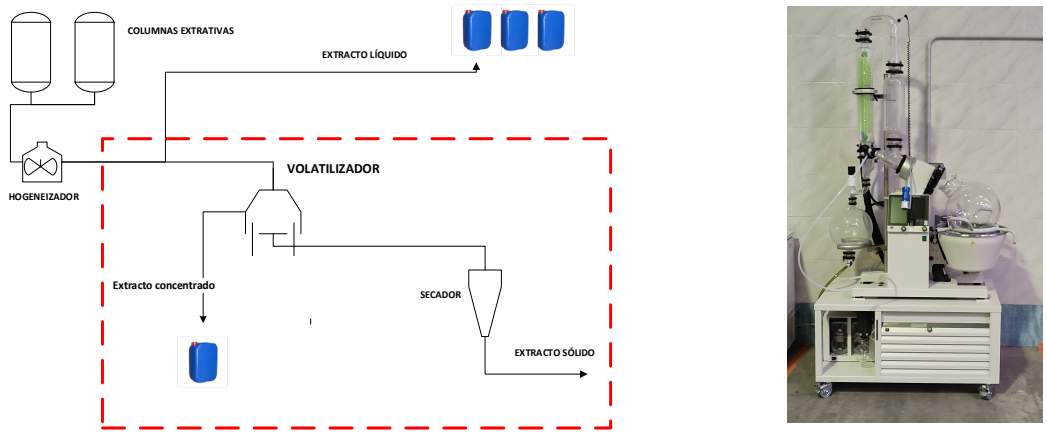
Figura 11 Crecimiento productivo y de procesamiento en el desarrollo del escalado entre los años 2021 y 2023.

4.8. DESARROLLO DE UN PROTOTIPO SÓLIDO

Uno de los principales retos en la propuesta de la generación a escala industrial de e-Vitis, es la adecuación del extracto a un mercado de productos sólidos. Diversas aplicaciones requieren extractos bioactivos de elevadas funcionalidades, pero en un formato granulado y peletizable. Esto deriva en la introducción de una nueva línea de producción hacia la eliminación de los disolvente extractivos y la generación de este producto sólido. Dentro de los principales equipos industriales en el campo alimentario para la generación de sólidos a partir de fluidos se encuentran los equipos de secado por aspersión y los liofilizadores. Los equipos liofilizadores mediante la sublimación de los disolventes presentes en los medios líquidos previamente congelados eliminan todo el contenido líquido a través de presiones de alto vacío y temperatura menores a los 0ºC. Debido a las bajas temperaturas, el proceso se muestra de bajo impacto en la degradación de los compuestos contenidos en el fluido a tratar. Por otro lado, la energía necesaria para llevar a cabo estos procesos, como los habitáculos limitados donde son depositados los medios líquidos en el proceso en lotes, vuelven compleja la técnica a grandes escalas. Por otro lado, los secadores mediante aspersión funcionan mediante el secado de gotículas del material líquido mediante diferentes dispositivos de boquillas dispersivas generando un spray al cual le es extraído todo el contenido líquido mediante la aplicación de elevadas temperaturas en tiempos rápidos. Estos procesos poseen la versatilidad del trabajo en continuo, procesando cualquier rango de flujo industrial en tiempos relativamente cortos. En contraste, deben ser optimizadas las temperaturas de secado para evitar la degradación de los compuestos contenidos en los medios líquidos.

La eliminación del contenido líquido en los extractos tanto por liofilización como por aspersión, en procesos industriales, conlleva una adecuación del material a secar. Este requiere determinadas concentraciones de contenido sólido, así como contemplar disolventes compatibles capaces de sublimar a temperaturas asumibles de proceso, como no mayores a la

potencial degradación del material. Así, previo a la obtención del producto sólido se establece una etapa de preconcentración. Esta nueva fase del proceso elimina previamente los disolventes extractivos dejando solo un medio acuoso de fácil secado por ambas metodologías. Como se muestra en la **Figura 12** esta nueva adaptación del proceso también brinda la posibilidad de generar un extracto líquido concentrado, que da la versatilidad de transportar mayores concentraciones de contenido bioactivo en un menor espacio, así como ampliar el rango de dosificación.



(A) (B)

Figura 12 Plano de proceso productivo (A) con la inclusión del equipo volatilizador (B).

Como paso posterior a la preconcentración del extracto, se evaluaron equipos de secado por aspersión y liofilizadores (**Figura 13**). Ambos procesos se optimizaron mediante la modificación de los vehículos utilizados para lograr la obtención de un sólido particulado. Se experimentó con diferentes relaciones de excipientes, incluyendo maltodextrina, goma xantana y goma arábiga. En este contexto, la versatilidad del secado por aspersión para el procesamiento continuo de flujos superiores a los 10 L/h, junto con un rendimiento de conversión de líquido a sólido del 83 % (830 g de producto por 1 kg de contenido sólido), fueron factores determinantes en su elección para la línea de producción final.

(A) (B)

Figura 13 Métodos de secado empleados para la obtención del extracto e-Vitis sólido. A: Secado por aspersión B:Secado mediante liofilización.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

V. DISCUSIÓN GENERAL

"En un análisis químico estaba siguiendo la marcha de cationes, me importa más la marcha de los hombres"
Alí Primera

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Fruto de un proyecto académico-industrial, la visión presentada en esta tesis doctoral propuso la integración del estudio analítico de diversas matrices de orígenes agroindustriales y acuícolas, y su aplicación en procesos productivos. La estructura aplicada a cada materia prima siguió tres etapas comunes, encabezado por el análisis profundo revelando no solo las capacidades funcionales de cada subproducto o matriz sino avanzando en el conocimiento de los compuestos o sinergias responsables de estas actividades. Como segundo bloque, el estudio de diversas técnicas extractivas seleccionadas de forma idónea para la obtención de extractos con el mayor reaprovechamiento del contenido bioactivo en la matriz original, aunado a proyecciones de escalabilidad de estos procesos en un balance entre efectividad y factibilidad. En una tercera etapa, los enfoques analíticos e industriales son implementados con una mayor correlación en la aplicación de los extractos generados. Esta última, implica el procesamiento de elevados volúmenes de materia prima, como el uso de diversas tecnologías enfocadas a la integración de los extractos generados en los productos finales. Simultáneamente, es realizado el control continuo de la prevalencia del efecto bioactivo en las diversas etapas de producción, abordando su uso y efecto, brindando no solo una potencial solución en el reaprovechamiento y revalorización de los recursos aquí tratados, sino una clara demostración de la factibilidad en los procesos de elaboración y consumo.

Como punto de partida es seleccionada una doble vertiente definida por la revalorización de subproductos del sector agroalimentario representado por el material orgánico remanente de los procesos de vinificación, así como el aprovechamiento de los recursos naturales acuícolas procedentes de cultivos biotecnológicos y especies endémicas, enfocado en la utilización de biomasa obtenida de macro y microalgas. Esta heterogeneidad entre los diferentes orígenes de las materias primas escogidas se desvanece entre los diversos puntos de convergencia que las unen. Por un lado, la capacidad de estas matrices de generar un amplio abanico de fitoquímicos, encabezados por metabolitos secundarios con intensas bioactividades, tales como polifenoles, carotenos, alfa y beta ácidos, terpenoides y derivados.

Como otro aspecto en común, estos dos grandes grupos en las últimas décadas se han mostrado como fuentes prometedoras de recursos nutricionales abordando la problemática generada por el agotamiento acelerado de los recursos naturales, unido al impacto generado en nuestro ecosistema por el uso de fuentes no renovables. Así, la reintroducción de un subproducto en la cadena de producción como el bagazo de la uva, el cual representa más del 30 % del material desperdiciado en una de las actividades principales en la industria agroalimentaria muestra un claro aporte eliminando un potencial residuo y reaprovechando las funcionalidades contenidas en este. En contraparte, por un lado, las microalgas se muestran como un recurso de alto rendimiento por unidad de superficie con la capacidad de ser cultivadas en suelos deficientes (bajo contenido de nutrientes esenciales) o en ausencia de ellos, utilizando agua no potable, del alto contenido en salinidad y alcalinidad; permiten un uso eficiente de los recursos hídricos, sin comprometer el destinado para el consumo. Por otro lado, las de mayor tamaño, las macroalgas, compartiendo varias de las capacidades de adaptación que las microalgas aunadas a la capacidad de generar metabolitos secundarios de mayor complejidad, como cadenas fenólicas de mayor tamaño, surge como una de las fuentes más prometedoras de ingredientes y compuestos bioactivos para nuevos productos alimentarios.

En consonancia, subproductos agroindustriales como fuentes acuícolas no solo presentaron un atractivo arsenal bioquímico sino también un importante reto en la aplicación de procesos extractivos capaces de liberar este potencial. Tanto ensayos de laboratorio como procesos piloto

USC
DE COMPOSTELA

muestran como punto crucial los procesos de preparación de la muestra o materia prima y su posterior extracción. Desde un primer enfoque analítico las extracciones implementadas en este trabajo fueron analizadas en miras de procesos escalables y cónsonos con el fin nutraceútico de los extractos generados. Así, se emplearon diversas técnicas de extracción analítica comunes como maceraciones simples, extracción asistida por ultrasonidos, medios disruptores mecánicos y dispersión de matriz en fase sólida. Como puente de anclaje entre los resultados originados en escala de estudio analítico y procesos piloto fue aplicada la técnica patentada de temperatura ambiente de mediana escala, crucial en la predicción de los parámetros operacionales que luego serían incorporados en escalas industriales.

Los disolventes extractivos se mostraron como otro elemento clave en cada etapa, por un lado, la selección de estos extractantes que permitirán la máxima recuperación de compuestos bioactivos como que mantuvieran la integridad de estos en el tiempo, así como su aplicabilidad en fines alimenticios, farmacéuticos y nutraceúticos. De esta manera, en los diferentes trabajos abordados se genera un banco de datos de las diversas afinidades de familias polifenólicas, carotenoides, lípidos, azucares, ácidos orgánicos y diversos pigmentos, hacia disolventes comunes de toxicidad aparente o elevada como metanol, acetato de etilo, metil-terbutil eter, contra disolventes de aplicación alimentaria definidos como GRAS con mayores limitaciones como la acetona, o de amplio uso como etanol, lactato de etilo, propilenglicol y agua.

Como desafío final, los enfoques analítico e industrial, tanto en el ámbito agroalimentario como acuícola, aunque convergentes, precisan de diversos mecanismos de cuantificación de los extractos obtenidos en diversas escalas y matrices. Las fuentes acuícolas analizadas se caracterizaron por compuestos de baja polaridad, como carotenoides de elevada masa molecular y coloración, así como analitos pequeños y carentes de grupos cromóforos, como los ácidos grasos. En contraste, las familias polifenólicas, ácidos orgánicos y azúcares presentes en los residuos agroindustriales exhibieron un perfil de gran polaridad y concentración. Por otro lado, las extracciones analíticas, enfocadas en la miniaturización y el análisis profundo del perfil bioactivo de los extractos, exigen una mayor precisión a la requerida en los procesos industriales de alto volumen y mayor heterogeneidad. Esto condujo a la implementación de diversas técnicas de análisis, abarcando desde índices espectrofotométricos hasta métodos más especializados, como cromatografía líquida y de gases acoplada a espectrometría de masas, espectrometría de masas en tándem y métodos de detección de alta resolución como QTOF.

Como resultado de todo lo abordado, esta sección presenta una breve discusión de los resultados obtenidos en cada capítulo, ofreciendo una visión integral desde el análisis hasta la aplicación mediante la comparación de los diversos estudios realizados. Asimismo, esta recopilación busca resaltar los aspectos más interesantes a través de una mirada crítica derivada de la realización de estos ensayos.

5.1. MÉTODOS VERDES DE EXTRACCIÓN A MATRICES DE ORIGEN ACUÍCOLAS

5.1.1. Microalgas

Es propuesta por primera vez la aplicación de una técnica sencilla, de bajo requerimientos energéticos y consumo de disolventes como es la MSPD para la extracción global de compuestos bioactivos a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. Así, la MSPD involucra dos simples etapas, una fase inicial de disrupción a través de la abrasión con un

USC DE COMPOSTELA

dispersante particulado y un segundo proceso de elución y filtración incorporado en la misma etapa. Como dispersante en los diversos análisis se implementó dióxido de silicio o arena lavada, usando así materiales no solo biodegradables sino existentes en los medios donde es obtenida la materia prima. De forma análoga, la técnica permite la modificación de diversos medios disruptores aplicando procesos desecantes como sulfatos, u otros particulados como tierra de diatomeas, aplicando como disruptor un derivado de las propias algas.

H. pluvialis, la microalga de la astaxantina, ha sido ampliamente explotada para la extracción de este único carotenoide. En concordancia, los métodos analíticos de cuantificación se enfocan primordialmente en la detección de sus compuestos carotenoides, valiéndose de sus cromóforos siendo la detección con detectores de arreglo de diodos la más aplicada. Por otro lado, su capacidad para la generación de cadenas lipídicas propone otra metodología de caracterización, cuantificando estos compuestos grasos mediante la esterificación de compuestos como ácidos oleico, linoleico y linolénico mediante cromatografía de gases de baja resolución. A su vez, técnicas de alta resolución para la determinación untargeted se enfocan principalmente en el análisis metabolómico en el campo biomédico, desarrollo de medicamentos y en análisis toxicológico. En este trabajo se propone una aplicación en el campo de los fitoquímicos de la metodología de alta resolución QTOF a los extractos generados vía MSPD desde *H. pluvialis*. Así, mediante la adaptación de algoritmos de cálculos metabolómicos enfocados al análisis de rutas metabólicas, bibliotecas espectrales como MassBank of North America (MoNA), MassBank data base y diversos softwares enfocados al análisis no dirigido se realiza el análisis de los extractos bioactivos de *H. pluvialis*.

Debido a la naturaleza hidrofóbica de los principales compuestos de interés contenidos en *H. pluvialis* la aplicación de agua como extractante no es un protocolo común, así es incierto el perfil polar de los potenciales compuestos contenido en la microalga. Así fue realizado el análisis comparativo de diversos disolventes GRAS como lactato de etilo, etanol y sus respectivas relaciones hidroorgánicas, así como agua como único extractante en combinación con cromatografía de alta resolución a modo de exploración de potenciales compuestos polares no caracterizados en la microalga. Así, la combinación de un disolvente inusual en la extracción esta microalga, con una técnica poco abarcada en este campo otorgó la identificación de nuevas cadenas lipídicas en la microalga (ácido N -oxopalmítico, ácido N -hidroxipalmítico y ácido 10-fenildecanoico).

Uno de los retos que se deben enfrentar en la obtención de compuestos carotenoides a partir de *H. pluvialis* radica en la extrema sensibilidad de estos. Ligeras modificaciones en la temperatura o exposición a fuentes de radiación modifican la estabilidad de los carotenos y xantofilas disminuyendo sus efectos bioactivos. Así la extracción en seco del polvo liofilizado de microalga favorece la generación de calor en los procesos de disrupción mecánicos. Así, son añadidos diversos disolventes que además de mejorar el proceso extractivo disipan la generación de calor. Por otro lado, resulta contradictorio el secado de la microalga, una de las etapas de mayor impacto económico por la elevada energía necesaria para la eliminación del agua contenida, para su posterior hidratación previa a la extracción. Esto, aunado a un proceso de ruptura de las cadenas esterificadas de carotenoides en busca de una astaxantina pura que antagónicamente presenta mayor inestabilidad que su forma esterificada. Así en una segunda aproximación se propone por primera vez a la extracción directa de la pasta de microalga mediante MSPD, aprovechando más del 70 % de su contenido en agua. De la misma forma se apuesta por el contenido global de la microalga, incluyendo ácidos grasos y carotenoides

USC DE COMPOSTELA

esterificados, generando un extracto de mayor estabilidad y con la presencia de compuestos de polaridades diversas gracias a la combinación del agua contenida en conjunto con disolventes GRAS.

La extracción húmeda de *H. pluvialis* presentó un nuevo reto, enmarcado por su elevado contenido de agua el cual podría resultar un obstáculo en la extracción de compuestos apolares, así como potenciales inconvenientes operacionales en el proceso extractivo de la MSPD. En contraste, de poder ser aplicada, se estaría ante una metodología de aplicación directa de recuperación tanto de compuestos carotenoides como ácidos grasos, sin preparación previa de la muestra, sin aislamiento de compuestos y sin etapas de filtrado y purificación. Así se establece un nuevo diseño operacional para la optimización de los parámetros extractivos de esta nueva matriz húmeda y validando su aplicación mediante el análisis comparativo de métodos de referencia.

La aplicación de la metodología tradicional tanto en la recuperación de ácidos grasos como en los compuestos carotenoides tuvo que ser adaptada mediante la integración de un disruptor celular, ya que la aplicación directa no generaba una extracción efectiva debido a las características ya expuestas de la pared celular de *H. pluvialis*. Así ambas metodologías se basan en procesos secuenciales de maceración, disrupción y lavados sucesivos, separando la fase polar de la hidrofóbica. La aplicación de una elevada cantidad de disolvente en las diferentes etapas secuenciales diluye excesivamente los analitos de interés, obligando a una etapa de volatilización y reconstitución en un volumen menor. En contraste la aplicación MSPD-DAD y MSPD-QTOF permitió el análisis conjunto de carotenoides y ácidos grasos en solo dos etapas de (disrupción y extracción), obteniendo recuperaciones superiores a los métodos de referencia. Así se generaba una metodología rápida y sencilla para la determinación de los principales compuestos contenidos en *H. pluvialis* eliminando el secado de la microalga, la purificación de los analitos, la saponificación de las cadenas esterificadas, el uso de disruptores celulares, la implementación de disolventes tóxicos de elevada reactividad, lavados secuenciales volatilización y reconstitución del extracto final.

H. pluvialis es conocida por su elevada capacidad antioxidante, así como por mostrar una elevada respuesta cuando es analizada mediante la técnica de Folin-Ciocalteu, empleada para la determinación de compuestos fenólicos totales. En contraste, son escasos los ensayos que muestran un perfil fenólico individual de *H. pluvialis,* así como abundantes los ensayos de determinación de su actividad antioxidante a través de la metodología del radical difenilo DPPH. Como es expuesto en el apartado 9.2 de este trabajo, la metodología de Folin-Ciocalteu da una idea global del contenido en fenólicos, el cual puede verse afectado por sustancias interferentes, como potencialmente los compuestos carotenoides, ácidos orgánicos y azucares contenidos en *H. pluvialis* . Así se lleva a cabo un análisis profundo del contenido polifenólico de la microalga mediante el análisis untargeted, destacando 4 compuestos fenólicos. Es importante resaltar que la capacidad de las algas para generar compuestos fenólicos era debatida hace un par de décadas, donde estructuras polifenólicas en organismos unicelulares como las microalgas se creían inexistentes. Por primera vez para *H. pluvialis* en fase roja se muestra la concentración de su compuesto fenólico principal, el floroglucinol, así como compuestos fenólicos de la clase C_6-C_n. Aún más resaltante, se determinó la capacidad de la microalga de generar compuestos polifenólicos destacando concentraciones importantes del flavonoide catequina.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En relación con la capacidad antioxidante de los extractos derivados de *H. pluvialis*, se constataron resultados ambiguos como tendencias erróneas en una de las metodologías más aplicadas a la determinación de la actividad antioxidante de la microalga como lo es el análisis de DPPH, que reveló ser una metodología no apta para la cuantificación de la actividad de estos extractos. Mediante el análisis del perfil espectrofotométrico se reveló una clara interferencia de estos compuestos en la banda de absorción del reactivo DPPH desestimando la aplicación de esta metodología en extractos bioactivos de *H. pluvialis* y proponiendo otras cuantificaciones colorimétricas de la actividad antioxidante como la metodología ABTS.

5.1.2.Macroalgas

Partiendo del conocimiento previo en los procesos extractivos y caracterización de fitoquímicos empleados en algas menores, se aplica está heurística en un conjunto de macroalgas poco estudiadas de la zona central del mar Adriático. El estudio albergó 5 especies de macroalgas comprendida por una alga roja coralina y cuatro algas pardas. La extracción típica de estas matrices se basa en disolventes con gran capacidad de solubilización de los analitos de interés y extracción asistida por ultrasonidos. Por consiguiente, se propone un proceso comparativo entre la técnica común (UAE) y una nueva aplicación de la MSPD a estas especies. Así también se contrastan disolventes comunes como el metanol o como la mezcla hidroalcohólica GRAS etanol/agua. Dentro de los aspectos más resaltantes de este trabajo se muestran por primera vez contenidos de polifenoles globales para gran parte de estas especies, así como referir el valor de TPC tanto a su forma de extracto líquido como a su contenido en peso seco de la microalga. Si bien puede considerarse redundante la presentación de estos datos en más de una forma, así como ser común la inclusión de algunas de estas conversiones como información suplementaria en las investigaciones, uno de los principales inconvenientes a la hora de cuantificar de forma correlativa la capacidad antioxidante o polifenólica de una matriz es la diversidad de equivalencias, refiriendo estas actividades en función al material seco, extracto o contenido seco en los extractos, así como de múltiples patrones de referencia. En consecuencia, a lo largo de los diversos ensayos presentados en este estudio, se mantuvo una coherencia en la presentación de las actividades, utilizando los mismos patrones de referencia y representándolos tanto en el contenido extractivo como en el contenido de la matriz.

Otro aspecto fundamental en el estudio comparativo de las técnicas fue la medición de la capacidad extractiva en función de las bioactividades resultantes y de los perfiles individuales, como de la aplicación de una herramienta de cuantificación de su sustentabilidad. Así mediante un algoritmo basado en los 12 principios de la Química Verde, analizando aspectos como cantidades de disolvente incorporados, residuos generados, conversión materia prima/extracto, se analizó el "verdor" de los extractos generados por UAE y los generados por MSPD. Este análisis se cumplimentó con un diseño de extracciones secuenciales para los métodos testados, con el objetivo de determinar la fracción volumétricas que proveyera la mayor recuperacion de los analitos de interés. De igual manera que en el caso de las microalgas, la MSPD se mostró como una técnica versátil, con un mayor poder disruptivos, usando menor cantidad de disolvente para obtener una mayor recuperación bioactiva lo que la posicionó en un valor superior en la escala de verdor en contraste a la técnica UAE.

Finalmente, la detección de 15 compuestos polifenólicos, siendo principalmente no flavonoides derivados del ácido hidroxibenzoico como flavonoides glucósidos de quercetina, brindaron por primera vez para la mayoría de estas especies de macroalga una respuesta a sus

USC DE COMPOSTELA

capacidades bioactivas como una primera aproximación al perfil analítico de estas algas resilientes del Adriático.

5.2. MÉTODOS VERDES DE EXTRACCIÓN A MATRICES AGROINDUSTRIALES

La generación de extractos naturales mediante un enfoque integral no solo proporciona una ventaja bioactiva a través del efecto sinérgico de los compuestos que lo componen, sino que también añade una mayor complejidad al entender estas reacciones y potenciar sus efectos deseados. La extracción y aislamiento de compuestos individuales, en contraste a su elevado coste y generalmente de acción única, se muestra como un camino lineal y fácil de comprender, donde una mayor concentración se traduce en una mayor respuesta. Simultáneamente, el foco del mercado de nutraceúticos individuales ha generado un banco de estudios analíticos enfocados a la actividad de un analito específico. De la misma manera, la demanda hacia productos sólidos de fácil envasado y de mínimos requerimientos de espacio, limitan el conocimiento hacia extractos líquidos multicomponentes. Análogo a lo detallado en el apartado anterior, en relación con el secado de las microalgas y posterior hidratación, la mayoría de estos productos bioactivos particulados, son rediluidos y generalmente administrados de forma conjunta, en busca de una mayor biodisponibilidad a través de un medio líquido como el efecto sinérgico previamente existente y posteriormente seccionado.

En este contexto, presentar las ventajas de un extracto global, que incorpora la acción conjunta de diferentes familias de componentes y que no muestra una respuesta lineal en la concentración de sus compuestos individuales en relación con su actividad funcional, suele ser complejo de internalizar. Aunado a esto, mecanismos analíticos de extracción y análisis tienden a basarse en el estudio fraccionado y aislamiento de familias de compuestos, mostrando las acciones de los perfiles individuales. Además, los índices de medición globales que buscan la cuantificación de la acción de todos los componentes que integran una muestra, son referidos a un único compuesto base, que de forma general se muestra como un enfoque potente, pero que en ocasiones se aleja del efecto real.

De esta manera, se propone el análisis de una matriz rica en diversos fitoquímicos encabezados por compuestos fenólicos como lo es el bagazo de la uva. Así se abarca un análisis más allá de la medición de sus índices bioactivos y respuestas de componentes individuales, sino también un entrecruzamiento de estos dos mecanismos de análisis demostrando como variaciones singulares desencadenan efectos globales de magnitud superior a la esperada. Para este ensayo es aplicado un método patentado de extracción que posee como características principales bajos requerimientos energéticos y condiciones suaves de proceso denominado sistema a temperatura ambiente de escala mediana, MSAT. De manera inicial, se procede a la adaptación de la técnica con la matriz de estudio, a través de un diseño estadístico de 23 extracciones, optimizando los índices bioactivos contenido polifenólico total y actividad antioxidante y disminuyendo la utilización de disolvente y materia prima. La aplicación de la técnica no arrojó una zona de optimización delimitada, sino una extensión de bioactividad máxima que se incrementaba a mayores relaciones másica de bagazo sin mostrar un tope. Esto mostraba un claro indicio de su aplicabilidad a mayores escalas esperando una bioactividad mayor.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

En miras de la posterior aplicabilidad de los extractos derivados del bagazo de la uva blanca en un campo alimentario, fueron testados diferentes disolventes categoría GRAS como el

propilenglicol, etanol, lactato de etilo y agua. Cabe resaltar que el lactato de etilo es de escasa aplicación previa en la obtención de extractos naturales, debido a su inicial elevado coste siendo generado por fermentación de biomasa vegetal de etanol y ácido láctico. En la última década, el desarrollo tecnológico en los procesos de fermentación ha disminuido el impacto económico de su producción mostrándose como un disolvente seguro y biodegradable.

El estudio comparativo reveló al lactato de etilo, en una mezcla isovolumétrica acuosa, como un extractante idóneo para las mayorías de las cadenas fenólicas, así como mostrar la mayor capacidad de inhibición de radicales libres y contenido polifenólico total. A su vez, la aplicabilidad de un extracto líquido dentro de sus principales limitaciones en contraparte de un formato sólido, se debe a su estabilidad. Formulaciones sólidas, con un contenido de agua inferior a 5 % almacenadas en medios inertes o en ausencia de oxígeno suelen ser la opción común para el aseguramiento de la actividad en el tiempo. En contraste, las cadenas fenólicas de elevada actividad antioxidante en un medio protector ofrecido por el vehículo extractivo se mostraban con un potencial extracto de gran estabilidad. De esta forma, se analiza el tiempo de vida del extracto de bagazo de uva a diferentes condiciones de almacenamiento como temperatura, eliminación de oxígeno reactivo y luz; observando una prevalencia de los parámetros bioactivos a dichas variables. Esto otorgaba un extracto estable y de fácil almacenado con un elevado potencial bioactivo. Un análisis más detallado mediante cromatografía líquida con detector de triple cuadrupolo MS/MS reveló interacciones relevantes en el perfil polifenólico individual. Los índices TPC y AA se mantenían estables mostrando un incremento anómalo en el TPC en la segunda semana de estudio sin verse modificada así su actividad antioxidante. De la mano, se revelaba una ligera disminución de la actividad antioxidante en las etapas finales del primer mes de análisis. Por otro lado, la concentración de 11 marcadores fenólicos seleccionas mostraban variaciones significativas desde el segundo día de análisis, decreciendo algunas cadenas de gran tamaño e incrementando otros monómeros de polifenoles. Por un lado, estos resultados mostraban la clara variación entre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante generada, esto debido a la formación de cadenas menos reactivas que equilibraban el contenido total con una actividad menor. En otra banda, el seguimiento profundo de más de 24 puntos de análisis por más de 60 días reveló un extracto vivo, de interacciones en sus cadenas fenólicas que mantuvieron sus propiedades bioactivas a lo largo del periodo de análisis.

5.3. APLICACIONES DE LOS EXTRACTOS BIOACTIVOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

5.3.1. Aplicaciones de extractos acuícolas

En consonancia con todo el abordaje global y métodos extractivos optimizados y analizados en busca de una aplicación factible de la microalga *H. pluvialis*, se propuso un enfoque novedoso mediante la aplicación de la pasta húmeda de la microalga como una fuente de coloración y mejora de las propiedades reológicas, nutricionales y funcionales de los alimentos. Dentro de los principales retos de este trabajo se encontraba la definición de la matriz de aplicación, ya que la misma debía incluir elementos base de diferentes alimentos para abordar de manera amplia su aplicación en diversos ámbitos. A su vez , este estudio fruto de la colaboración internacional de grupos de investigación del norte de la península ibérica, debía integrar un alimento consumido en esta región y que la intensa coloración rojiza dada por *H. pluvialis* tuviese la aceptación de un potencial consumidor. Así fue establecida la "*filloa*", un alimento típico de esta zona consumido tanto como un alimento base como postre, el cual

USC DE COMPOSTELA

combina ingredientes básicos de la industria alimentaria y que de manera original presentaba una fuerte coloración rojiza obtenida a través de fuente animal.

De esta forma, se evaluó la aplicación de la pasta de microalga húmeda de *H. pluvialis* a filloas, mediante análisis nutricionales y organolépticos de las muestras enriquecidas, así como un enfoque analítico en el estudio de compuestos bioactivos comprendidos principalmente por cadenas lipídicas de ácidos grasos esenciales y carotenoides brindadas por la microalga al alimento. Así también, dando respuesta al enfoque global propuesto, se analizó la capacidad de la batería de analitos contenidos en *H. pluvialis* para ralentizar los procesos de degradación de los alimentos. Este estudio de 9 días de análisis, manteniendo el alimento en condiciones ambientales, incorporó un enfoque reológico analizando las modificaciones en la textura del alimento, otro colorimétrico evaluando la perduración del color generado por los compuestos carotenoides y una visión microbiológica, analizando la formación de patógenos y la potencial inhibición de *H. pluvialis* hacia estos microorganismos de degradación.

Un aspecto para destacar son las condiciones de cultivo de *H. pluvialis.* Debido a que la línea de proceso aplicada para la explotación de esta microalga consta de una etapa de secado, como liofilización o secado mediante spray, el contenido biológico de potenciales patógenos contenidos en las agua de cultivo o en los equipos donde es contenida de forma general no están enfocados a un uso alimentario, ya que el la eliminación del agua contenida como procesos de refinación posterior se encargan de suprimir la carga patogénica a niveles de consumo. Esto quedó evidenciado en ensayos preliminares donde la pasta húmeda de *H. pluvialis* presentaba niveles patogénicos ligeramente superiores a los permitidos en aplicaciones alimentarias. Así, se realizó un proceso de esterilización a alta presión y temperatura moderada que eliminara microorganismos no deseados, a la par de preservar el contenido de agua en la pasta. Además, como etapa preliminar no exhibida en este estudio, se realizó un análisis visual análogo al presentado en el capítulo 1.1.1, para comprobar la integridad de las células de la microalga. Dicha etapa no generó ninguna modificación aparente en la membrana celular, más si disminuyó los niveles patogénicos hasta umbrales aceptados para su aplicación en la fuente alimentaria.

Como herramientas de aseguramiento de la calidad de las metodologías analíticas aplicadas para la cuantificación de los compuestos bioactivos de las muestras enriquecidas, fueron utilizados subrogados para la determinación de la eficiencia extractiva y patrones internos para corregir potenciales variaciones en la detección. Esto planteó un nuevo reto por la naturaleza heterogénea de las muestras, que, por un lado, los ingredientes alimentarios presentaron una amplia cantidad de compuestos grasos, y por otro, *H. pluvialis* aportó otra amplia gama de estos y una extensa familia de compuestos carotenoides. Así la selección de dos compuestos (subrogado y patrón interno) no contenidos en la muestra presentó una mayor complejidad. Se empleó un patrón interno común en el estudio de cadenas grasas, el nonadecanoico, y uno no tan común en el campo de los carotenoides, el alfa tocoferol. Como subrogados fueron aplicados los mismos compuestos esterificados con el grupo acetato, lo que los convertía en cadenas de menor polaridad distinguiendo su separación cromatográfica.

Técnicas de separación y análisis como HPLC-DAD y GC-MS fueron las implementadas para cuantificar el contenido bioactivo en las muestras. Como marco de referencia para evaluar la calidad en la capacidad de coloración de *H. pluvialis* fue comparado con una mezcla de colorantes sintéticos comerciales, ajustado su dosificación hasta lograr la tonalidad brindada

USC DE COMPOSTELA

por la microalga. El estudio analítico mostró una efectiva transmisión de los compuestos carotenoides, principalmente formas esterificadas de astaxantina como de cadenas grasas principalmente de grupos omega-3 y omega-6, en contraste a un aditivo sintético que no aportó ningún efecto nutricional.

En función a los perfiles de estabilidad, se mostró esta aplicación comercial directa de la pasta de microalga como un preservante de la calidad de los alimentos, modulando los procesos de degradación que alteraban la forma, dureza y palatabilidad del alimento, además de la disminución del crecimiento de población bacteriana. Esta aplicación se mostró como una clara alternativa a los aditivos sintéticos comerciales, englobando diversas funcionalidades y eliminando procesos de procesado de la microalga que tornan en una mejor factibilidad.

5.3.2.Aplicaciones de extractos agroindustriales

La utilización de subproductos derivados de la industria agroalimentaria como recurso en la alimentación animal no constituye un paradigma nuevo, sino más bien una práctica arraigada y esencial en la gestión de recursos agrícolas. Sin embargo, resulta innovador el enfoque hacia las funciones específicas que estos subproductos desempeñan en el bienestar animal, así como la exploración de procesos para la óptima extracción y aprovechamiento de los nutrientes y bioactivos inherentes a los mismos. Las políticas vigentes se orientan hacia la mejora de la salud de los animales destinados al consumo humano, no solo como medida para garantizar la calidad de los productos derivados, sino también con el propósito de mitigar la utilización excesiva de tratamientos basados primordialmente en antibióticos para contrarrestar enfermedades en el ganado. Entre las repercusiones más significativas de la aplicación indiscriminada de antibióticos figura la resistencia antimicrobiana (RAM), caracterizada por la pérdida de eficacia de estos agentes farmacológicos ante patógenos que desarrollan mutaciones como respuesta a la presión selectiva ejercida por dichos fármacos. En este contexto, se busca mejorar la calidad de la alimentación animal mediante la explotación de subproductos con una concentración notable de compuestos bioactivos. Estos no solo contribuyen a preservar la salud del ganado, previniendo la incidencia de enfermedades, sino que también exhiben diversas actividades funcionales, lo que se traduce en una reducción de la dependencia de los antibióticos en la producción animal.

Uno de los principales desafíos en la integración de subproductos en la dieta animal como fuente de bioactivos funcionales es la cuantificación del impacto real generado por estos compuestos. En tanto que una considerable porción de los procedimientos dirigidos a la incorporación de subproductos en la alimentación de animales de granja se enfoca en incrementar la masa corporal de dichos animales con el fin de potenciar la rentabilidad, dicho aumento se evalúa de manera elemental mediante la medición del peso corporal. Por el contrario, las modificaciones en los procesos metabólicos asociados con la microbiota intestinal del animal presentan una cuantificación más compleja. Esto se debe tanto a la sutileza de estos cambios, que a menudo se sitúan por debajo del umbral de detección de muchos equipos comunes de monitorización del estado de los animales, como a las metodologías aplicadas para la obtención de estos marcadores, que deben hacer frente a diversas variaciones en el formato y características de las muestras biológicas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Este trabajo propone una aplicación de las funcionalidades obtenidas del extracto derivado del bagazo de uva blanca a través de la metodología MSAT mostrada en el Capítulo 2,

subapartado 2.1, hacia un enfoque industrial, expandiendo no solo los volúmenes de producción del extracto "e-Vitis", sino también su concentración bioactiva. Este e-Vitis, principalmente rico en cadenas fenólicas es añadido como suplemento alimenticio a la dieta de cerdos de engorde, basada en una mezcla estándar compuesta por derivados de soja, maíz y remolacha. Se evalúa así el efecto funcional sobre un grupo de cerdos alimentados con pienso enriquecido con e-Vitis en contraste con un grupo de cerdos control alimentados con la dieta estándar. El enfoque del trabajo se centra en la monitorización del recorrido de los compuestos bioactivos, principalmente las cadenas fenólicas, desde la ingesta del alimento hasta su tránsito por todas las partes que componen el aparato digestivo y excretor.

Para abordar los desafíos mencionados en la evaluación del impacto generado por estos compuestos bioactivos de subproductos agroindustriales, se propone una novedosa aplicación de la técnica extractiva MSPD a las diferentes muestras biológicas del tracto digestivo de los cerdos, incluyendo contenido gástrico, duodeno, íleon, yeyuno y colon, así como de la excreta (heces y orina). De esta manera, la MSPD se revela como una poderosa herramienta capaz de extraer el contenido bioactivo tanto de muestras líquidas como semisólidas, en etapas sencillas y sin necesidad de reconcentración y filtrado posterior, reduciendo las posibles pérdidas ocasionadas por las diversas etapas de los métodos extractivos aplicados a este tipo de muestras. Como mecanismo de detección de los efectos resultantes inducidos por la administración del pienso e-Vitis se emplea la espectrometría de alta resolución mediante cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a un detector cuadrupolar de tiempo de vuelo (QTOF). Así, el par MSPD-UHPLC-QTOF procesó 40 muestras, generando 200 espectros que permitieron abordar la tarea de evaluar el impacto del e-Vitis sobre la función gastrointestinal de los cerdos de engorde.

Como tercer pilar fundamental en este estudio de aplicación, se incluyó el procesamiento del banco de datos generado a partir de los diferentes cerdos de estudio y control, detectando más de 4000 analitos. Se desarrolló así un estudio metabolómico basado en aplicar las herramientas descritas en los capítulos 1.1 y 1.2 de este trabajo, generando un algoritmo sólido de identificación, complementado con bases de datos espectrales y diversos programas de tratamiento de datos metabolómicos. De este modo, se obtuvo una distribución de los datos aplicando modelos estadísticos, que permitió identificar un total de 25 trazadores en el alimento enriquecido con e-Vitis, así como 220 biomarcadores adicionales a lo largo del tracto digestivo de los cerdos alimentados con el pienso enriquecido.

Este análisis pionero en la aplicación MSPD-UHPLC-QTOF en muestras biológicas de origen animal con compuestos bioactivos y sus metaboltitos como objetivo, junto con un análisis sistemático global que abarca todo el aparato digestivo, reveló una gran variedad de procesos de bioconversión metabólica. Como efecto principal, se observó una acción protectora de los compuestos fenólicos contenidos en el e-Vitis hacia los ácidos biliares, relacionados a su vez con efectos protectores sobre la microbiota y actividades antiinflamatorias, así como una reducción en los niveles de colesterol, promoviendo una mayor biodisponibilidad de estos ácidos en etapas posteriores del sistema gástrico, en zonas inferiores con baja concentración de estos compuestos.

De la misma forma, se evidenció una potenciación de los procesos asociados al microbioma intestinal, resultado en un efecto probiótico, determinado por la detección de un elevado

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

conjunto de marcadores asociados al metabolismo bacteriano del aparato digestivo como aminoácidos y ácidos orgánicos.

5.4. ESCALADO INDUSTRIAL DE LOS EXTRACTOS BIOACTIVOS

A pesar del entrelazamiento existente entre el ámbito académico y el industrial, cada sector conserva ciertos criterios, estándares y medios de producción que no siempre son fáciles de conciliar. Un desarrollo adecuado y secuencial de una idea o propuesta, desde su concepción hasta su validación, aplicación y reproducción, constituye uno de los pilares que puede asegurar su aceptación final. En este sentido, tanto los métodos de análisis utilizados en el ámbito industrial han alcanzado un alto grado de desarrollo, equiparándose a los niveles de análisis típicos de un laboratorio, como también los equipos de laboratorio convencionales han fortalecido su robustez para adaptarse a los procesos de escalamiento.

En este contexto, se abordó la optimización de un proceso a escala piloto para la generación de e-Vitis, el extracto derivado del bagazo de la uva, que fue previamente obtenido y caracterizado en el Capítulo 2, utilizando la técnica escalable MSAT. Aprovechando el conocimiento interno de la empresa i-Grape Laboratory en el desarrollo de extractos bioactivos y su tecnología para la generación de estos extractos, se diseñó un experimento modificando las variables críticas en la metodología extractiva establecidas en el estudio anterior.

Como primer paso, se evaluó la eficacia de cuatro disolventes de categoría GRAS, así como sus combinaciones, contrastándolos con disolventes tóxicos de elevada capacidad extractiva. Este proceso condujo a la obtención de un extracto apto para aplicaciones nutracéuticas, con elevados índices bioactivos.

En cuanto a la optimización del modelo piloto de extracción, se empleó un diseño de superficie de respuesta para identificar dos rangos óptimos de relaciones másicas y disolventes extractivos. Estos rangos permitieron generar volúmenes diversos del extracto, manteniendo la actividad polifenólica y antioxidante. Este diseño se evaluó utilizando la gama completa de disolventes GRAS en las relaciones establecidas por i-Grape, lo que resultó en una mejora significativa de los índices bioactivos, duplicando la bioactividad observada en la escala de laboratorio.

Los resultados obtenidos impulsaron la continuación del proceso piloto a una nueva escala, lo cual requirió una nueva definición de las líneas de proceso de i-Grape hacia un proceso semicontinuo, tratando de adecuar los procesos en lotes establecido hacia tecnologías de mayor autonomía e interconexión. Así se desarrolló un proyecto de planta, contemplando el aseguramiento de los nuevos y elevados volúmenes de materias primas, y un nuevo diseño de proceso para el incremento de la capacidad productiva en un orden de magnitud. Así se diseñaron planos de ingeniería, se ubicaron las áreas de almacenamiento, producción, entradas y salidas de materias primas y productos, como el diseño de equipos capaces de dar respuesta a los nuevos volúmenes requeridos.

La aplicación de la nueva propuesta conllevó un aumento real de la capacidad de procesamiento de materia primas por parte de i-Grape, elevando 4 veces su producción en el primer año de puesta en marcha de estas modificaciones y duplicando ese valor en un segundo año. A la par del desarrollo productivo se diseñó un nuevo prototipo de extracto, para su

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

aplicación en un formato sólido. Así fueron seleccionadas dos técnicas para el secado de extractos como liofilizadores y secadores por aspersión generando un nuevo producto granulado. Esta nueva línea derivó nuevamente en una concepción revisada del proceso productivo, incorporando un equipo intermedio para la reconcentración de los extractos líquidos, disminuyendo el consumo energético aguas arriba por parte de los equipos de secado. Como resultado complementario, se obtuvo un nuevo prototipo de extracto acuoso de elevada concentración polifenólica que permite un mayor rango de dosificación como un amplio campo de aplicación.

Como punto final, es importante destacar que la tecnificación y optimización de los procesos extractivos presentados en este trabajo continúan en constante desarrollo. Estas mejoras en las líneas de proceso generan nuevas oportunidades de mercado para i-Grape, que no solo se centra en la revalorización del bagazo de la uva, sino que también explora una amplia variedad de residuos agroindustriales como recursos alimentarios infravalorados. La versatilidad de su proceso extractivo patentado permite adaptarse a todas estas matrices, lo que posibilita la creación de extractos multipropósito destinados a diversos sectores como alimentación y salud.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

VI. CONCLUSIONS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Through a combined approach between academic research and industry adaptation, the implementation of several bioactive extracts from agri-food and aquaculture sources was carried out. This included a comprehensive analysis of raw materials, adaptation of extraction methodologies, optimisation and implementation in consumer products as well as in pilot processing lines. Consequently, the proposed objectives were successfully achieved:

I.Transformation of the mono-extractive paradigm through the optimisation of integral methodologies for obtaining bioactive compounds from various aquaculture resources.

II.Optimisation of an extractive methodology for the generation of bioactive extracts from agro-industrial sources and validation of their stability.

III. Incorporation of a schematic process for the identification of compounds of interest in aquaculture and agri-food matrices using metabolomic tools.

IV. Application and validation of bioactive sources of aquaculture origin in the improvement of functional and organoleptic properties of food products.

V. Application of agro-industrial by-products extract in farm animal feed and evaluation of their preventive potential on animal welfare.

VI. Development of a pilot system for the generation of diverse bioactive extracts from agri-food sources.

The methodological development addressed in this work was extended to various fields. Comparative analyses were carried out between conventional extractive techniques, such as mechanical disruptors, ultrasound-assisted extraction, Soxhlet and ordinary macerations, and simpler and more effective techniques, like matrix solid-phase dispersion, or scalable ones, such as MSAT. Through extensive analysis, these techniques were optimised in various contexts for different matrices, volumes and applications.

In terms of instrumental means, a wide range of equipment was used, including spectrophotometers, low resolution techniques such as gas chromatography (GC) coupled to single MS mass spectrometry (quadrupole analyser), liquid chromatography (LC) coupled to MS/MS tandem mass spectrometry (triple quadrupole), and high resolution by coupling with quadrupole and time-of-flight (QTOF) analysers.

In addition, this work deepened the understanding of the interaction of several bioactive compounds, including polyphenols, lipid chains, carotenoids, proteins and different metabolites. Several phytochemicals were characterised using non-targeted identification tools, allowing the detection of new compounds in aquaculture matrices and revealing new interactions in phenolic compounds in agri-food waste.

Importantly, this work explored topics beyond the analysis of plant phytochemicals, adapting the extractive methodologies and detection methods to address a variety of biological analyses, including in vivo assessment of the functional properties of the extracts generated.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

The transfer of the knowledge generated towards final consumer products, such as the adaptation of a pilot process for the generation of the extracts studied, demonstrated the feasibility of the integration proposal and responded to the need for proper waste management and the integration of neglected renewable sources with high potential.

In recapitulation, the conclusions addressed in each section are summarised in general terms:

Chapter 1. Green Extraction Methods in Matrices of Aquaculture Origin

1.1. Microalgae

The Matrix solid-phase dispersion (MSPD) technique was shown to be highly efficient in the extraction of bioactive compounds of interest from the microalga *Haematococcus pluvialis*. This approach exhibited a better response in contrast to conventional cell disruption methods, offering higher recovery yields of key antioxidant compounds such as carotenoid and phenolic compounds, as well as essential fatty acids.

The combination of chromatographic techniques, including high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) and tandem mass analyser (LC-MS/MS), gas chromatography with mass spectrometry detector (GC-MS), and ultra-high performance liquid chromatography with quadrupole and time-of-flight (UHPLC-QTOF), enabled the comprehensive characterisation of the extracts obtained. This analysis identified a wide range of bioactive compounds, including phenolic compounds, carotenoids, fatty acids and their derivatives, and new compounds previously undescribed in *H. pluvialis*.

Extracts obtained by MSPD, especially those based on ethanol, showed an antioxidant power comparable to that of pure astaxanthin of synthetic origin. Detailed characterisation revealed the presence of phenolic compounds such as p-coumaric acid, gallic acid and phloroglucinol, whose synergistic activity gave a significant response to the total phenolic content shown by *H. pluvialis*.

The proposed extraction methodology applied directly to *H. pluvialis* wet paste, without the need for drying and selective separation processes, generated extracts with a wide range of bioactive compounds inherent to the microalgae. The results obtained point to a variety of potential industrial applications for these extracts, which could foster innovative developments in areas such as functional food, cosmetics and pharmaceuticals.

1.2. Macroalgae

The MSPD extractive technique showed a higher efficiency for obtaining bioactive compounds from macroalgae, especially polyphenolic compounds, in contrast to common ultrasound-assisted extraction (UAE) techniques. The comparative study carried out between MSPD and UAE, considered both the extractive efficiency and the energy requirements and resource consumption, evidencing MSPD as a more economical and environmentally friendly alternative, extracting a higher content of phenolic compounds using lower volumes of solvent compared to UAE.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Using LC-MS/MS, the phenolic composition of several macroalgae species was investigated. The significant presence of phenolic chains, predominantly derived from hydroxybenzoic acid, was identified in all samples tested. In addition, a comparative analysis was used to determine the composition of the most effective extractive mixture by measuring its main bioactive parameters: total polyphenolic content (TPC) and antioxidant activity (AA).

The investigation of various resilient macroalgae from the Adriatic Sea, including species such as *Dictyota dichotoma*, *Gongolaria barbata*, *Ericaria amentacea*, *Sargassum hornschuchii* and *Ellisolandia elongata*, many of which are endemic and little explored, provided a new perspective on the use of these aquaculture resources. This study allowed the identification of new phenolic compounds and contributed to establish a frame of reference regarding the overall antioxidant activity and phenolic content of these species.

Chapter 2. Green extraction methods from agro-industrial matrices

The optimisation of the medium-scale ambient temperature (MSAT) system applied to winemaking by-products revealed a range of potential extracts with diverse bioactivities inherent to the GRAS solvents applied. In turn, the robustness of the bioactive responses to the optimised operational variables allowed, through statistical modelling, the prediction of the response to scale-up proposals. This factor demonstrated the versatility of the technique for the development of pilot processes and industrial scale-up.

The stability of the extracts generated from grape marc showed a remarkable persistence of bioactive indicators, such as total polyphenolic index and antioxidant activity. These indicators remained unaltered by changes in common storage parameters, such as exposure to light and temperature variations. However, by tandem mass chromatographic analysis (MS/MS), structural modifications in some phenolic compounds of the extract were revealed. This analysis showed an equilibrium in the total phenolic content, characterised by the conversion of large phenolic chains into smaller ones with analogous activities.

Chapter 3. Applications of bioactive extracts in the food industry

3.1. Aquaculture extracts

The research showed the wet paste of the microalgae *H. pluvialis* (HPW) as a partial substitute for wheat flour in food preparation, capable of improving its nutritional profile, colour and functional properties, giving a promising potential application on an industrial scale, thanks to the elimination of the drying and pre-treatment steps of HPW.

Through the comparative study with commercial dyes, HPW revealed a long-lasting colouring with higher brightness and a significant modulation of physicochemical properties, resulting in a food with higher extensibility and integrity than that produced with its synthetic alternative. In contrast to the unique colouring effect provided by the synthetic dye, HPW at the lowest concentration evaluated provided a high content of carotenoid compounds, mainly astaxanthin, as well as a contribution of lipid chains, mainly omega-6 and omega-3 essential fatty acids.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

The stability study carried out on the HPW-enriched feed generated an inhibitory action on total aerobic mesophilic microorganisms, together with a significant decrease in water activity in the feed, thus hindering potential bacterial growth.

3.2. Agro-industrial extracts

The functional impact of incorporating an extract derived from grape marc, rich in phenolic compounds "e-Vitis", into farm animal feed was evaluated. Various biological samples from the digestive tract of fattening pigs fed with e-Vitis enriched feed (e-Vitis Feed) were successfully processed using the matrix solid-phase dispersion MSPD technique.

The combined application of MSPD and high-throughput tandem mass spectrometry (QTOF) allowed the detection of 25 tracer compounds from the enriched feed and the identification of 220 additional biomarkers differentiating between swine fed a standard diet and those fed the e-Vitis feed.

Through the protective action exhibited by phenolic compounds on bile acids in the early stages of the digestive tract, associated with reduced cellular oxidative stress, increased bioavailability of these acids in later stages was provided. Also, processes of bioconversion of phenolic chains into stimulating structures of the digestive microbiota were detected, promoting the formation of diverse carboxylic acids associated with the consumption of diets with a high phenolic load.

Chapter 4. Industrial scale-up of bioactive extracts

The proposed extraction methodologies applied to grape marc were scaled up from the laboratory to an industrial scale. MSAT was shown to be a powerful tool to evaluate the scalability of the extracts at lower volumes than those implemented at a later stage, while obtaining an accurate prediction of the bioactive performance at higher scales. The i-Grape company's basic scheme was restructured towards higher production, modifying existing equipment to more automated ones, and introducing new equipment to respond to the new process lines.

In order to respond to a new production rate, a new raw material supply process was coordinated, going from a provision of 2 to 3 tons of grape marc per year to 20 tons. New transport and storage mechanisms were established, moving 80 large containers and designing an installation that would conserve the characteristics of the raw material until new harvesting periods.

The selection of new equipment and the proposed sizing of the i-Grape base process resulted in the growth of by-product processing by 800 kg/year, generating a production flow of 120 L/day of e-Vitis extract.

Different equipment was studied for the production of a new solid extract prototype from the e-Vitis liquid extract. A new pre-concentration stage of the extract was started, giving the possibility of a solid production line, such as more concentrated liquid extracts. The spray drying method was selected, and the vehicles, including maltodextrin, xanthan and arabic gum, were optimised for the development of a particulate solid.

USC DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO I. Lista de publicaciones

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. Aly Castillo, Simón Pereira, Ana Otero, Sarah Fiol, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores. Matrix Solid-Phase Dispersion as a Greener Alternative to Obtain Bioactive Extracts from *Haematococcus pluvialis*. Characterization by UHPLC-QTOF, *RSC Advances*, 10 (2020), 27995

   DOI: 10.1039/D0RA04378H
   Índice de impacto **JCR:** 3.361 (2020)
   JCR-Q2 (2021): Chemistry, Multidisciplinary (75/179)
   Contribución: Investigación, escritura y edición.

2. Aly Castillo, Simón Pereira, Ana Otero, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores. Multicomponent Bioactive Extract from Red Stage *Haematococcus pluvialis* Wet Paste: Avoiding the Drying Step and Toxic Solvents. *Journal of Applied Phycology*, 34 (2022), 10537

   DOI: 10.1007/s10811-022-02712-3
   Índice de impacto **JCR**: 3.300 (2022)
   JCR-Q1 (2022): Marine & Freshwater Biology (12/109)
   Contribución: Investigación, escritura y edición.

3. Aly Castillo, Maria Celeiro, Marta Lores, Kristina Grgić, Marija Banožić, Igor Jerković, Stela Jokić. Bioprospecting of Targeted Phenolic Compounds of *Dictyota Dichotoma, Gongolaria Barbata, Ericaria Amentacea, Sargassum Hornschuchii* and *Ellisolandia Elongata* from the Adriatic Sea Extracted by Two Green Methods. *Marine Drugs*, 21 (2023), 27995

   DOI: 10.3390/md21020097
   Índice de impacto **JCR**: 5.4 (2023)
   JCR-Q1 (2023): Chemistry, Medicinal (13/60); Pharmacology & Pharmacy (50/278)
   Contribución: Metodología, Análisis formal, Tratamiento de datos, Investigación, Escritura y edición.

4. Aly Castillo, María Celeiro, Laura Rubio, Andrea Bañobre, Migeul Otero-Otero, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores. Optimization of Bioactives Extraction from Grape Marc via a Medium Scale Ambient Temperature System and Stability Study. *Frontiers in Nutrition*, 9 (2022), 1008457

   DOI: 10.3389/FNUT.2022.1008457
   Índice de impacto **JCR**: 5.0 (2022)
   JCR-Q2 (2022): Nutrition & Dietetics (28/88)
   Contribución: Uso de softwares y presentación de datos, Validación, Tratamiento de datos, Administración del proyecto, Metodología, Análisis formal, Investigación, Escritura y edición.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. Aly Castillo, Tiane C. Finimundy, Sandrina A. Heleno, Paula Rodrigues, Filipa A. Fernandes, Simón Pereira, Marta Lores, Lillian Barros, Carmen Garcia-Jares. The Generally Recognized as Safe (Gras) Microalgae *Haematococcus pluvialis* (Wet) as a Multifunctional Additive for Coloring and Improving the Organoleptic and Functional Properties of Food. *Food and Function*, 14 (2023), 6023

   DOI: 10.1039/D3FO01028G
   Índice de impacto **JCR**: 6.1 (2022)
   JCR-Q1 (2022): Food Science & Technology (22/142), Biochemistry & Molecular Biology (59/285)
   Contribución: Uso de softwares, Análisis formal, Investigación, Escritura y edición.

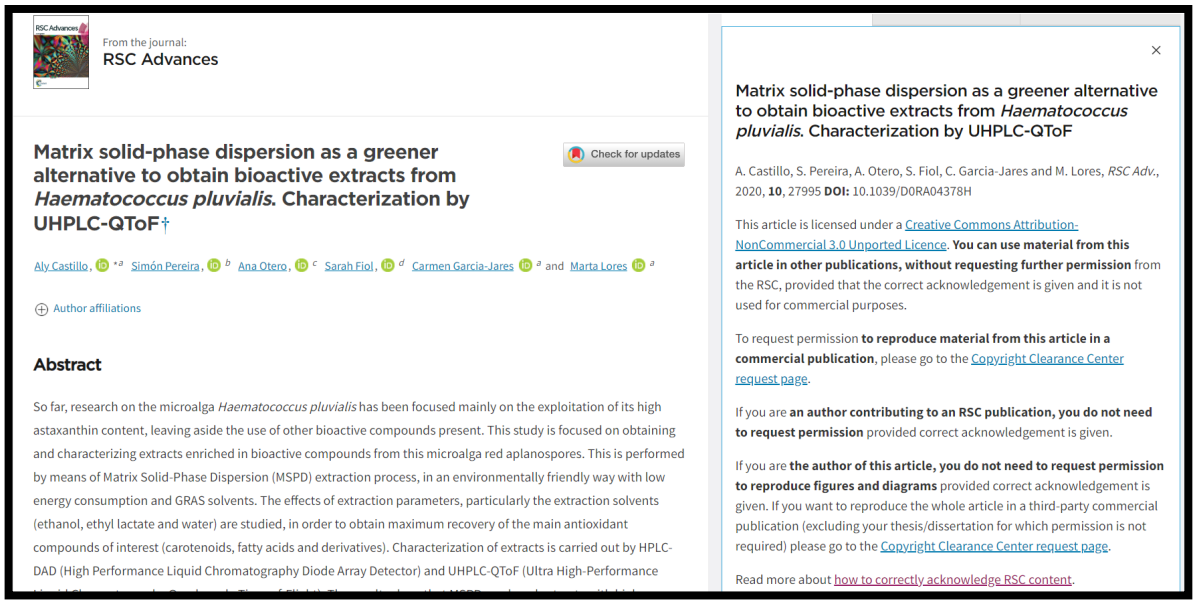
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO II. Permiso de las revistas

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. Aly Castillo, Simón Pereira, Ana Otero, Sarah Fiol, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores. Matrix Solid-Phase Dispersion as a Greener Alternative to Obtain Bioactive Extracts from *Haematococcus pluvialis*. Characterization by UHPLC-QTOF, *RSC Advances*, 10 (2020), 27995



From the journal:
RSC Advances

Matrix solid-phase dispersion as a greener alternative to obtain bioactive extracts from *Haematococcus pluvialis*. Characterization by UHPLC-QToF†

Check for updates

Aly Castillo, Simón Pereira, Ana Otero, Sarah Fiol, Carmen Garcia-Jares and Marta Lores

Author affiliations

Abstract

So far, research on the microalga *Haematococcus pluvialis* has been focused mainly on the exploitation of its high astaxanthin content, leaving aside the use of other bioactive compounds present. This study is focused on obtaining and characterizing extracts enriched in bioactive compounds from this microalga red aplanospores. This is performed by means of Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) extraction process, in an environmentally friendly way with low energy consumption and GRAS solvents. The effects of extraction parameters, particularly the extraction solvents (ethanol, ethyl lactate and water) are studied, in order to obtain maximum recovery of the main antioxidant compounds of interest (carotenoids, fatty acids and derivatives). Characterization of extracts is carried out by HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography Diode Array Detector) and UHPLC-QToF (Ultra High-Performance

Matrix solid-phase dispersion as a greener alternative to obtain bioactive extracts from *Haematococcus pluvialis*. Characterization by UHPLC-QToF

A. Castillo, S. Pereira, A. Otero, S. Fiol, C. Garcia-Jares and M. Lores, *RSC Adv.*, 2020, **10**, 27995 **DOI:** 10.1039/D0RA04378H

This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence. **You can use material from this article in other publications, without requesting further permission** from the RSC, provided that the correct acknowledgement is given and it is not used for commercial purposes.

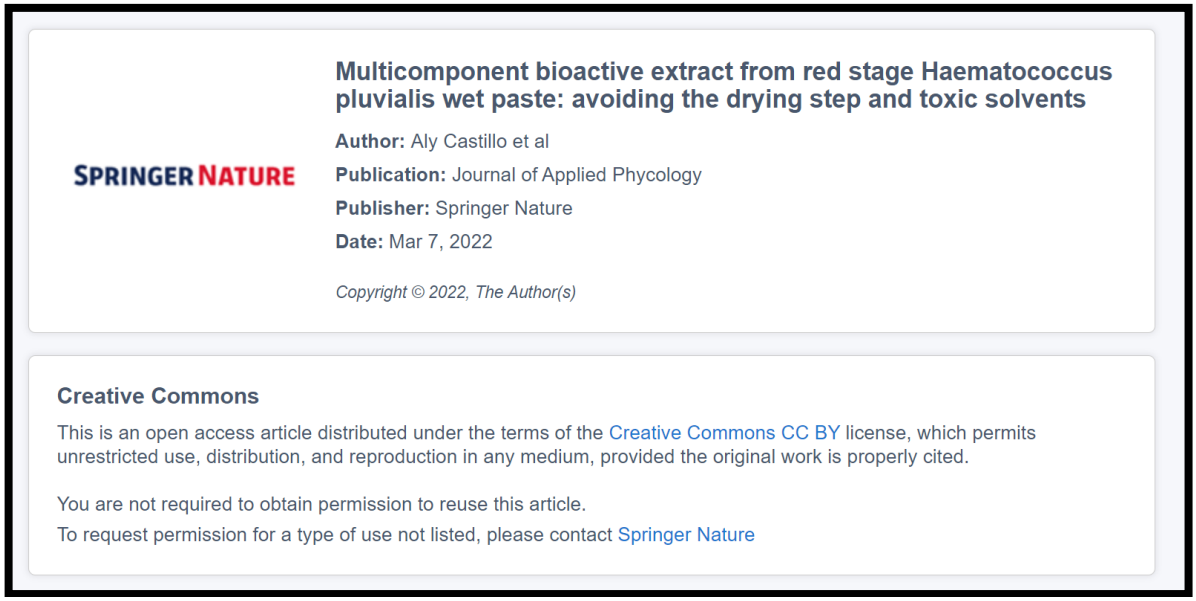
To request permission **to reproduce material from this article in a commercial publication**, please go to the Copyright Clearance Center request page.

If you are **an author contributing to an RSC publication, you do not need to request permission** provided correct acknowledgement is given.

If you are **the author of this article, you do not need to request permission to reproduce figures and diagrams** provided correct acknowledgement is given. If you want to reproduce the whole article in a third-party commercial publication (excluding your thesis/dissertation for which permission is not required) please go to the Copyright Clearance Center request page.

Read more about how to correctly acknowledge RSC content.

2. Aly Castillo, Simón Pereira, Ana Otero, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores. Multicomponent Bioactive Extract from Red Stage *Haematococcus pluvialis* Wet Paste: Avoiding the Drying Step and Toxic Solvents. *Journal of Applied Phycology*, 34 (2022), 10537



SPRINGER NATURE

Multicomponent bioactive extract from red stage Haematococcus pluvialis wet paste: avoiding the drying step and toxic solvents

Author: Aly Castillo et al
Publication: Journal of Applied Phycology
Publisher: Springer Nature
Date: Mar 7, 2022

Copyright © 2022, The Author(s)

Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons CC BY license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.
To request permission for a type of use not listed, please contact Springer Nature

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. Aly Castillo, Maria Celeiro, Marta Lores, Kristina Grgić, Marija Banožić, Igor Jerković, Stela Jokić. Bioprospecting of Targeted Phenolic Compounds of *Dictyota Dichotoma, Gongolaria Barbata, Ericaria Amentacea, Sargassum Hornschuchii* and *Ellisolandia Elongata* from the Adriatic Sea Extracted by Two Green Methods. *Marine Drugs*, 21 (2023), 27995

MDPI Open Access Information and Policy

All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. This means:

- everyone has free and unlimited access to the full-text of *all* articles published in MDPI journals;
- everyone is free to re-use the published material if proper accreditation/citation of the original publication is given;
- open access publication is supported by the authors' institutes or research funding agencies by payment of a comparatively low **Article Processing Charge (APC)** for accepted articles.

Permissions

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. Reuse of an article does not imply endorsement by the authors or MDPI.

4. Aly Castillo, María Celeiro, Laura Rubio, Andrea Bañobre, Migeul Otero-Otero, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores. Optimization of Bioactives Extraction from Grape Marc via a Medium Scale Ambient Temperature System and Stability Study. *Frontiers in Nutrition*, 9 (2022), 1008457

Citation: Castillo A, Celeiro M, Rubio L, Bañobre A, Otero-Otero M, Garcia-Jares C and Lores M (2022) Optimization of bioactives extraction from grape marc via a medium scale ambient temperature system and stability study. *Front. Nutr.* 9:1008457. doi: 10.3389/fnut.2022.1008457

Received: 31 July 2022; **Accepted:** 13 October 2022;
Published: 28 October 2022.

Edited by:
Angel Gil-Izquierdo, Center for Edaphology and Applied Biology of Segura (CSIC), Spain

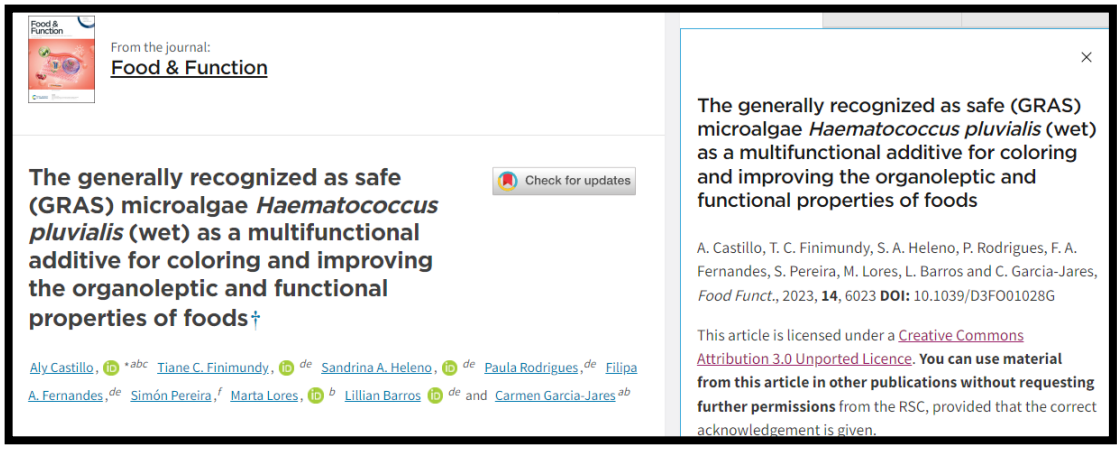
Reviewed by:
Khashayar Sarabandi, Zahedan University of Medical Sciences, Iran
Veronica Sanda Chedea, Research Station for Viticulture and Enology Blaj (SCDVV Blaj), Romania

Copyright © 2022 Castillo, Celeiro, Rubio, Bañobre, Otero-Otero, Garcia-Jares and Lores. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

***Correspondence:** Aly Castillo, alyjesus.castillo.zamora@usc.es

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. Aly Castillo, Tiane C. Finimundy, Sandrina A. Heleno, Paula Rodrigues, Filipa A. Fernandes, Simón Pereira, Marta Lores, Lillian Barros, Carmen Garcia-Jares. The Generally Recognized as Safe (Gras) Microalgae *Haematococcus pluvialis* (Wet) as a Multifunctional Additive for Coloring and Improving the Organoleptic and Functional Properties of Food. *Food and Function*, 14 (2023), 6023



From the journal:
Food & Function

The generally recognized as safe (GRAS) microalgae *Haematococcus pluvialis* (wet) as a multifunctional additive for coloring and improving the organoleptic and functional properties of foods†

Check for updates

Aly Castillo, Tiane C. Finimundy, Sandrina A. Heleno, Paula Rodrigues, Filipa A. Fernandes, Simón Pereira, Marta Lores, Lillian Barros and Carmen Garcia-Jares

The generally recognized as safe (GRAS) microalgae *Haematococcus pluvialis* (wet) as a multifunctional additive for coloring and improving the organoleptic and functional properties of foods

A. Castillo, T. C. Finimundy, S. A. Heleno, P. Rodrigues, F. A. Fernandes, S. Pereira, M. Lores, L. Barros and C. Garcia-Jares, *Food Funct.*, 2023, **14**, 6023 **DOI:** 10.1039/D3FO01028G

This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence. **You can use material from this article in other publications without requesting further permissions** from the RSC, provided that the correct acknowledgement is given.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO III. Índice de figuras y tablas

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1 Ciclo celular de la microalga *Haematococcus pluvialis* 19

Figura 2 Distribución de los principales compuestos fenólicos en la uva de *Vitis vinifera* 29

Figura 3 Diseño basado en la primera representación gráfica de la técnica extractiva Dispersión de Matriz en Fase Sólida (MSPD), realizada por Baker *et al.* (1988)..... 33

Figura 4 Tipos de arreglos y tamaños de equipos disruptores rotor-estator..... 38

Figura 5 Descripción de las etapas de un cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) 50

Figura 6 Comparación de modos de adquisición SRM/MRM, PRM, DDA y DIA (basada en la imagen de [186]) 51

CAPÍTULO 3.2.1

Figure 1 Principal Component Analysis (PCA) score plot of the feed, parts of the digestive transit, and excreta of pigs. Std Feed: base feed; e-Vitis feed: feed enriched with e-Vitis; Blank: instrumental blank; e-Vitis pigs: pigs fed with enriched feed. Control Pigs: pigs fed with base feed. 173

Figure 2 Principal Component Analysis (PCA) loadings plot of the feed, parts of the digestive transit, and excreta of pigs. Control Feed: standard feed e-Vitis feed: feed enriched with e-Vitis; Blank: instrumental blank; e-Vitis pigs: pigs fed with enriched feed. Control Pigs: pigs fed with standard feed. 174

Figure 3 Comprehensive analysis of the transit of bioactive compounds and their metabolites generated by feed enriched with e-Vitis extract through the multiple regions of the digestive tract and excreta of pigs. Representation by: A) heat map and B) dendrogram classification. 176

Figure 4 Fragmentation pathways of glycosylated phenolic compounds. A) Quercetin glucuronide and quercetin glucoside; B) dihydroquercetin-O-rhamnoside; C) Catechin glucoside acetate. 177

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figure 5 Distribution of tracers and taurine bile acid derivatives in the gastric contents of swine fed with e-Vitis. Display in the PCA plot (A) and their MS/MS correlations (B).....179

Figure 6 Distribution of tracers and taurine bile acid derivatives in the duodenum of swine fed e-Vitis feed: Topographical map (A) of the duodenal section and its correlation with the topographical map of the gastric contents (B), and Load diagram (C) of the duodenal section 180

Figure 7 Metabolic pathway from apigenin to davidigenin. 182

Figure 8 Phenylalanine fragmentation pathway. 185

CAPÍTULO 4

Figura 1 Sistema de producción de i-Grape Laboratory S.L.....198

Figura 2 Concepto general de las actuaciones de i-Grape y de la Universidad de Santiago de Compostela (USC) en el proyecto NeoGiANT. 199

Figura 3 Primeros extractos obtenidos a escala pre-piloto para los disolventes orgánicos ensayados y sus proporciones en las mezclas hidroorgánicas.....200

Figura 4 Índice polifenólico total (A) y actividad antioxidantes (B) para los ensayos preliminares de extractos obtenidos con diversos disolventes en escala pre-piloto. *Mezcla hidroalcohólica al 50 %. 201

Figura 5 Gráficos de superficie de respuesta del diseño de optimización a escala piloto del extracto e-Vitis en función de los índices A) TPC y B) AA. 202

Figura 6 Comparación entre extractos a escala laboratorio frente al punto óptimo de la escala piloto del extracto e-Vitis en función a los índices A) TPC y B) AA. 202

Figura 7 Recogida y transporte del bagazo de uva blanca albariño. 203

Figura 8 Diseño de cámara de congelación del bagazo de uva blanca.....204

Figura 9 Diseño de planta industrial para la adecuación de los procesos productivos de i-Grape en un área de 1000 m^2.....205

Figura 10 Esquema productivo de la planta industrial de i-Grape. 205

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 11 Crecimiento productivo y de proc**es**amiento en el desarrollo del escalado entre los años 2021 y 2023. 206

Figura 12 Plano de proceso productivo (A) con la inclusión del equipo volatilizador (B). 207

Figura 13 Métodos de secado empleados para la obtención del extracto e-Vitis sólido. A: Secado por aspersión B:Secado mediante liofilización. 207

TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1 Clasificación de los compuestos fenólicos por Harbone y Simmonds, (1964) 9

Tabla 2 Casos de aplicación de la técnica extractiva MSAT, matrices extraídas y principales compuestos analizados 36

CAPÍTULO 3.2.1

Table 1 Standard polyphenolic profile of e-Vitis* extract 169

Table 2 Nutritional composition of the basic feed for pigs 170

Table 3 Marker compounds identified in e-Vitis-enriched feed and their traceability in the digestive tract. 175

Table 4 Biomarker compounds identified in the gastric content of pigs fed with e-Vitis. 178

Table 5 Biomarker compounds identified in the duodenum of swine supplied with e-Vitis feed. 180

Table 6 Biomarker compounds identified in the jejunum of swine supplied with e-Vitis feed. 181

Table 7 Biomarker compounds identified in the ileum of swine supplied with e-Vitis feed. 183

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 8 Biomarker compounds identified in the caecum of pigs fed e-Vitis feed. 184

Table 9 Biomarker compounds identified in the colon of pigs fed e-Vitis feed.....184

Table 10 Biomarker compounds identified in the urine of pigs fed e-Vitis feed. 186

CAPÍTULO 4

Tabla 1 Fungicidas objetivo, número CAS, concentración (ng/g) encontrada en la materia prima y límite máximo en uvas establecidos por el Reglamento Europeo*.....200

Tabla 2 Optimización de los parámetros y niveles de extracción. 202

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO IV. Autorización de la legislación ética aplicable a ensayos con muestras animales

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Freie Universität Berlin

Fachbereich Veterinärmedizin
Institut für Tierernährung

Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Tierernährung, Königin-Luise-Str. 49, D 14195 Berlin

Aly Jesús Castillo Zamora
Via Isaac Peral, 32, 15890,
Santiago de Compostela, Spain

Geschäftsführender Direktor
Prof. Dr. Jürgen Zentek
Königin-Luise-Str. 49
D 14195 Berlin

Telefon +49 30 838 52256
Fax +49 30 838 55938-
E-Mail juergen.zentek@fu-berlin.de
Internet http://www.vetmed.fu-berlin.de

18.04.2024

Tracking in vivo Bioconversion of Polyphenols Through the Digestive System of Swine Fed a Grape Marc Extract-Enriched Diet

I hereby certify that the pigs used for this study were kept and fed in our institute in accordance with the rules of Germany and the European Union and the requirements of the local authorities, the registration number is TZ0001/22 STN014/22.

Prof. Dr. J. Zentek

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

En diversos sectores industriales, la demanda de extractos funcionales de fitoquímicos afronta múltiples desafíos en cuanto a su origen, extracción y aplicación. Se busca optimizar recursos mediante la selección de subproductos y fuentes renovables desatendidas, junto con mecanismos de extracción de bajo impacto que produzcan extractos bioactivos validados mediante la comprensión de sus mecanismos de acción. Esta tesis, mediante un doble enfoque académico/industrial, se centró en la extracción de compuestos bioactivos, principalmente polifenoles y carotenoides, de subproductos del sector vitivinícola y de fuentes acuícolas comprendidas por macro y microalgas. Los extractos optimizados fueron incorporados a matrices alimentarias para consumo humano y animal, y posteriormente escaladas en un caso de aplicación industrial.