

Universidad de Burgos

Facultad de Ciencias

Área de Ingeniería Química

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos



Estudio de la extracción de compuestos fenólicos mediante diferentes técnicas de extracción a partir del residuo generado en la obtención de agar-agar

Trabajo Fin de Grado

Grado en Química

Dirigido y tutorizado por

María Teresa Sanz Díez y Sagrario Beltrán Calvo

Memoria presentada por

Ángel Alejandro Filipigh

Julio 2019



Universidad de Burgos
Facultad de Ciencias

**VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL
TRABAJO FIN DE GRADO**

**GRADO EN: QUÍMICA
CURSO: 2018/2019**

Dña. María Teresa Sanz y Diez y Sagrario Beltrán Calvo informan de que el alumno Don Ángel Alejandro Filipigh, ha realizado el trabajo "**Estudio de la extracción de compuestos fenólicos mediante diferentes técnicas de extracción a partir del residuo generado en la obtención de agar-agar**" bajo su tutela, y considera que la Memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO *

(*) En caso negativo, indíquense los motivos:
OBSERVACIONES:

Burgos, a 15 de julio de 2019

Fdo.: María Teresa Sanz Diez

Fdo.: Sagrario Beltrán Calvo

ARCHIVO DE LAS MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE GRADO EN RIUBU

Dña. Ángel Alejandro Filipigh y Dña. María Teresa Sanz Diez y Sagrario Beltrán Calvo, autora y tutoras del Trabajo Fin de Grado autorizan que esta memoria sea transferida al Repositorio Institucional de la Universidad de Burgos (RIUBU) en la siguiente modalidad:

Acceso restringido

Acceso abierto

Acceso abierto con periodo de embargo

Burgos, a 15 de julio de 2019

Fdo.: María Teresa Sanz y Sagrario Beltrán Calvo

Fdo.: Ángel Alejandro Filipigh

Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto de Investigación VALORIZACIÓN INTEGRAL DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA MEDIANTE TECNOLOGÍAS EMERGENTES (ALVALOR) financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (BU301P18) y desarrollado en el Grupo de investigación Biotecnología Industrial y Medioambiental, reconocido por la UBU (GIR-UBU BIOIND) y por la Junta de Castilla y León como Unidad de Investigación Consolidada UIC-128.

Tabla de contenido

Abstract	1
Resumen	1
1. Introducción	2
2. Objetivos	3
3. Técnicas de extracción sólido-líquido	3
3.1 Extracción asistida por enzimas	4
3.2 Extracción asistida por ultrasonidos	4
3.3 Extracción con agua subcrítica	6
4. Materiales y métodos	7
4.1 Biomasa algal.....	7
4.2 Determinación del contenido de humedad.....	8
4.3 Extracción asistida por enzimas	8
4.3.1 Cinéticas de extracción	8
4.4 Extracción asistida por ultrasonidos	9
4.5 Extracción con agua subcrítica	9
4.6 Determinación del contenido de polifenoles totales del extracto acuoso.....	10
4.7 Caracterización de los extractos enzimáticos por HPLC.....	11
5. Resultados y discusión	11
5.1 Extracción asistida por enzimas	11
5.1.1 Extracción mejorada de CPT mediante el empleo de celulasa	11
5.1.2 Efecto de la concentración de celulasa en la extracción de CPT	12
5.1.2 Efecto de otras enzimas hidrolíticas en la extracción de CPT: xilanasas y proteasa	13
5.1.3 Modelado de las curvas de extracción	15
5.1.4 Análisis de otros compuestos presentes en los extractos	16
5.2 Extracción asistida por ultrasonidos (EAU)	18
5.2.1 Efecto del disolvente, tiempo y temperatura.....	18
5.2.2 Efecto de la relación disolvente:materia prima	19
5.3 Extracción con agua subcrítica	21
6. Conclusiones y trabajos futuros	22
Bibliografía	23

Abstract

The seaweed residue generated by the agar-agar production industry presents bioactive compounds of antioxidant nature with a great potential of recovery and reuse. The most common extraction methods for the isolation of antioxidant are based in water or organic solvent extractions. In this work, the use of different enzymes has been proposed for achieving the extraction of the phenolic compounds, and we came to the conclusion that the type of enzyme, its concentration and the pH have a really important effect in the extraction process. Moreover, the characterization of hydrolyzed enzymatic products was carried-out by HPLC, in which the amount of sugars and acids formed by the hydrolytic action of the enzymes was quantified.

As an alternative to the extraction with enzyme the use of ultrasound was proposed but the results obtained don't show a improvement in relation to the extraction with hydrolytic enzyme.

Finally, we tried use pressurized water to improve the results. This extraction was carried in optimal conditions of pressure (50 bars) and temperature (200°C), obtaining better results in the extraction of phenolic compounds than the previous methods. Thus, we concluded that this is a green and sustainable alternative that avoids employing toxic solvents for the environment.

Resumen

El residuo algal generado en la industria de producción del agar-agar presenta componentes bioactivos de carácter antioxidante con un gran potencial de recuperación y reutilización. Los métodos de extracción comúnmente utilizados para el aislamiento de antioxidantes se basan en extracciones con agua o disolventes orgánicos. En el presente trabajo se ha propuesto el empleo de diversas enzimas para conseguir la extracción de los componentes fenólicos en el que se concluyó que el efecto del tipo de enzima, su concentración y pH del medio afectan en gran medida a la extracción de los componentes de interés. Así mismo se llevó a cabo la caracterización de los hidrolizados enzimáticos por HPLC en el que se ha podido cuantificar la cantidad de azúcares y ácidos formados debido a la acción hidrolítica de las enzimas empleadas.

Como alternativa a la extracción con enzimas se ha propuesto el empleo de ultrasonido en el que los resultados obtenidos no presentan una mejora en el proceso de obtención de extractos fenólicos respecto a los que se obtienen empleando enzimas hidrolíticas.

Para finalizar se intentó mejorar los anteriores métodos por lo que se propuso el empleo de agua presurizada. Dicha extracción se llevó a cabo en condiciones óptimas de presión (50 bares) y temperatura (200°C) obteniendo los mejores resultados en la obtención de concentrados fenólicos por lo que se concluyó que es una buena alternativa a los procesos convencionales de extracción ya que se trata de una alternativa verde y sostenible que evita el empleo de disolventes potencialmente tóxicos para el medio ambiente.

1. Introducción

Debido a la gran diversidad y complejidad taxonómica, genética y química de las algas, estos organismos se consideran una fuente inexplorada de productos valiosos por lo que son objeto de investigación en muchos niveles impulsada por su utilidad en muchas culturas ya que proporcionan oportunidades adicionales donde los recursos terrestres son limitados (Young et al., 2015). Más recientemente han atraído la atención de muchos investigadores para satisfacer la demanda de biomasa con el objetivo de solventar los desafíos de una población humana en expansión, incluyendo el cambio climático y la seguridad alimentaria, lo que da lugar a una producción sostenible de biomasa de fuentes no tradicionales como viene siendo las fuentes vegetales (Blunt et al., 2016).

Las algas, a grosso modo, se diferencian en dos tipos: macroalgas o algas macroscópicas, pluricelulares, pertenecientes al reino Plantae o bien microalgas o algas microscópicas, unicelulares o agrupadas en colonias. Ambas conforman el mismo grupo denominados "algas" (Brodie & Zuccarello et al., 2007). Estas han sido utilizadas desde la antigüedad como alimento sobre todo en los países asiáticos ya que su alto contenido en proteínas, fibra, vitaminas y minerales las hacen una fuente atractiva de alimentos funcionales. En su composición tienen clorofila y otros pigmentos que se almacenan en los cloroplastos y, en función de estos pigmentos, se clasifican a su vez en varios grupos: algas marrones (*Phaeophyta*), rojas (*Rhodophyta*), verdes (*Chlorophyta*) y verdes-azulada (*Cyanophyta*).

La biomasa algal es reconocida como una fuente valiosa de diversos componentes químicos con aplicaciones en muchos sectores tales como el sector agroalimentario (incluyendo la alimentación humana, animal y bioestimulantes para plantas), sector energético (producción de biocombustible) también en el nutracéutico y cosmeceútico (producción de compuestos antioxidantes de baja toxicidad) (Eppink et al., 2017). Los compuestos antioxidantes procedentes de fuentes marinas presentan una mayor actividad en comparación con los antioxidantes comerciales tales como el hidroxibutilanisol y el butilhidroxitolueno que se aplican en muchos productos y alimentos (Abd El-Baky et al., 2010).

Respecto a la producción de biomasa, las macroalgas presentan grandes ventajas y características que las hacen más idóneas que las plantas terrestres presentando una mayor producción anual. Entre las ventajas se encuentran que no ocupan tierras de cultivo y no consumen agua dulce por lo que no compiten con los alimentos tradicionales de la agricultura que se destina a la alimentación humana (Abd et al., 2010). Las actuales evidencias sugieren que las macroalgas resultan ser una fuente alternativa de biomasa para la producción de alimentos, productos químicos y biocombustible entre otros muchos (Wargacki et al., 2012).

Las algas, en general se han clasificado como una fuente de biomasa de alta calidad; en especial de proteínas, fibra dietética y compuestos con actividad antioxidante, además; son consideradas bajas en calorías. Por otra parte, las algas poseen compuestos bioactivos de alta capacidad antioxidante, como carotenoides y polifenoles. Numerosos estudios han confirmado la presencia de actividades antioxidantes, anticancerígenas, y antiinflamatoria en los pigmentos de las algas (Ortiz et al., 2009).

Las macroalgas son fuentes ricas en productos bioactivos naturales como proteínas, aminoácidos, carbohidratos, además, debido al entorno marino en las que

crecen están expuestas a una alta combinación de radiación solar y concentración de oxígeno, factores que pueden conducir a la formación de radicales libres y otros fuertes agentes oxidantes. Sin embargo, la falta de daño oxidativo en su fisiología y estructura celular sugiere que sus células poseen altas cantidades de compuestos antioxidantes tales como los polifenoles. Los compuestos antioxidantes son biosintetizados para contrarrestar el daño biológico causada por la oxidación de moléculas. En las algas, se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) consecuencia de la realización de la fotosíntesis oxigénica y en mayor medida dependiendo del nivel de estrés al que se vean sometidas en su hábitat (Trostchansky et al., 2016). A pesar de tal exposición, las algas carecen de daño oxidativo en sus componentes estructurales al poseer sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos de amplia diversidad molecular, los cuales pueden ser extraídos a partir de la biomasa algal y ser empleado en numerosas aplicaciones. Por lo tanto, el uso de antioxidantes a partir de biomasa algal neutralizaría las especies reactivas que se han identificado como agentes en varias enfermedades tanto en la dermis como a nivel sistémico (Wells et al., 2016).

Existe un gran interés científico por las propiedades de los compuestos fenólicos fundamentalmente en la prevención de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, enfermedades cardiovasculares. La pared celular de las algas presenta una gran complejidad estructural y rigidez, está compuesta de una mezcla de polisacáridos ramificados y azufrados que se encuentran asociados con proteínas y iones, como calcio y potasio (Wijesinghe & Jeon et al., 2012) lo que constituye el principal obstáculo para la eficiente extracción de los constituyentes bioactivos intracelulares, para la determinación de los compuestos fenólicos se debe recurrir a ensayos con diferentes solventes y tratamiento enzimático para una eficiente extracción (Devi et al., 2011).

Uno de los aspectos menos estudiados y en los que se centrará principalmente este trabajo es en el desarrollo de nuevas tecnologías limpias que permitan el aislamiento de compuestos de interés para la industria alimentaria a partir de la biomasa algal generada como un subproducto en la extracción del agar-agar a partir de la macroalga roja *Gelidium sesquipedale*.

2. Objetivos

The main goal of this work is the extraction of the bioactive compounds present in seaweed biomass, in particular the residue proceeding from the processing of the macroseaweed *Gelidium sesquipedale* for the obtainment of agar-agar. This way, we will make a first valorization of this product by valorizing its extractable products. For achieving this goal, the following secondary objectives have been developed:

- The study of the different methods of extraction, such as extraction assisted by enzymes, ultrasound or pressurized water.
- Optimization of the extraction variables as the effect of solvent and pH or the raw material:solvent ratio.

3. Técnicas de extracción sólido-líquido

El primer paso para una valorización integral de la biomasa propuesta en este trabajo consiste en la valorización de los compuestos bioactivos fácilmente extractables. Por ello es necesario un estudio de optimización adecuada de esta primera y esencial

etapa. La eficiencia en los procesos de extracción depende de diversos factores como el tipo de disolvente, pH del medio, relación materia prima/disolvente, tamaño de partícula y método de extracción empleado.

Este trabajo se ha centrado en tres tipos de métodos de extracción diferente. En concreto se ha estudiado la extracción de compuestos bioactivos del residuo del alga *Gelidium sesquipedale* mediante extracción asistida por enzimas y ultrasonidos. Así mismo, se ha considerado el empleo de agua presurizada para conseguir mejorar la extracción de compuestos fenólicos. En general, el empleo de agentes físicos, químicos o enzimáticos permiten, con una mayor facilidad, la liberación de los componentes bioactivos ya que permiten romper las paredes celulares de los vegetales formados principalmente por polisacáridos como la celulosa o la hemicelulosa facilitando así la liberación de los componentes bioactivos. A continuación, se pasa a describir brevemente el fundamento de cada una de estas tecnologías.

3.1 Extracción asistida por enzimas

Los métodos de extracción comúnmente utilizados para el aislamiento de antioxidantes se basan en extracciones convencionales con agua o disolventes orgánicos. Sin embargo, los recientes avances han demostrado que la hidrólisis enzimática puede lograr un mayor rendimiento en la extracción de compuestos bioactivos a partir de algas. El uso de enzimas hidrolíticas durante el proceso de extracción ha mostrado un aumento en el rendimiento de extracción, una mejor liberación de metabolitos secundarios y una mayor bioactividad de los extractos (Hossain et al., 2006).

La extracción asistida por enzimas (EAE) es un método simple y eficiente para extraer antioxidantes naturales de algas marinas y es escalable a escala industrial. Este método también es respetuoso con el medio ambiente, ya que no utiliza disolventes orgánicos u otros productos químicos tóxicos y, por tanto, hace que los extractos sean seguros para aplicaciones alimentaria (Heo et al., 2005).

La mayoría de las enzimas tienen una temperatura y un pH óptimo de actuación y su acción puede ser inhibida o potenciada por otros compuestos o cofactores. Estas propiedades hacen de las enzimas efectivos puntos de control en muchas reacciones bioquímicas en procesos tecnológicos.

3.2 Extracción asistida por ultrasonidos

La extracción asistida por ultrasonidos (EAU) utiliza sonidos de alta frecuencia con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al disolvente (Rostagno et al., 2013).

Los fenómenos físicos que afectan la extracción de sustancias se ven afectadas por la sonicación, ya sea porque las sustancias de interés se encuentran en el interior de las células o en el tejido exterior. La EAU tiene como principal fuerza impulsora la cavitación acústica, capaz de inducir una serie de compresiones y rarefacciones en las moléculas del solvente presente, provocando la formación de burbujas como consecuencia de los cambios de temperatura y de presión (Medina-Torres et al., 2017).

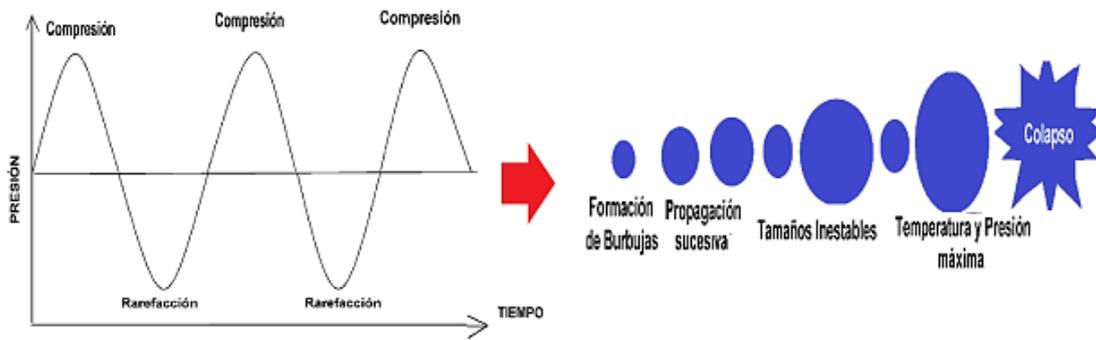


Figura 1: Principio de cavitación acústica (Medina-Torres et al. 2017)

En general se han identificados varios mecanismos involucrados en la EAU, de los cuales destacan: *fragmentación*, atribuida a las colisiones entre partículas y a las ondas ultrasónicas, causando la reducción en el tamaño de partícula, lo que facilita la transferencia de materia, *erosión*; ayuda a mejorar la accesibilidad del disolvente mediante la implosión de las burbujas sobre la superficie de la matriz vegetal; *sonocapilaridad* y *sonoporación*, son capaces de mejorar la penetración del líquido a través de los canales producidos por la implosión de las burbujas, ocasionando alteraciones en la permeabilidad de las membranas celulares y finalmente el *esfuerzo de cizalladura* que produce el colapso de las burbujas en el fluido debido al fenómeno de oscilación (Chemat et al., 2017, Medina-Torres et al., 2017).

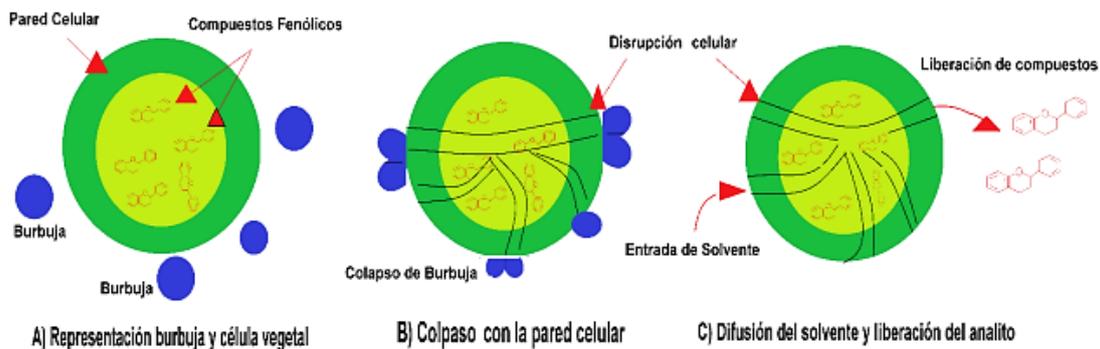


Figura 2: Representación gráfica de los fenómenos de cavitación, colapso y liberación del material vegetal. (Medina-Torres et al. 2017)

La irradiación ultrasónica puede ser aplicada de dos maneras: por contacto directo con la muestra, o a través de las paredes del recipiente que contiene la muestra (indirecta), como los sistemas de baño de ultrasonidos. La principal desventaja de estos últimos es que generalmente funcionan a una sola frecuencia (20 o 40 kHz). Sin embargo, existen sistemas de extracción más eficaces, como los sistemas de extracción por ultrasonido acoplado a una sonda, en donde el contacto directo con la muestra le permite desarrollar una potencia de hasta 100 veces más que la proporcionada por el baño de ultrasonido (Pico et al., 2013, Chemat et al., 2017).

4. Materiales y métodos

4.1 Biomasa algal

La biomasa algal fue proporcionada por la empresa Hispanagar (Burgos, Castilla y León) generada a partir del procesamiento industrial de una macroalga, en concreto, de una variedad de *Gelidium* para la obtención del agar-agar, polisacárido empleado como espesante a escala de laboratorio y en la industria alimentaria.

El proceso de obtención del residuo algal se puede resumir en el siguiente diagrama:



Figura 4: Diagrama de flujo dónde se puede observar la etapa en la que se genera el subproducto de la obtención del agar-agar

Las algas se someten a un tratamiento alcalino con NaOH a presión. A continuación, se lleva a cabo una extracción con agua caliente seguido de filtración en el que se obtiene el residuo. Tras la filtración se lleva a cabo un proceso de gelificación seguida de deshidratación por congelación y sinéresis. Finalmente se secan y trituran.

El residuo empleado durante el desarrollo de este trabajo se secó en un horno de convección a 45°C durante 24h para reducir su contenido en humedad. La caracterización química completa del residuo algal de *G. sesquipedale* se ha llevado a cabo en el área de Ingeniería Química y se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2: Composición del residuo de *G. sesquipedale* en base seca

Glucanos	Galactanos	Arabinanos	Lignina	Proteínas	Lípidos	Cenizas	Extractables
24.9±0.9	11.1 ± 0.5	8.9 ± 0.5	3.5±1.3	17.5±1.5	0.87±0.09	21.8±2.0	13.0±1.1

4.2 Determinación del contenido de humedad

Se determinó el contenido de humedad residual en la biomasa algal (método A.O.A.C, 1998) pesando fracciones de sólido y llevándolo a estufa (JP Selecta 20000210) durante 24h a 105°C obteniéndose un 4.75% humedad en base seca (g de agua/ 100 g de sólido seco).

4.3 Extracción asistida por enzimas

La extracción de compuestos fenólicos totales (CPT) mediante hidrólisis enzimática se realizó en un baño empleando agitación orbital a temperatura de 50°C durante 24h a 245 r.p.m para una relación de 20 mL agua/g_{residuo seco}. Como disolvente se empleó agua destilada. Para la determinación de las cinéticas, se tomaron muestras que se calentaron en un baño a 100°C durante 5 minutos para inactivar las enzimas.

Para la extracción de los polifenoles mediante enzimas se evaluó el efecto del tipo de enzima y su concentración, así como el efecto del pH y de la combinación de enzimas en el proceso de extracción. Las enzimas empleadas fueron celulasa (*Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich) en concentración de 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8% w/w; proteasa (*Bacillus subtilis*, Biocom) al 6% w/w y xilanasa (*Trichoderma longibrachiatum*, Biocom) al 6% w/w.

Para evaluar el efecto del tiempo en la extracción se llevaron a cabo las correspondientes cinéticas de extracción ajustando los datos a modelos empíricos de extracción sólido-líquido.

4.3.1 Cinéticas de extracción

Las curvas cinéticas de extracción de polifenoles para las diferentes condiciones de extracción se ajustaron a diferentes modelos empíricos descritos y recopilados por Kitanović et al. (2008). Entre ellos el modelo potencial y Weibull fueron considerados:

4.3.1.1 Modelo potencial

El modelo potencial se ha propuestos para describir el mecanismo de extracción de los componentes fenólicos presentes en el residuo algal. Este modelo puede ser descrito según la ecuación 1.

$$CPT = Bt^n \quad [1]$$

dónde CPT es la concentración de polifenoles totales, B es una constante que incorpora las características del sistema y n es el exponente difusional con valores por debajo de la unidad para muchos sólidos vegetales. El rendimiento de extracción previsto para este modelo no se aproxima a la unidad con el tiempo.

4.3.1.2 Modelo de Weibull

El modelo de Weibull se puede expresar según la ecuación 2:

$$CPT = A \cdot (1 - \exp(-kt^n)) \quad [2]$$

El exponente n es el parámetro de forma de la curva de extracción. Si $n > 1$, la curva es sigmoidea, y si $n < 1$, la curva es parabólica con una pendiente inicial alta seguida de una forma exponencial.

Los parámetros de los modelos empíricos se han obtenido mediante regresión no lineal aplicando el algoritmo de Marquardt mediante el software Statgraphics X64.

4.4 Extracción asistida por ultrasonidos

La termosonicación se llevó a cabo en un equipo de ultrasonidos (750 W Sonics Material™) con una sonda de 13 mm de diámetro, con una amplitud del 100% y pulsos de 5 s. Las muestras se colocaron en un vaso de vidrio provisto de un encamisado para controlar la temperatura y evitar la degradación de la muestra. La sonda se colocó a una distancia fija de 2 cm del fondo. La temperatura de termosonicación se varió en el intervalo de 40-50°C.

Se analizó el efecto del tiempo, temperatura y composición del disolvente: agua, metanol, etanol y mezcla hidroalcohólica MeOH/H₂O a tiempos de 20 y 40 minutos y relación sólido:disolvente de 100, 50 y 20.

4.5 Extracción con agua subcrítica

El proceso de extracción con agua presurizada (PLE) tiene lugar en un equipo perteneciente al grupo de investigación del área de Ingeniería Química de la Universidad de Burgos, cuyo esquema se muestra en la Figura 5 y que consiste en un reactor semicontinuo de lecho fijo cuyas condiciones de operación fueron $205 \pm 5^\circ\text{C}$ de temperatura y 50 bares de presión.

Los elementos principales del PLE consisten en una bomba HPLC (Gilson 305, cabezal SC-20 con flujo máximo de 10 mL/min), un extractor de lecho fijo, una válvula antirretorno (Autoclave Engineer SWB2200 máx. 15000 psi) y una válvula reguladora de presión (Pressure Tech 6784 V962, máx. 414 bar) con el que se consigue mantener la presión del sistema a 50 bares.

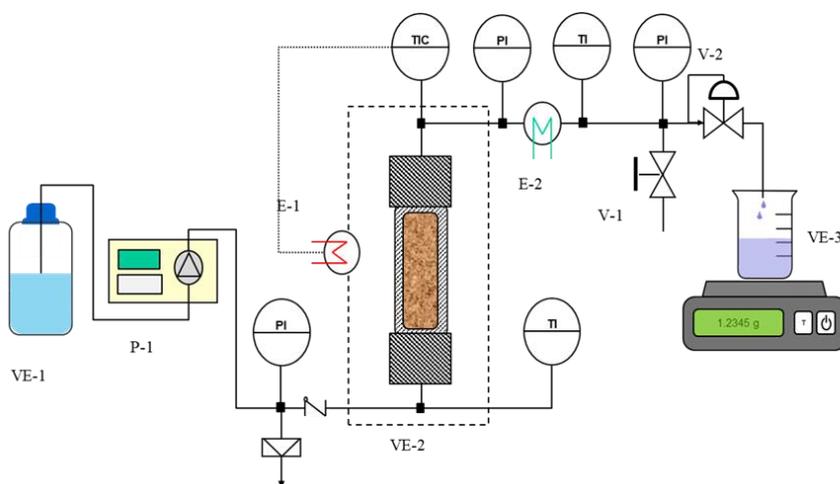


Figura 5: Esquema del equipo empleado en la extracción con agua subcrítica

Se recogieron de manera regular diferentes extractos acuosos del residuo algal para obtener de esta forma la cinética de extracción.

4.6 Determinación del contenido de polifenoles totales del extracto acuoso

La determinación del contenido de polifenoles totales (CPT) se llevó a cabo siguiendo el método de Folin-Ciocalteu. Este método se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible a ser determinada espectrofotométricamente a 750 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad permite evaluar el contenido en polifenoles.

El mecanismo se basa en una reacción redox, por lo que además puede considerarse también como un método de medida de la actividad antioxidante total.

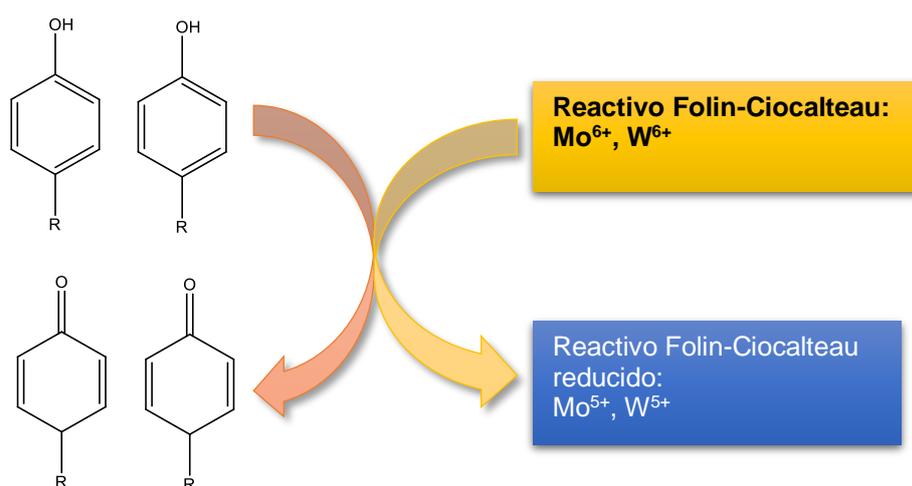


Figura 6: Mecanismos del método colorimétrico de Folin-Ciocalteu para la determinación de polifenoles totales

Experimentalmente el CPF se determinó preparando muestras por duplicado en el siguiente orden: 100 μL de muestra, 2.8 ml de agua destilada, 100 μL de reactivo Folin-Ciocalteu y 2 ml de Na_2SO_4 al 75% p/v. Se preparó un blanco sustituyendo los 100 μL de muestra por el mismo volumen de agua destilada. Finalmente se incubó durante 1h en oscuridad y se midió la absorbancia a 750nm con un equipo de espectrofotometría (Jasco V-750 Spectrophotometer). La cuantificación se llevó a cabo mediante una curva de calibrado utilizando ácido gálico como estándar y expresando los resultados como mg de equivalente de ácido gálico/g de residuo seco (mg GAE/g_{residuo seco}). Se realizaron diferentes calibrados para concentraciones altas y bajas de polifenoles totales en los extractos obtenidos mediante las diferentes tecnologías empleadas.

4.7 Caracterización de los extractos enzimáticos por HPLC

La caracterización completa de los hidrolizados enzimáticos obtenidos tras 24 h de incubación se llevó a cabo mediante HPLC (Agilent Technologies, HP1260). La separación de los componentes se llevó a cabo mediante una columna Biorad Aminex HPX-87-H empleando como fase móvil ácido sulfúrico 0.005 M. La detección de los componentes se consiguió mediante dos detectores en serie ultravioleta (VWD) e índice de refracción (RID). La cuantificación de los diferentes componentes se obtuvo empleando las curvas de calibrado de los correspondientes estándares disponibles en el área de Ingeniería Química.

5. Resultados y discusión

5.1 Extracción asistida por enzimas

5.1.1 Extracción mejorada de compuestos fenólicos totales mediante el empleo de celulasa

En la Figura 7 se muestra la cinética de extracción de CPT empleando agua como disolvente a una temperatura de 50°C, para una relación de 20 mL agua/g_{residuo seco}, se puede observar, como tras 24 h de extracción únicamente se consigue una concentración en el medio de 1.08 mg GAE/g_{residuo seco}. En la misma figura, se muestra la hidrólisis y extracción de CPT cuando al medio se añade celulasa al 6% w/w con respecto a la cantidad de biomasa a su pH óptimo (pH= 5). En este caso se puede observar que las cinéticas de extracción son más rápidas y además se alcanza una CPT de 6.57 mg GAE/ g_{residuo seco}. Esta mayor eficacia en la extracción de polifenoles totales se debe a que la presencia de enzimas tales como celulasas conducen a una mayor solubilidad de las paredes celulares acelerando de esta forma la liberación de biocompuestos intracelulares. En el caso de los polifenoles, la mayoría de estos compuestos se encuentran unidos a componentes estructurales de la biomasa como la celulosa o hemicelulosa. Por lo tanto, el empleo de enzimas que degraden la pared celular conduce a mayores eficacias en la extracción de compuestos fenólicos, como se puede observar en la Figura 7.

Una de las variables más importantes cuando se emplean enzimas, es el pH del medio, ya que existe un valor de pH dónde la enzima es más activa conocido este valor como pH óptimo. Para observar la influencia de esta variable, se realizó la misma experiencia empleando agua destilada como medio de reacción a pH 7.8. Se advierte que, en este caso, el CPT, tras 24 h de extracción disminuyó hasta 3.61 mg GAE/ g_{residuo seco}. Asimismo, se realizó la hidrólisis de compuestos fenólicos de la biomasa seleccionada a pH 5 sin adición de celulasa, para tener en cuenta la posible hidrólisis debido únicamente al pH frente a la hidrólisis enzimática. A pH ligeramente ácido, pH 5, se produce una mejor extracción de los compuestos fenólicos en comparación con agua como disolvente, obteniendo una CPT de 4.1 mg GAE/g_{residuo seco}. Comparando este valor con el obtenido en presencia de celulasa a su pH óptimo se consigue un aumento del 60% del CPT.

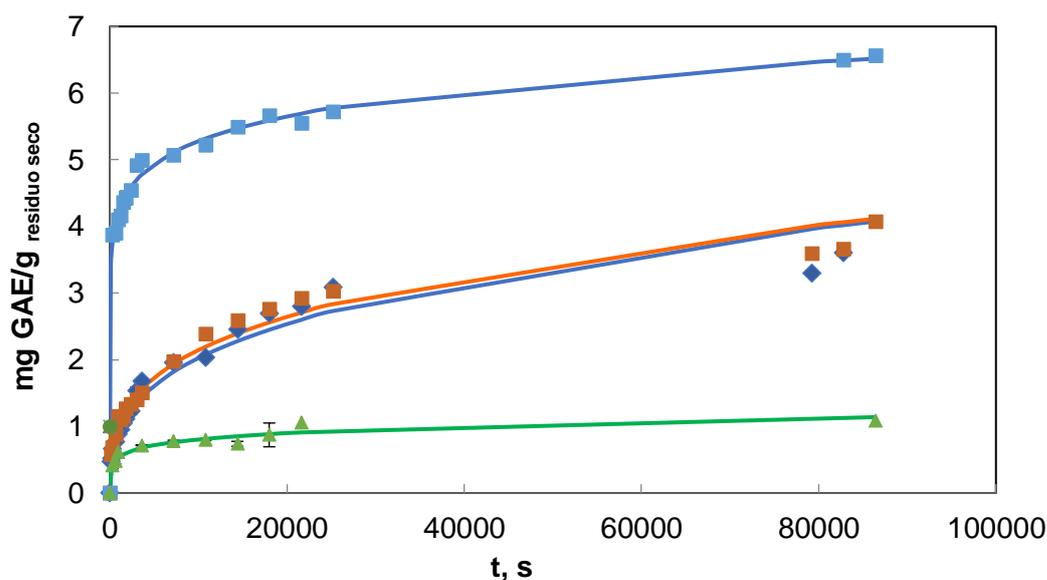


Figura 7: Cinética de extracción de CPT a 50°C, y relación 20 mL disolvente/g_{residuo seco} (■6% de celulosa a pH 5, ■0% Celulosa a pH 5, ◆6% Celulosa a pH 7.8, ▲ Extracción con agua). La línea continua representa los resultados obtenidos con el modelo de Weibull.

5.1.2 Efecto de la concentración de celulosa en la extracción de CPT

A continuación, se estudió el efecto de la concentración de celulosa en la cinética de extracción de CPT, Figura 8, en el intervalo de concentraciones de celulosa entre 0.25 y 8 % respecto a la cantidad de biomasa para una temperatura de 50°C y una relación 20 mL:g_{residuo seco}. Se observa que un aumento del 0.25% al 8% en la concentración de celulosa se consigue un incremento del 264 % en el CPT (de 2.08 mg GAE/ g_{residuo seco} a 7.58 mg GAE/ g_{residuo seco}) puesto que la pared celular, formado por una cantidad importante de celulosa (alrededor de un 25 %, ver Tabla 2) constituye una parte importante de la biomasa algal. En este sentido, un aumento en la concentración de celulosa, especializada en la ruptura de la celulosa durante el proceso extractivo permite una mayor ruptura de dichas paredes liberando al medio los componentes fenólicos. Si bien, una de las mayores desventajas del empleo de enzimas frente a otros procesos hidrolíticos es el coste de la propia enzima, por lo que este será un factor a tener en cuenta.

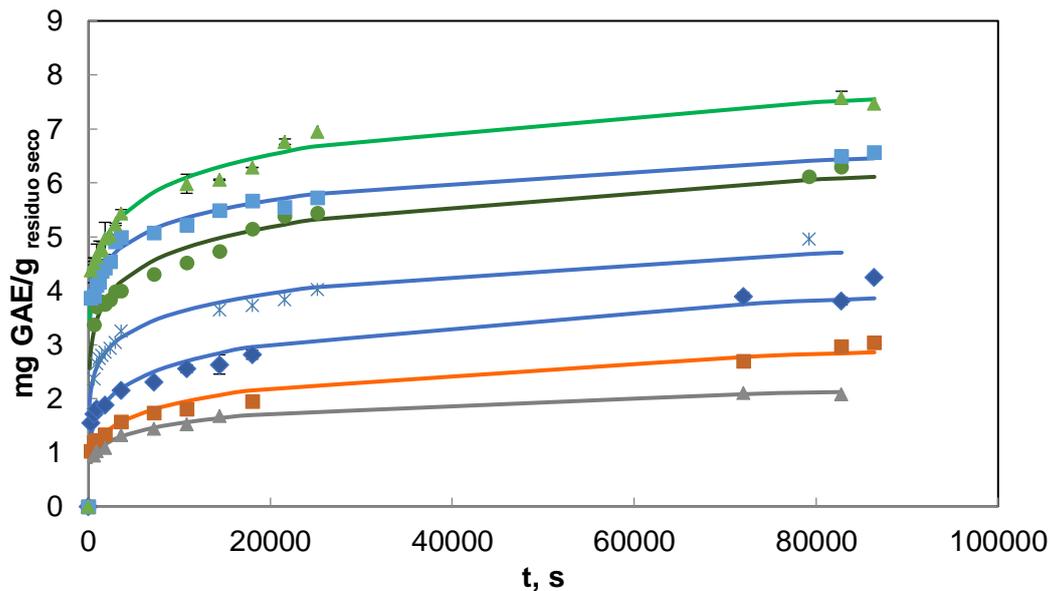


Figura 8: Cinética de extracción de CPT a 50°C, 24h y relación 20 mL disolvente/g_{residuo seco} (▲8% Celulasa, ■6% de celulasa, ●4% Celulasa, * 2% Celulasa, ◆1% Celulasa, ■0.5% Celulasa, ▲0.25% Celulasa). La línea continua representa los resultados obtenidos con el modelo de Weibull.

5.1.2 Efecto de otras enzimas hidrolíticas en la extracción de CPT: xilanasa y proteasa

Además del empleo de celulasa para intentar mejorar la extracción de compuestos fenólicos, en este trabajo se ha estudiado el efecto de otras enzimas hidrolíticas, como xilanasa y proteasa, así como combinación de ambas. Los resultados se presentan en la Figura 9. Se puede observar que cuando se emplea únicamente xilanasa a la misma concentración que la celulasa, la cinética de liberación de los polifenoles es más lenta. En el caso de proteasa al 6 %, la cinética es inicialmente más lenta, pero se llegan a conseguir, tras 24 h de extracción resultados similares a los logrado con la celulasa. En este sentido, el menor rendimiento obtenido con la xilanasa puede deberse al bajo contenido en arabinoxilanos de la materia prima de partida. Respecto a los buenos rendimientos obtenidos con la proteasa, en bibliografía se ha encontrado que estudios realizados por Wijesinghe & Young et al. (2011) revelan que los compuestos fenólicos presentes en los vegetales no siempre se encuentran asociados a las pared celular del mismo sino que pueden formar fuertes complejos con las proteínas ya sea de manera reversible por puentes de hidrógeno a través del enlace péptido o bien de forma irreversible por condensación covalente por lo que una enzima capaz de hidrolizar dichos enlaces peptídicos puede favorecer la liberación de los componentes fenólicos al medio. Otros estudios como el llevado a cabo por Wang et al. (2009) encontraron un aumento del 2.5 al 15.5 g GAE/kg_{extracto} en la extracción de polifenoles del alga roja *Palmaria palmata* empleando diversas proteasas frente a la celulasa, ya que el empleo de celulasas da lugar a la liberación de oligosacáridos y azúcares simples durante la degradación de los polisacáridos de la pared celular lo que puede dar lugar a niveles más bajos de polifenoles en los extractos (Siriwardhana et al., 2008). En cualquier caso, en el presente trabajo el empleo únicamente de celulasa ha conducido a buenos resultados.

Para comprobar posibles sinergias entre las diferentes enzimas aquí estudiadas se probaron diferentes mezclas de enzimas con la celulasa. Así, se llevaron a cabo las cinéticas de extracción de los CPT para: celulasa (3%) + xilanasa (3%), celulasa (3%) + proteasa (3%) y celulasa (2%) + proteasa (2%) + xilanasa (2%). La cinética de hidrólisis y extracción de CPT se recoge también en la Figura 9. Se puede observar que el efecto de combinar enzimas no produce una mejora en el proceso de extracción obteniéndose un CPT de 4.63, 6.02 y 5.87 mg GAE/ g_{residuo seco} respectivamente, tras 24 h de extracción, frente a los 6.57 mg GAE/ g_{residuo seco} que se obtienen empleando únicamente la celulasa en las mismas condiciones de operación. De estos resultados hay que destacar los bajos rendimiento obtenidos para la combinación de celulasa y xilanasa. Esto puede ser debido a la liberación por parte de la xilanasa de compuestos que pueden tener una potencial acción inhibitoria en la actividad de la celulasa, como se comentará posteriormente al analizar los resultados de los extractos mediante HPLC.

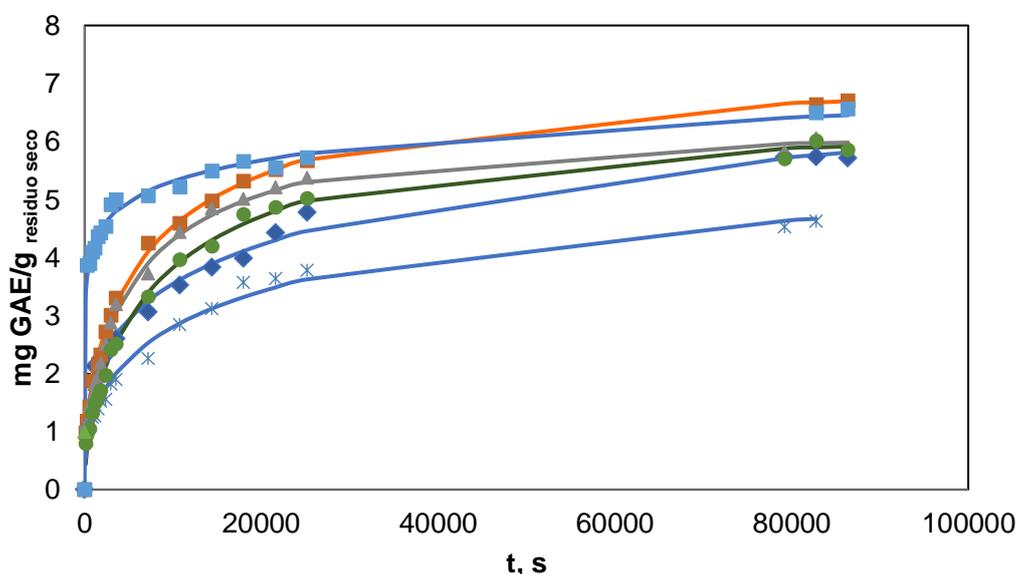


Figura 9: Cinética de extracción de CPT a 50°C, 24h y relación 20 mL disolvente/g_{residuo seco} (■ 6% de celulasa, ■ 6% proteasa, ▲ 3% celulasa + 3% proteasa, • 2% Celulasa + 2% proteasa + 2% xilanasa, ◆ 6% xilanasa, * 3% Celulasa + 3% xilanasa,). La línea continua representa los resultados obtenidos con el modelo de Weibull.

Por último, debido a los buenos resultados obtenidos únicamente con proteasa se ha estudiado el efecto del pH en la actividad hidrolítica de esta enzima, ya que según el fabricante (Biocon) el intervalo de operación de esta enzima se encuentra en el intervalo entre pH 5 y 9. Por ello, se evaluó el efecto del pH, realizando las cinéticas de extracción de CPT a pH 6 y 8 (Figura 10). En este caso, al aumentar el pH se obtuvieron cinéticas más rápidas y con mayores rendimientos, obteniendo una CPT de 7.77 mg GAE/g_{residuo seco} con proteasa a pH =8, frente a los 6.57 mg GAE/g_{residuo seco} obtenidos en el caso de la celulasa a la misma concentración

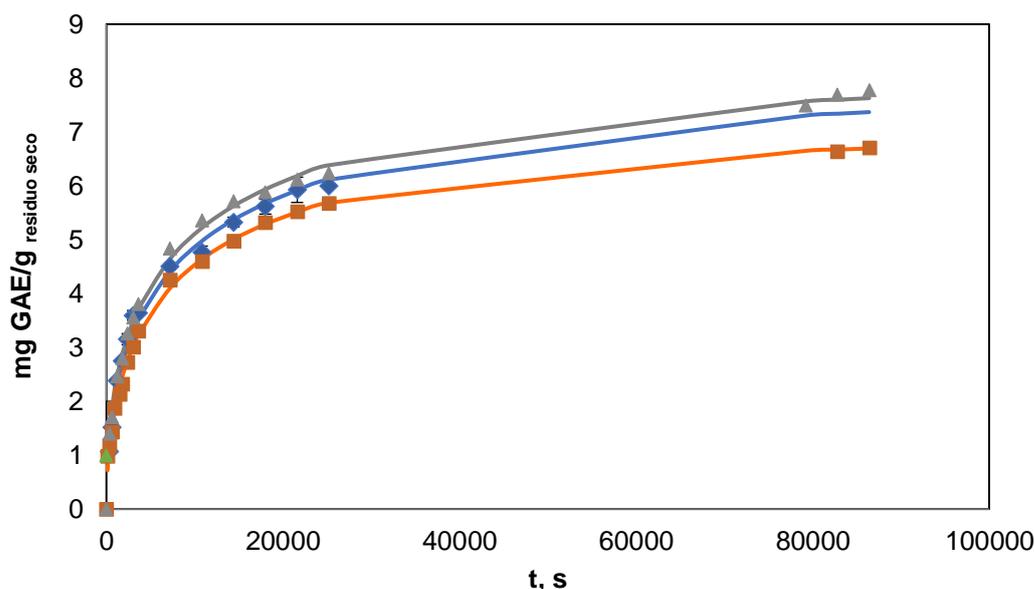


Figura 10: Cinética de extracción de CPT a 50°C, 24h y relación 20 mL disolvente/g_{residuo seco} (■ 6% proteasa pH = 5, ◆ 6% proteasa a pH = 6, ▲ 6% proteasa a pH = 8). La línea continua representa los resultados obtenidos con el modelo de Weibull.

5.1.3 Modelado de las curvas de extracción

Las curvas de extracción obtenidas en la hidrólisis enzimática se han ajustado a los modelos empíricos descritos en el apartado 4.3.1. Los parámetros obtenidos se recogen en la Tabla 3. En general ambos modelos, a pesar de ser modelos empíricos proporcionaron buenos ajustes para las cinéticas de extracción con desviaciones cuadráticas medias de 6.54 y 6.56 para el modelo potencial y el modelo de Weibull, respectivamente. Las líneas continuas mostradas en las Figuras del 7 al 10 se corresponden con el modelo de Weibull, y como se puede observar gráficamente este modelo es capaz de describir las cinéticas de extracción de forma adecuada. Respecto al modelo potencial, se observa como en todas las cinéticas de extracción el exponente es inferior a la unidad, obteniendo curvas parabólicas con una gran pendiente inicial como se observa en las anteriores figuras, además, la constante B se hace mayor cuando mayor es la velocidad inicial de extracción de los componentes fenólicos, como se puede observar en los valores obtenidos al aumentar la concentración de celulasa en el medio. Por otra parte, el modelo de Weibull también obtiene valores del exponente inferiores a la unidad, no se observa una tendencia en la constante, k, si bien, si se observa un aumento en el valor de la constante, A, al aumentar los rendimientos de extracción, ya que esta constante representaría el valor máximo en la extracción de CPT; esta tendencia se puede observar claramente al aumentar la concentración de celulasa.

Tabla 3: Parámetros cinéticos para la cinética de extracción de CPT asistida por enzimas

Enzimas				Modelo potencial			Modelo de Weibull			
%Celulasa	%Xilanasa	%Proteasa	pH	B	n	RMSD	A	k	n	RMSD
6	0	0	Agua	0.38	0.33	8.6	3.86	0.071	0.49	9.2
0	0	0	5	0.46	0.30	5.8	4.16	0.075	0.46	8.3
6	0	0	5	3.2	0.10	2.3	10.46	0.346	0,4	2.4
0.25	0	0	5	0.65	0.15	2.1	3.59	0.1822	0.22	2.6
0.5	0	0	5	0.75	0.18	4.8	6.29	0.1093	0.24	6.5
1	0	0	5	1.11	0.17	5.8	7.74	0.1297	0.23	7.7
2	0	0	5	1.82	0.13	2.7	9.09	0.2075	0.17	3.0
4	0	0	5	2.50	0.13	3.5	9.99	0.2618	0.18	4.0
8	0	0	5	3.51	0.11	2.5	11.68	0.3149	0.16	3.4
0	6	0	5	0.97	0.25	3.1	9.16	0.0884	0.33	3.6
0	0	6	5	0.80	0.32	8.7	6.99	0.0761	0.51	7.2
3	3	0	5	0.60	0.29	9.4	5.80	0.0735	0.43	13.0
3	0	3	5	0.81	0.28	12.4	6.09	0.0729	0.55	11.2
2	2	2	5	0.57	0.34	12.2	6.10	00.049	0.59	12.7
0	0	6	6	0.85	0.32	11.4	7.94	0.0842	0.47	7.9
0	0	6	8	1.02	0.30	9.3	8.15	0.0868	0.47	2.3

RMSD: desviación cuadrática media

5.1.4 Análisis de otros compuestos presentes en los extractos

Se ha determinado la composición de los extractos obtenidos tras 24 de extracción mediante HPLC, salvo los correspondientes a la concentración de celulasa del 8% y las experiencias realizadas a pH 6 y 8 para la proteasa. Mediante esta técnica se ha podido cuantificar la cantidad de azúcares y ácidos formados debido a la acción hidrolítica de las enzimas utilizadas. Para algunos de los compuestos, se muestra su cuantificación en la Figura 11.a-f, como se puede observar, al aumentar la concentración de celulasa, aumenta la concentración de glucosa en el medio, al aumentar la actividad hidrolítica de la misma. Lo mismo ocurre con la galactosa y la arabinosa. Además, cuando se emplea únicamente celulasa como enzima hidrolítica, se generan cantidades importantes de ácido láctico y succínico, proveniente de la hidrólisis de la glucosa, mientras que cuando existía en el medio xilanasa y proteasa, se observa que no se produce a penas ni azúcares ni ácidos. Esto, puede ser debido, en el caso de la xilanasa, a la mayor producción de ácido acético en el medio que puede conducir a una inhibición de la actividad hidrolítica de la celulasa. En el caso de la no formación de glucosa en presencia de proteasa, se pueden estar liberando algún aminoácido libre que pueda inhibir la actividad de la misma. En cualquier caso, serán necesario más estudios para estudiar en profundidad el perfil de concentraciones estudiado.

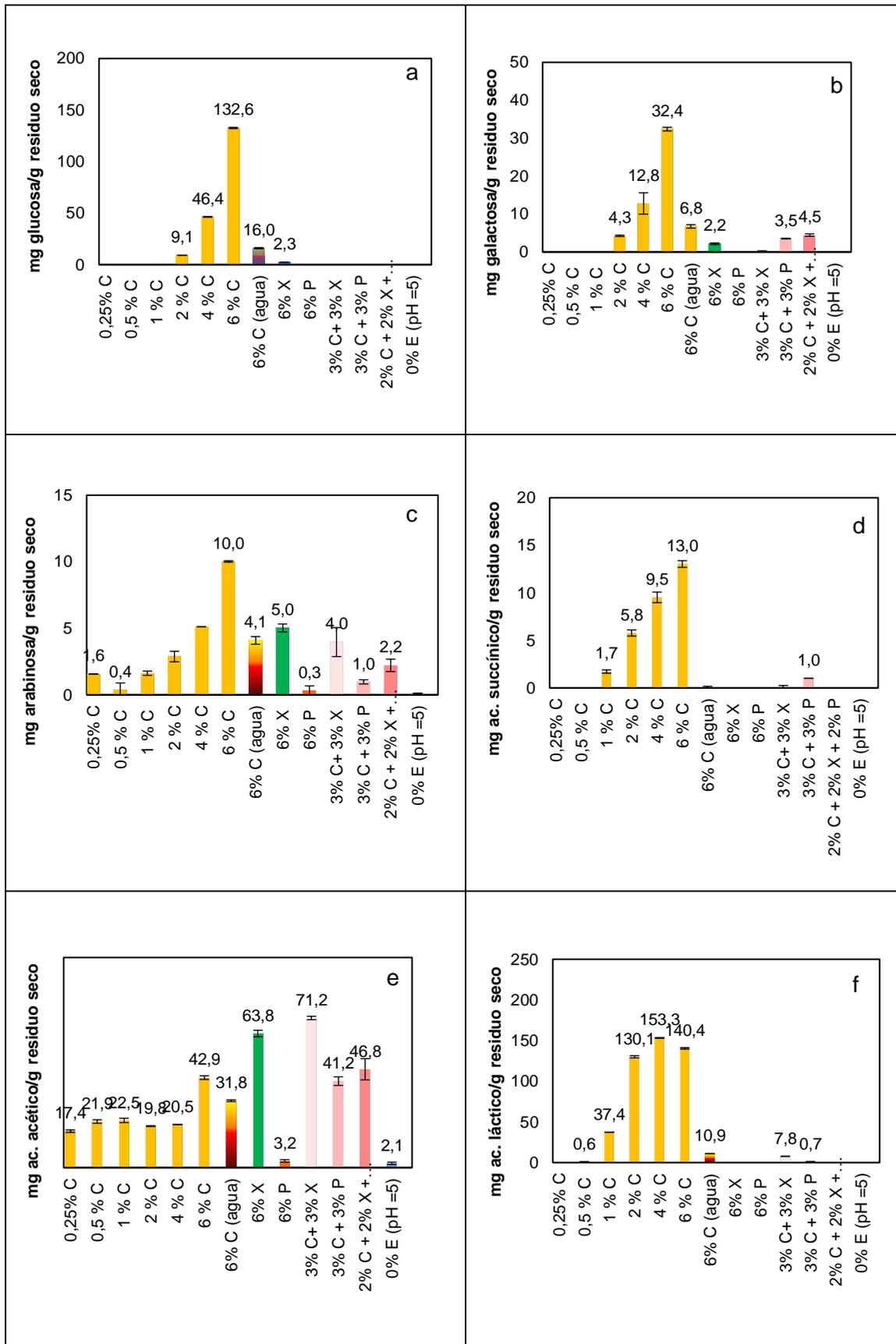


Figura 11a-f: Concentración de (a) glucosa (b) galactosa, (c) arabinosa, (d) ácido succínico, (e) ácido acético (f) ácido láctico en los extractos enzimáticos tras incubación durante 24h a 50°C. (pH =5, salvo en el caso del agua).

5.2 Extracción asistida por ultrasonidos (EAU)

Para comparar entre diferentes técnicas de extracción de CPT del residuo de *G. sesquipedale*, además de la extracción enzimática, se realizaron diferentes experiencias mediante EAU empleando diferentes disolventes, según se ha explicado en la sección experimental. Durante la EAU existen variables que están directamente relacionados con la eficiencia de extracción: tiempo, temperatura, tipo de disolvente y relación disolvente:materia prima utilizados. A continuación, se presenta los resultados obtenidos en el rendimiento de extracción mediante EAU de los polifenoles totales del residuo algal.

5.2.1 Efecto del disolvente, tiempo y temperatura

En primer lugar, se hizo un estudio con diferentes disolventes, agua destilada, metanol y etanol para determinar el rendimiento de extracción en CPT mediante EAU para una temperatura de 40°C durante 20 minutos de sonicación y una relación 5g_{residuo seco}:100mL disolvente (Tabla 4). Los resultados muestran un CPT de 0.66, 0.35 y 0.14 mg GAE/ g_{residuo seco} para las extracciones llevadas a cabo con agua, metanol y etanol al 100% v/v, respectivamente. Las diferencias observadas entre los tratamientos pueden deberse a la diferencia de polaridad de los compuestos fenólicos extraídos, que determinan la afinidad por el disolvente empleado, aunque también se debe tener en cuenta parámetros físicos de los disolventes como son la viscosidad, tensión superficial y la presión de vapor que pueden afectar principalmente al efecto de cavitación (Lorimer et al., 2002). La mayor eficiencia de extracción con agua puede ser debida a la mayor polaridad del mismo en comparación con el metanol y etanol, favoreciendo la solubilidad y difusión de los compuestos fenólicos, además el agua actúa como un agente de hinchamiento de la matriz vegetal, aumentando la superficie de contacto y, por tanto, favorece la extracción de los componentes fenólicos (García-Castello et al., 2015).

Tabla 4: Extracción de CPT mediante EAU con diferentes disolventes y a distintas temperaturas

Disolvente	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	CPT (mg GAE/g _{residuo seco})
Metanol	20	40	0.35±0.01
Etanol	20	40	0.14±0.01
Agua	20	40	0.66±0.02
Agua	20	50	0.85±0.01
Metanol:Agua	40	50	0.94±0.02

Se observa que al aumentar la temperatura de extracción desde 40°C a 50°C, el rendimiento de extracción para el agua aumentó casi un 30% (Tabla 4). En bibliografía consultada para procesos de EAU se ha observado que la cantidad de polifenoles disminuye a temperaturas altas (60°C) debido a que son compuestos que se degradan fácilmente con el calor y pueden causar reacciones de epimerización, como en el caso de la catequina (Wang & Helliwel et al., 2000). Sin embargo, a las temperaturas estudiadas durante el desarrollo de este trabajo no se ha observado tal efecto.

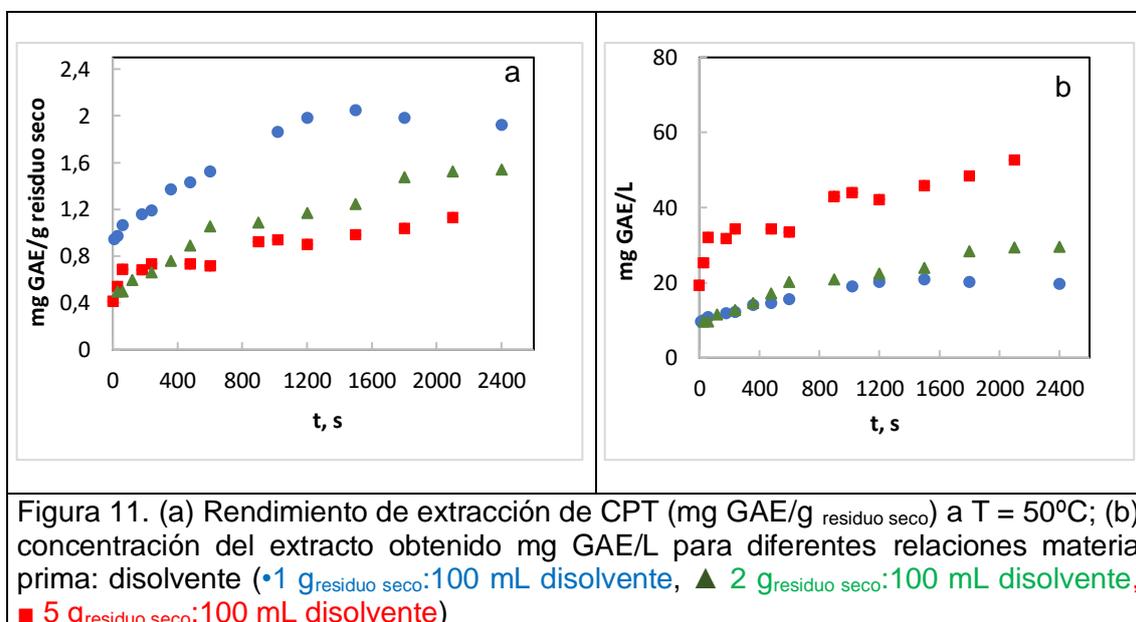
La amplitud de sonicación también juega un papel fundamental ya que a mayor amplitud se produce una mayor eficacia en la extracción debido a que un aumento de la amplitud ultrasónica induce un mayor número de cavidades, mejorando así el proceso

de extracción. Durante el desarrollo de este trabajo se mantuvo la amplitud al 100% por lo que no se evaluó su efecto.

En bibliografía se ha propuesto el uso de mezclas hidroalcohólicas (Rubén-Agregán et al., 2018, Rodríguez-Bernaldol de Quirós et al., 2009) debido a que las mezclas alcohol-agua permiten un efecto sinérgico entre los disolventes. Para evaluar este efecto se llevó a cabo una extracción con una mezcla metanol: agua a 50°C, obteniendo una concentración de 0.94 ± 0.02 mg GAE/ g_{residuo seco}.

5.2.2 Efecto de la relación disolvente:materia prima

Para mezclas metanol:agua (50:50 v/v) se determinaron las curvas de extracción de CPT mediante EAU a 50°C para diferentes relaciones disolvente/materia prima (Figura 11.a y 11.b)



En general, para todas las curvas de extracción se observa que durante el proceso de extracción se puede alcanzar hasta un 90% de recuperación durante los primeros 10-20 minutos. Selin Sahin et al. (2013), se refiere a este periodo como “etapa de lavado” en la que se produce la disolución de los componentes solubles sobre la superficie de la matriz vegetal (Tao et al., 2014). Si bien, tales autores también mencionan que existe una segunda etapa conocida como “etapa lenta” hasta aproximadamente los 60 minutos donde se produce la difusión de dichos componentes desde la matriz vegetal al disolvente. Varios autores han optimizado el proceso de EAU obteniendo un alto rendimiento de polifenoles a partir de diferentes algas en condiciones de 30°C, 60 minutos y potencia de 150 W (Dang et al., 2017) y 50°C, 45 minutos y potencia de 250W (Topuz et al., 2016) pero dado que, durante el proceso de EAU se busca minimizar el tiempo de extracción y el coste energético no se evaluaron tiempos superior a los 40 minutos.

Se puede observar que el rendimiento de extracción de CPT en mg GAE/g_{residuo seco} aumenta al aumentar la relación disolvente:sólido (Figura 11.a). Si bien, la

concentración del extracto en mg GAE/L, aumenta al aumentar la relación masa:disolvente. En estudios relacionados mencionan que la extracción se incrementa al aumentar esta relación lo que puede deberse al aumento de la potencia que se aplica por lo que éste es un factor clave que afecta a la extracción de los compuestos fenólicos. Una mayor potencia genera una mayor cavitación y permeabilidad de las membranas celulares por lo que se facilita la penetración del disolvente en la matriz y, por tanto, aumenta la eficacia de la extracción (Shirsath et al., 2012, Medina-Torres et al., 2017). Para las hojas de *Laurus nobilis* L, Muñiz-Márquez et al. (2013) encontró un mayor rendimiento de extracción en polifenoles en relación sólido:disolvente de 1:4, 1:8 y 1:12. La relación entre la potencia consumida por unidad de masa y la relación mL/g_{residuo seco} se puede observar en la Figura 12, junto con el rendimiento final de extracción. Se observa que la cantidad de energía consumida a la biomasa aumenta de forma pronunciada de 20 mL:g a 50mL por gramos, mientras que el descenso en el rendimiento de extracción no es tan brusco.

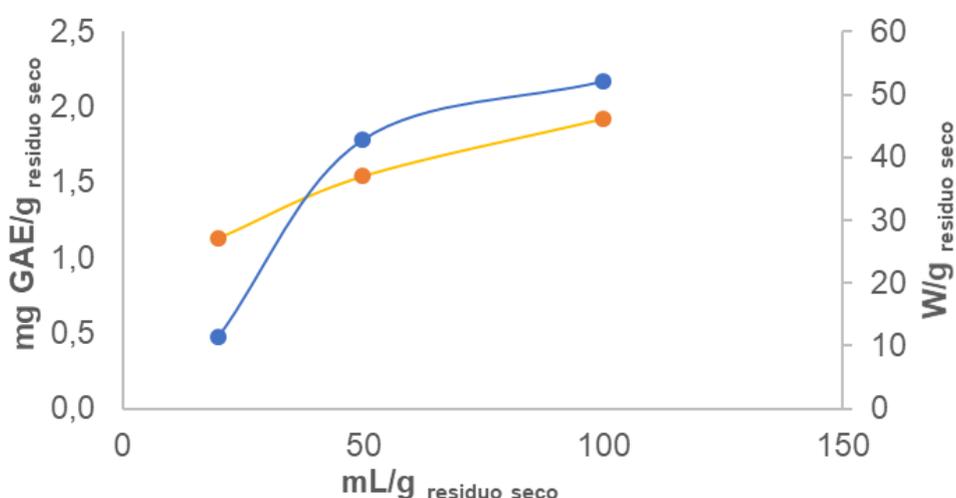


Figura 12: • Potencia consumida por unidad de masa (W/g_{residuo seco}), •Rendimiento de extracción de CPT (mg GAE/g_{residuo seco}) para mezclas metanol:agua (50:50 v/v)

En general los rendimientos de extracción son inferiores a los encontrados mediante hidrólisis enzimática. De acuerdo con Wijeshinge & Jeon et al. (2012), la cantidad, diversidad, y complejidad de los polisacáridos que forman parte de la pared celular de las algas podrían reducir la eficiencia de extracción, especialmente con los métodos clásicos. En términos de métodos de extracción, la EAE de los extractos acuosos son las que presentan una mayor eficiencia frente a la EAU y el método convencional debido a que en las algas la eficiencia de extracción se encuentra limitada por la presencia de paredes celulares complejas y, por tanto, la degradación de su estructura es un paso fundamental para la liberación de los componentes bioactivos.

También se debe tener en cuenta factores que afectan directamente al proceso de extracción como son el tiempo y la temperatura. En el caso de la EAU sólo se llevó a cabo durante 40 minutos y a temperatura que no superan los 40°C en comparación con la EAE que se llevó a cabo durante 24h y a temperaturas de 50°C. El efecto de estas variables fue estudiado por varios autores, Lee et al. (2013), quién evaluó el uso de EAU de extractos acuosos y metanólicos de *Ecklonia cava* (especie de alga marrón) y reportó un valor de rendimiento de extracción ligeramente superior a las 6 y 12h a

30°C en un ultrasonido a 200W (31.3-34.4%) frente a la incubación a temperatura ambiente (28.7%). Estudios similares llevados a cabo por el CESAM (*Centre for Environmental and Marine Studies and Department of Chemistry*) sobre el impacto de los métodos de extracción asistidos por enzimas y ultrasonidos sobre las propiedades biológicas de *Sargassum muticum*, *Osmundea pinnatifida* y *Codium tomentosum* (especies de algas rojas, marrón y verdes) revelaron lo predicho en este trabajo en el que obtienen altos porcentajes de compuestos fenólicos empleando la EAE en comparación con la EAU y el método convencional de hidrólisis con agua.

5.3 Extracción con agua subcrítica

La Figura 13 representa la curva de extracción de polifenoles totales empleando agua subcrítica a una temperatura de 200°C, 50 bares de presión, flujo de 8 mL/min y una relación de 80 mL de agua/ g_{residuo seco} representada como el contenido acumulado total en función del tiempo. Se puede observar que el CPT va aumentando con el tiempo hasta los 100 minutos en el que se obtiene un máximo de 13.25 mg GAE_{acumulado/g_{residuo seco}}.

El empleo de agua subcrítica mejora enormemente el proceso de extracción de los componentes fenólicos presentes en la biomasa algal respecto a las otras dos técnicas de extracción anteriormente descritas consiguiendo un mayor incremento en la extracción de CPT respecto a las extracciones con agua en las anteriores condiciones. Esta mayor eficiencia en la extracción de componentes fenólicos se puede relacionar en gran parte por el cambio en el comportamiento del agua al aumentar la temperatura por lo que sus propiedades como disolvente se ven modificadas. El producto iónico del agua (K_w) depende en gran medida de la temperatura disminuyendo al aumentar la misma. El K_w es relativamente alto en el rango de condiciones subcríticas (10^{-12} comparada con las 10^{-14} en condiciones normales ambientales). Los altos niveles de H^+ y OH^- en condiciones subcríticas significa que muchas reacciones catalizadas por ácidos o bases, como la hidrólisis de la biomasa, se encuentren aceleradas. En este sentido, un descenso del K_w hace que el pH del medio sea más ácido favoreciendo de esta manera la hidrólisis de componentes bioactivos unidos a la pared vegetal tales como los compuestos fenólicos que se pueden encontrar en la matriz vegetal en tres formas: libres, solubles (esterificados a compuestos de bajo peso molecular) e insolubles (unidos a la matriz por medio de enlaces tipo éster/éter a los componentes de la pared celular) (Acosta-Estrada et al., 2014) por lo que empleo de altas temperaturas favorece la liberación de los compuestos fenólicos ya que muchos de ellos se encuentran esterificados a la hemicelulosa y los enlaces tipo éster son lábiles a 170°C. Esta hidrólisis parcial de la hemicelulosa conlleva la liberación de ácido acético al medio de reacción lo cual implica también un descenso del pH del medio de reacción facilitando de esta manera la hidrólisis de la biomasa y con ella una mayor extracción de los componentes bioactivos de interés.

Por otra parte, la constante dieléctrica del agua también se ve afectada en condiciones subcríticas tal y como se ha explicado en la sección 3.3. Esta disminución en la constante dieléctrica permite una disminución de su polaridad y por tanto un incremento en la solubilidad de los compuestos orgánicos hidrofóbicos a la vez que permite una solubilización de la celulosa (insoluble en agua en condiciones normales) permitiendo de esta manera una mayor liberación de los componentes presentes en el interior y exterior de las paredes celulares. Por otro lado, las altas temperaturas permiten

una disminución de la viscosidad por lo que permite una mayor penetración del disolvente sobre la matriz vegetal.

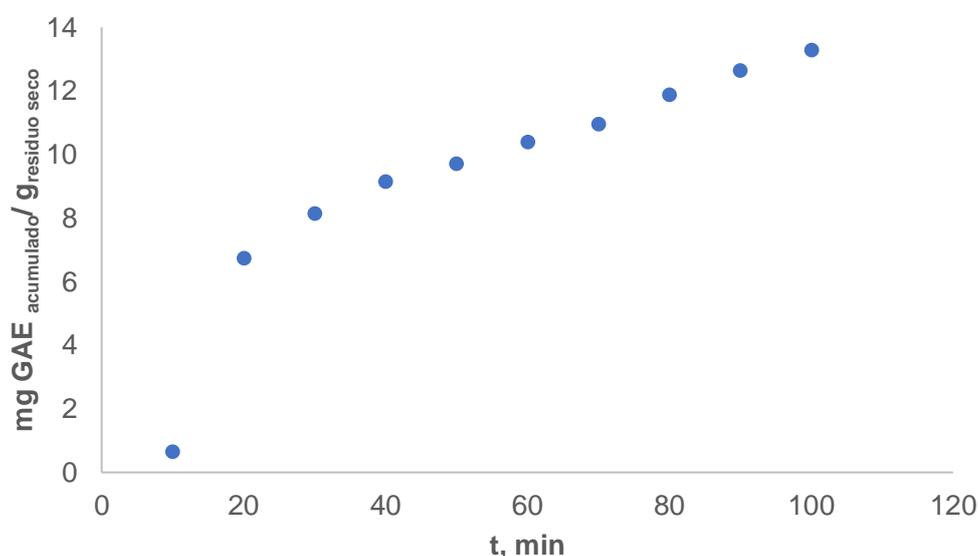


Figura 13: • Curva de extracción de CPT con agua presurizada a 200°C, 50 bares, flujo de 8 mL/min y relación 80mL agua/ g_{residuo seco}.

6. Conclusiones y trabajos futuros

En este estudio se ha podido comprobar que el residuo algal procedente de la industria de producción del agar-agar posee altos contenido de componentes fenólicos fácilmente extractables mediante la combinación de tecnologías limpias y disolventes verdes que son respetuosos y seguros con el medio ambiente. Los resultados revelan que la aplicación de diversas enzimas permite una mayor extracción de los componentes fenólicos frente a las llevadas a cabo con disolventes orgánicos e hidrólisis con agua. La concentración, el tipo de enzima y el pH del medio son factores que afectaron en gran medida al porcentaje de extracción obteniendo un incremento del 264% en el CPT al variar la concentración de celulasa del 0.25 w/w al 8% w/w a su pH óptimo mientras que variaciones en el pH de actuación de la celulasa provocó una disminución de casi el 82% en el CPT. Así mismo, el empleo de otras enzimas como la proteasa al 6% w/w a pH 8 permitió introducir mejoras en el proceso de extracción obteniendo 7.7 mg GAE/g_{residuo seco} frente a los obtenido con la celulasa a la misma concentración (6.57 mg GAE/ g_{residuo seco}) mientras que el empleo de xinalasa al 6% w/w no produjo mejora en los resultados. La acción de la celulasa y proteasa nos permite revelar que los componentes fenólicos pueden no encontrarse únicamente en la pared celular de las algas sino también formando fuertes complejos con las proteínas. Mediante HPLC se ha podido cuantificar la presencia de otros componentes en los extractos como glucosa y productos de su hidrólisis (ácido láctico y succínico entre otros) además de altas concentraciones de galactosa y arabinosa. El empleo de combinaciones de enzimas no produjo mejoras en la extracción de CPT debido a posibles inhibiciones entre las mismas como se pudo comprobar en el caso de las combinaciones celulasa-xilanasa debido a la mayor producción de ácido acético y

celulasa-proteasa debido a la liberación de algún aminoácido que afectan a la acción hidrolítica de la celulasa. Los trabajos futuros se centrarán principalmente en el estudio de este efecto.

El empleo de extracción asistida por ultrasonido no introdujo mejoras en el proceso de extracción obteniendo resultados inferiores a 1 mg GAE/g_{residuo seco} los cuales se puede atribuir al gran número de variables que implican la utilización de esta técnica entre las que se encuentra la temperatura, potencia, amplitud y tiempo de sonicación. Finalmente, el empleo de agua presurizada como técnica de extracción de CPT revelaron los mejores resultados respecto a las técnicas anteriormente propuestas. Se consigue un alto CPT de 13.25 mg GAE/g_{residuo seco} debido a la modificación en diversos parámetros físico-químicos cuando se utiliza agua en condiciones subcríticas frente al agua en condiciones normales como pueden ser su producto iónico, constante dieléctrica y viscosidad.

Bibliografía

- Abd, E., H.H., El-Baz, F.K., y El Baroty, G.S. (2010). Enhancing antioxidant availability in wheat grains from plants grown under seawater stress in response to microalgae extract treatments. *Journal Science and Food Chemistry*, 90 (2), 299-303, doi:10.1002/jsfa.3815
- Acosta-Estrada, B.A., Gutiérrez-Urbe, J.A., y Serna-Saldivar, S.O. (2013). Bound phenolic in food: a review. *Food Chem*, 152, 46-55, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.093
- Agregán, R., Munekata Paulo, E.S., Franco, D., Carballo, J., Barba, F.J., y Lorenzo, J.M. (2018). Antioxidant Potential of Extracts Obtained from Macro- (*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcate*) and Micro-Algae (*Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*) Assisted by Ultrasound. *Medicines*, 5, 33, doi: 10.3390/medicines5020033
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A, Munro, M.H.G., y Prinsep, M.R. (2016). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 33(3), 382-431, doi:10.1039/c5np00156k.
- Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., y Albert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanism, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560, doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.035
- Dang, T.T., Voung, Q.V., Schreider, M.J., Bowyer, M.C, Van Altena, I.A., y Scarett, C.J. (2017). Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for phenolic content and antioxidant activities of the alga *Hermosira banksia* using response surface methodology. *Journal of Applied Phycology*, 29, 977-984, doi:10.1007/s13197-017-3005-x.
- Devi, G.K., Manivannan, K., Thirumaran, G., Rajathi, A.A., y Anantharaman, P. (2011). In vitro antioxidant activities of selected seaweeds from Southeast coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(3), 205-11, doi:10.1016/S1995-7645(11)60070-9
- Eppink, M.H.M., Olivieri, G., Reith, H., van den Berg, C., Barbosa, M.J., y Wijffels, R.H. (2017). From Current Algae Products to Future Biorefinery Practices: A Review. *Adv. Biochem Eng Biotechnol*, 166, 99-123, doi:10.1007/10_2016_64

- Garcia-Castello, E.M., et al., (2015). Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradise L.*) solid wastes. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1114-1122, doi: 10.1016/j.lwt.2015.07.024
- Heo, S.J., Park, E.J., Lee, K.W. et al., (2005). Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour Technol*, 96(14), 1613-23, doi: 10.1016/j.biortech.2004.07.013
- Hossain, M.M., Li, B.B y Smith, B. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: II Enzyme-assisted extraction methods, 48,182-188, doi: 10.1016/j.seppir.2005.07.005
- Kitanović, S., Milenović, D. y Veljković, V.B., (2008). Empirical kinetic models for the resinoid extraction from aerial parts of St. John's wort (*Hypericum perforatum L.*). A review. *Biochemical Engineering Journal*, 41, 1-11, doi: 10.1016/j.bej.2008.02.010
- Lee, S.H., Kang, M.C., Moon, S.H., Jeon. B.T., & Jeon, Y.J. (2013). Potential use of ultrasound in antioxidant extraction from *Ecklonia cava*. *Algae*, 28(4), 371-378, doi:10.4490/algae.2013.28.4.371
- Mason, T.J., Lorimer, J.P. (2002). *Applied Sonochemistry: Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing*, Wiley-VCH Verlag. Recuperado de <https://doi.org/10.1002/jctb.957>
- Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., y Espinosa-Andrews, H. (2017). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*, 7(3), 47, doi: 10.3390/agronomy7030047
- Muñiz-marquéz, D.B.et al., (2013). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis L.* and their antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1149-54, doi: 10.1016/j.ultsonch.2013.02.008
- Ortiz, J., Urquiche, E., Robert, P., Romero, N., Quitral, V. y Llantén, C. (2009). Functional and nutritional value of the chilean saweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and *Macrocystis pyrifera*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 7-320, doi:10.1002/ejit.200800140
- Pico, Y., (2013). Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 43,84-89, doi:10.1016/j.trac.2012.12.005
- Rodríguez- Bernaldo de Quirós, A., Lage-Yusty, M.A. y López-Hernández, J. (2009). Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. *Food Chemistry*, 121, 634-638, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.12.078
- Rodríguez, D., Sousa, R., Silva, A., Amorim, M. y Pereira, L. (2015). Impact of Enzyme- and Ultrasound- Assisted Extraction Methods on Biological Properties of Red, Brown, and Green Seaweeds form the Central West Coast of Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 3177-3188, doi: 10.1021/jf504220e
- Rostagno, M.A., Palma, M. Barroso, C.G., (2003). Ultrasound-assisted extraction of isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012(2), 119-128, doi: 10.1016/20021-9673(03)01184-1

- Selin Sahin, R.S. (2013). Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 595-602, doi: 10.1016/j.ultsonch.2012.07.029
- Shirsath, S.R., Sonawane, S.H., y Gogate, P.R. (2012). Process intensification of extraction of natural product using ultrasonic irradiation: A review of current status. *Chemical Engineering and Processing*, 53, 10-23, doi: 10.1016/j.cep.2012.01.003
- Siriwardhana, N., Kim, K.N., Lee, K.W., Kim, S.H., Ha., J., Song, C.B., et al. (2008). Optimization of hydrophilic antioxidant extraction from *Hizikia fusiformis* by integrating treatments of enzyme, heat and pH control. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(4), 587-596, doi: 10.1111/j.1356-2621.2006.01485.x
- Tao, Y. et al., (2014). Ultrasound-assisted extraction of phenolic from wine lees: Modeling, optimization and stability of extracts during storage., 21(2), 706-715, doi: 10.1016/j.ultsonch.2013.09.005.
- Topuz, O.K., Gokoglu, N., Yerlikaya, P., Ucak, I., y Gumus, B. (2016). Optimization of Antioxidant Activity and Phenolic Compound Extraction Conditions from Red Seaweed (*Laurencia obtuse*). *J.Aquat. Food Production Technology*, 25(3), 414-422, doi: 10.1080/10498850.2013.868844
- Trostchansky, A., Quijano, C., Yadav, H., Kelley, E.E., y Cassina, A.M. (2016). Interplay between Oxidative Stress and Metabolism in Signaling and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, doi: 10.1155/1017/7013972
- Wang, H., Helliwell, K. (2000). Epimerization of catechins in green tea infusions. *Food Chemistry*, 70(3), 337-344, doi: 10.1016/S0308-8146(00)00099-6
- Wang, T., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H.G., Jónsson, J.O., Thorkelsson, G., y Ólafsdóttir, G., (2010). Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*. *Food Science and Technology*, 43,1387-1393, doi: 10.1016/j.lwt.2010.05.010
- Wargacki, A.J., Leonard, E., Win, M.N., Regitsky, D.D., Santos, C.N.S., Kim, P.B., Cooper, S.R. et al. (2012). An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science*, 335(6066), 308-13, doi: 10.1126/science.1214547
- Wells, M.L., Potin, P., Craigie, J.S., Raven, J.A., Merchant, S.S., Helliwell, K.E., Smith, A.G. et al. (2016). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology*, 29(2), 949-982, doi: 10.1007/a10811-016-0974-5.
- Wijesinghe, W.A. y Jeon, Y.J. (2012). Enzyme-assisted extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: A review. *Fitoterapia*, 83, 6-12, doi: 10.1016/j.fitote.2011.10.016
- Young, R.M., Schoenrock, K.M., von Salm, J.L, Amsler, C.D., y Baker, B.J. (2015). Structure and Function of Macroalgal Natural Products. *Methods Mol Biol*,1308, 39-73, doi: 10.1007/978-1-4939-2684-8_2