

STANDARDIZATION OF PARTIAL LEAST SQUARES REGRESSION FOR DIRECT DETERMINATION OF POLYPHENOLS AND ANTIOXIDANTS THROUGH NEAR-MID-INFRARED SPECTROSCOPIC TECHNIQUES IN *Macrocystis pyrifera*

Beratto Angelo^{1,2}, Agurto Andrés², Agurto Cristian² & Castillo Rosario^{2,3}

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción-Chile; ²Grupo Interdisciplinario de Biotecnología Marina, Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Concepción-Chile; ³Departamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción-Chile.

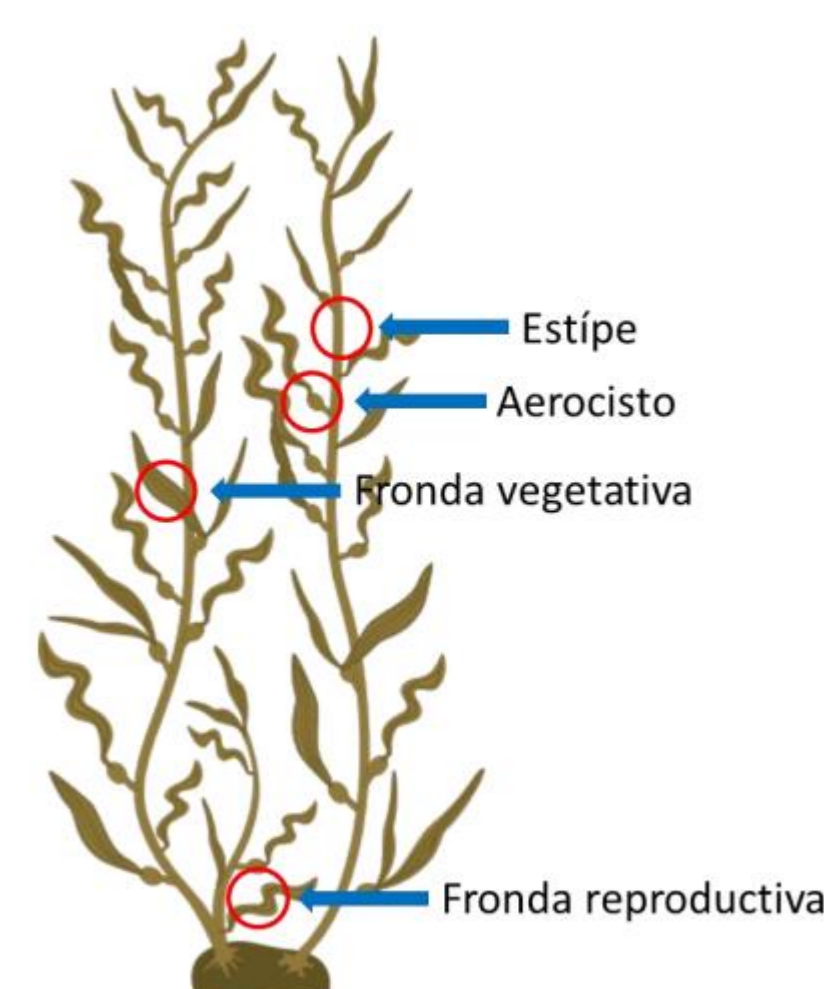


Fig.1. Diagrama de *Macrocystis pyrifera*.

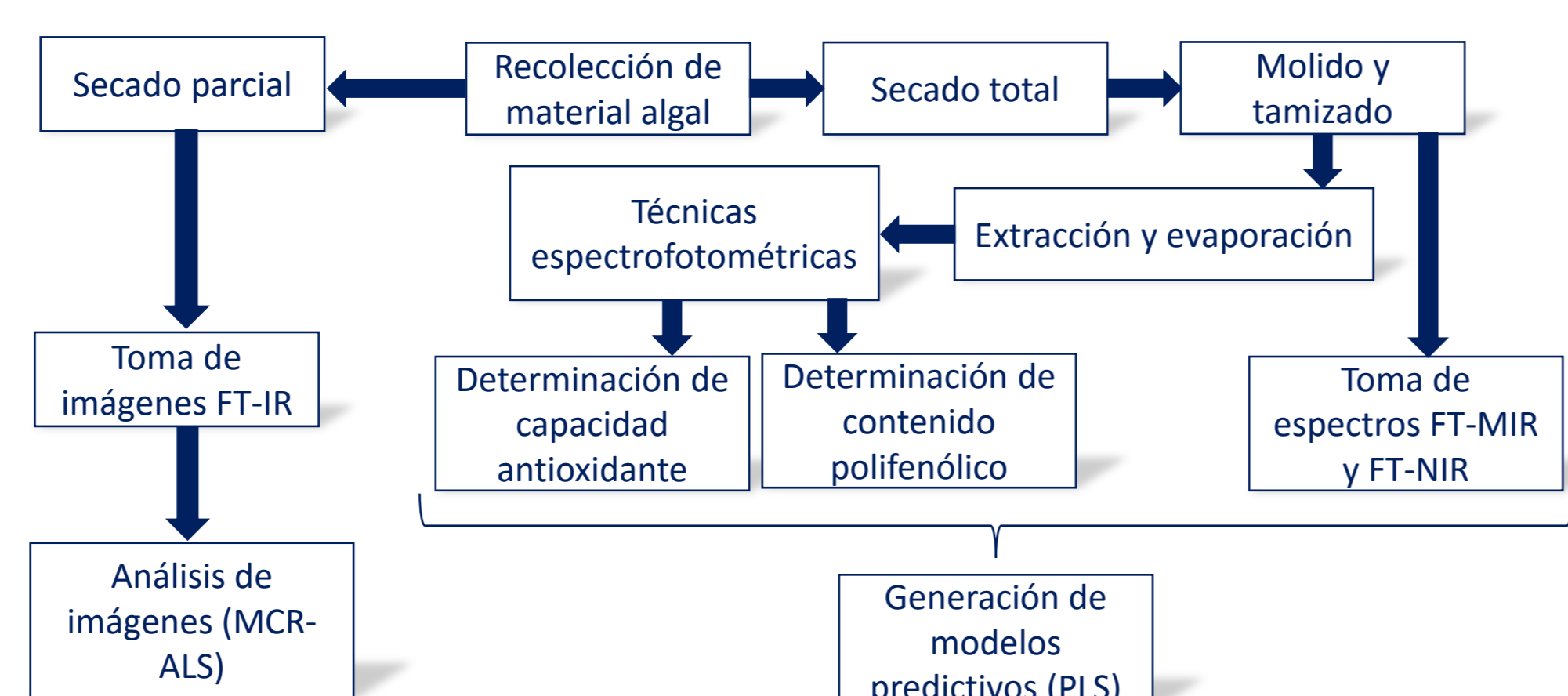


Fig.2. Diagrama de la Metodología.

IR	Preproc	Transf	Y	PC's	%Var Exp	rCal	rVal	RPDcv	RPDev
FT-MIR	C-M	1 der	Cap Antiox	7	95,0156	0,9861	0,9289	2,715	2,754
	C-M	1 der + SNV	Cont Polif	7	95,1859	0,9875	0,9403	2,977	3,138
FT-NIR	C-M	Nada	Cap Antiox	10	99,9947	0,9817	0,9407	2,978	3,888
	C-M	log10	Cont Polif	10	99,9927	0,9898	0,9582	3,537	3,035

Tabla 1. Resumen de resultado de los mejores modelos predictivos para capacidad antioxidante y contenido polifenólico a partir de espectro FT-MIR y FT-NIR.

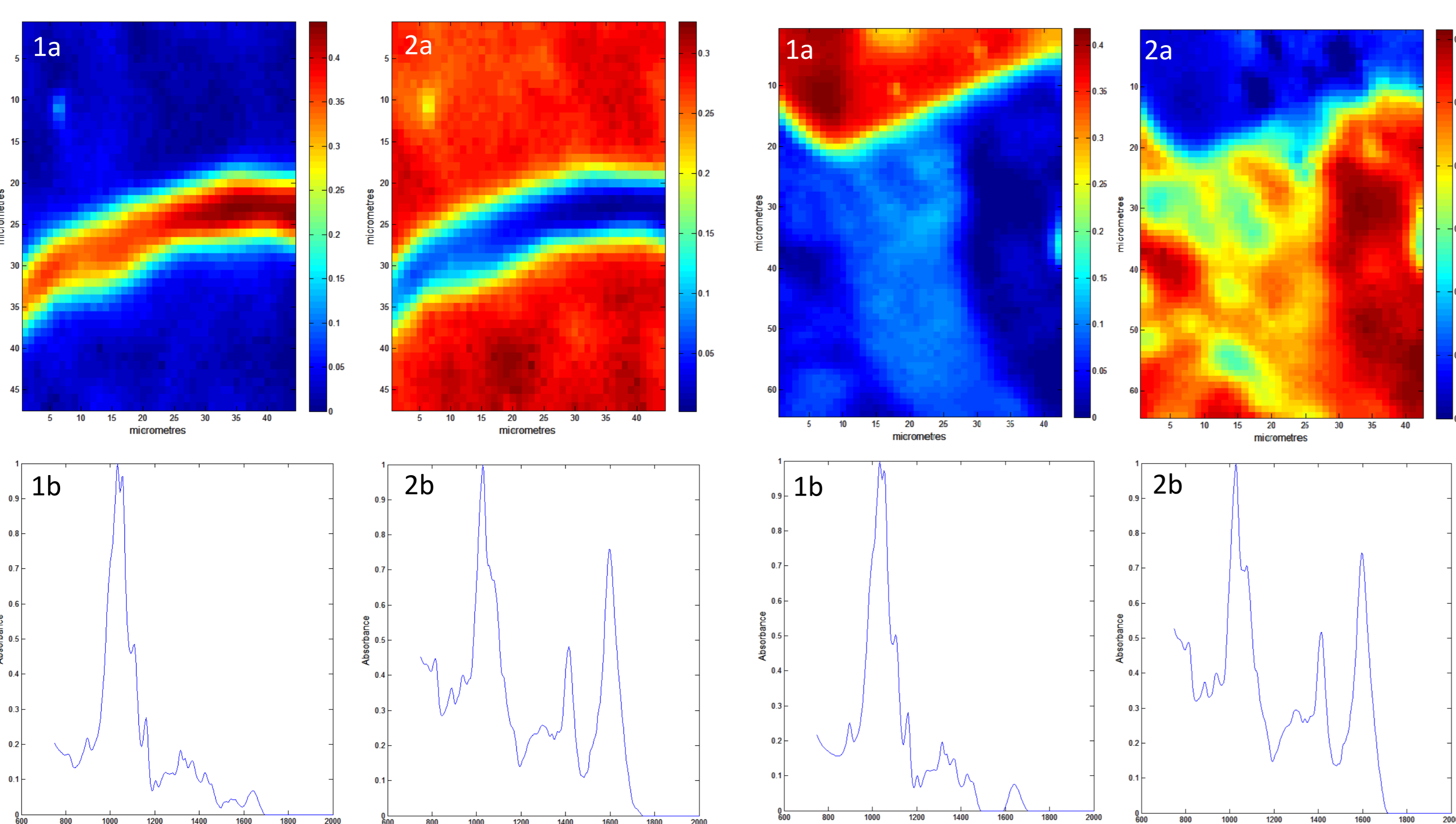


Fig.3. Imagen FT-IR de aerocisto. (1a) Mapa de concentración relativa de (1b) espectro de celulosa. (2a) Mapa de concentración relativa de (2b) espectro de alginato.

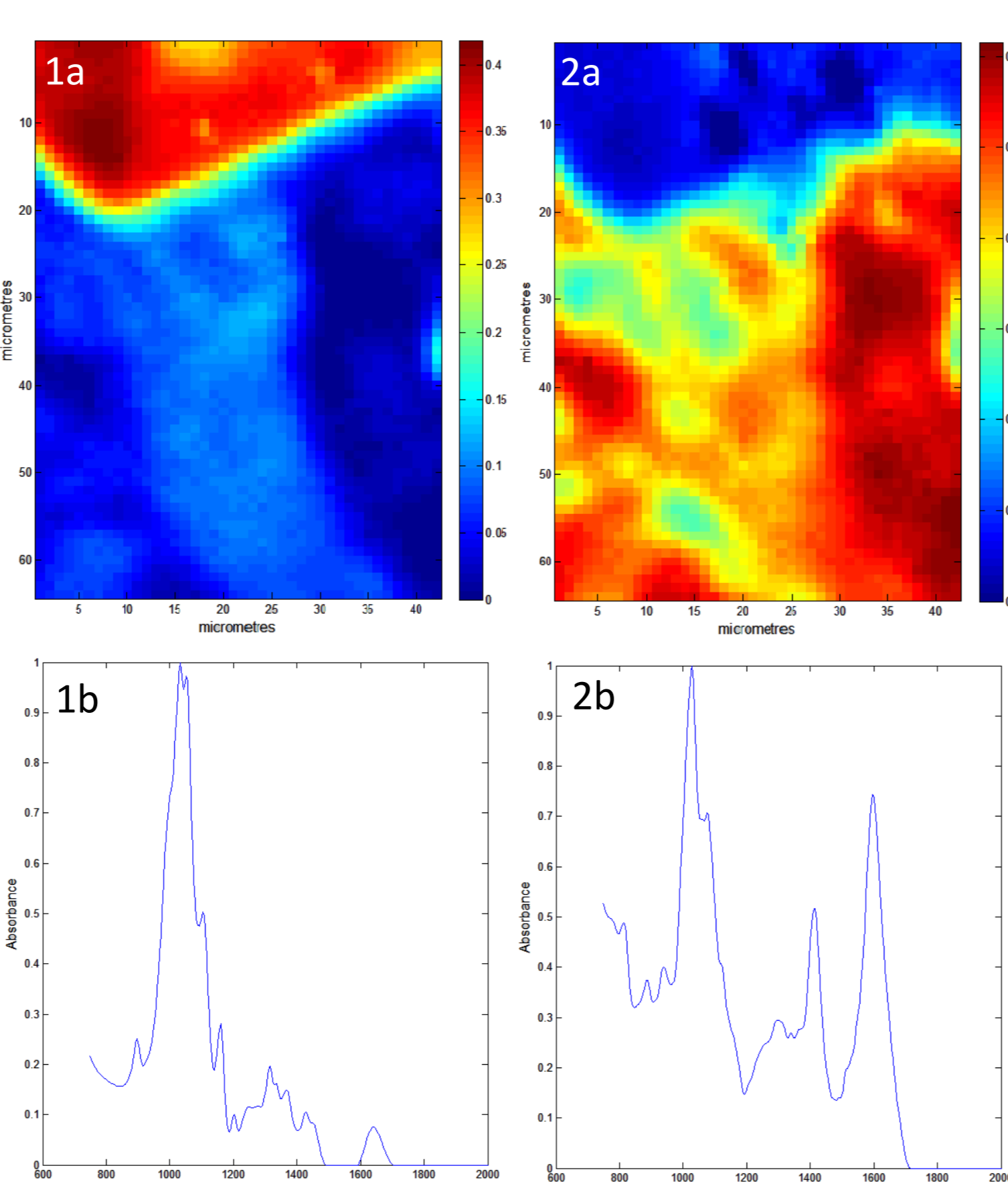


Fig.4. Imagen FT-IR de estipe. (1a) Mapa de concentración relativa de (1b) espectro de celulosa. (2a) Mapa de concentración relativa de (2b) espectro de alginato.

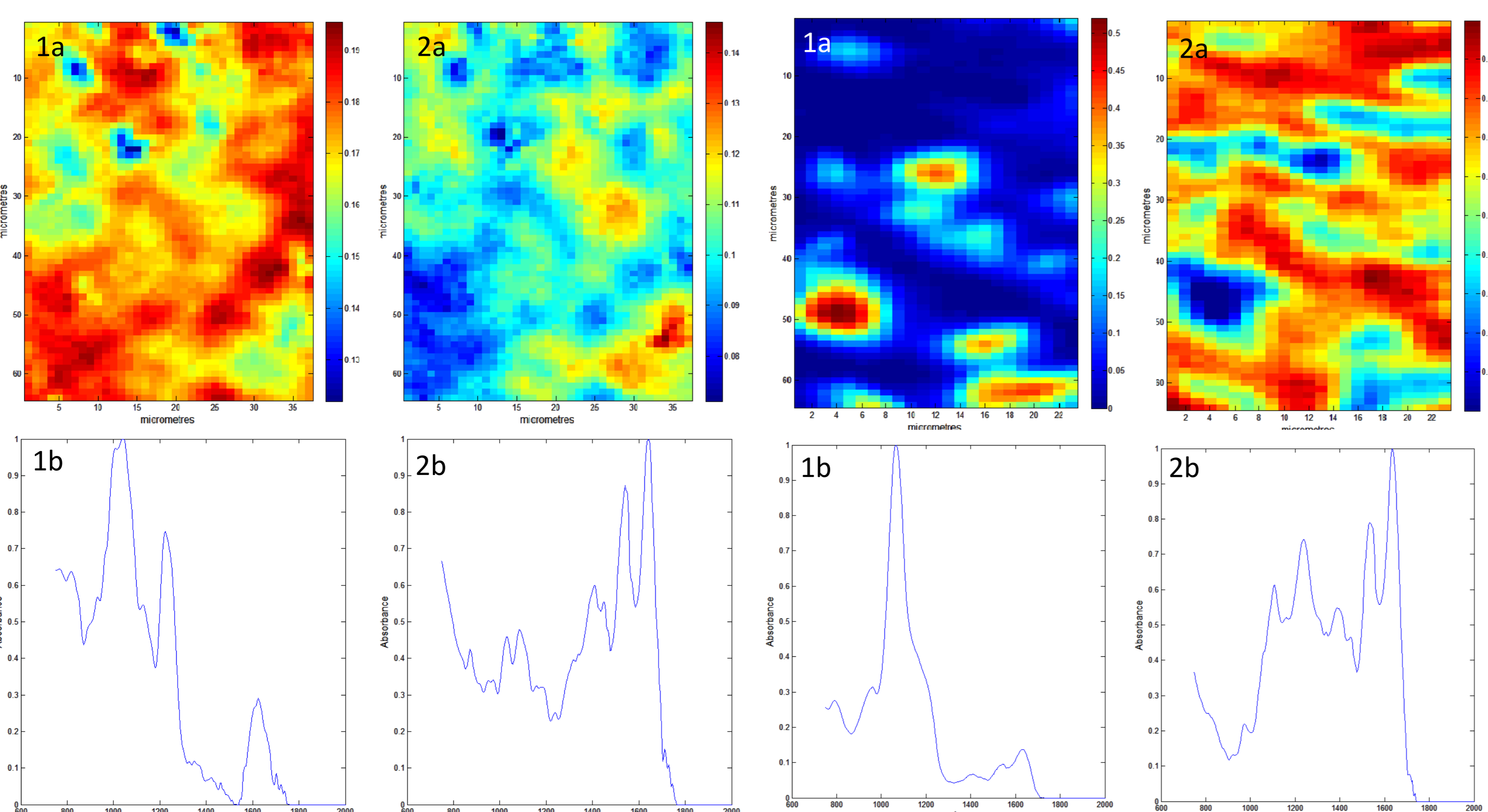


Fig.5. Imagen FT-IR de fronda reproductiva. (1a) Mapa de concentración relativa de (1b) fucoidano. (2a) Mapa de concentración relativa de (2b) proteínas.

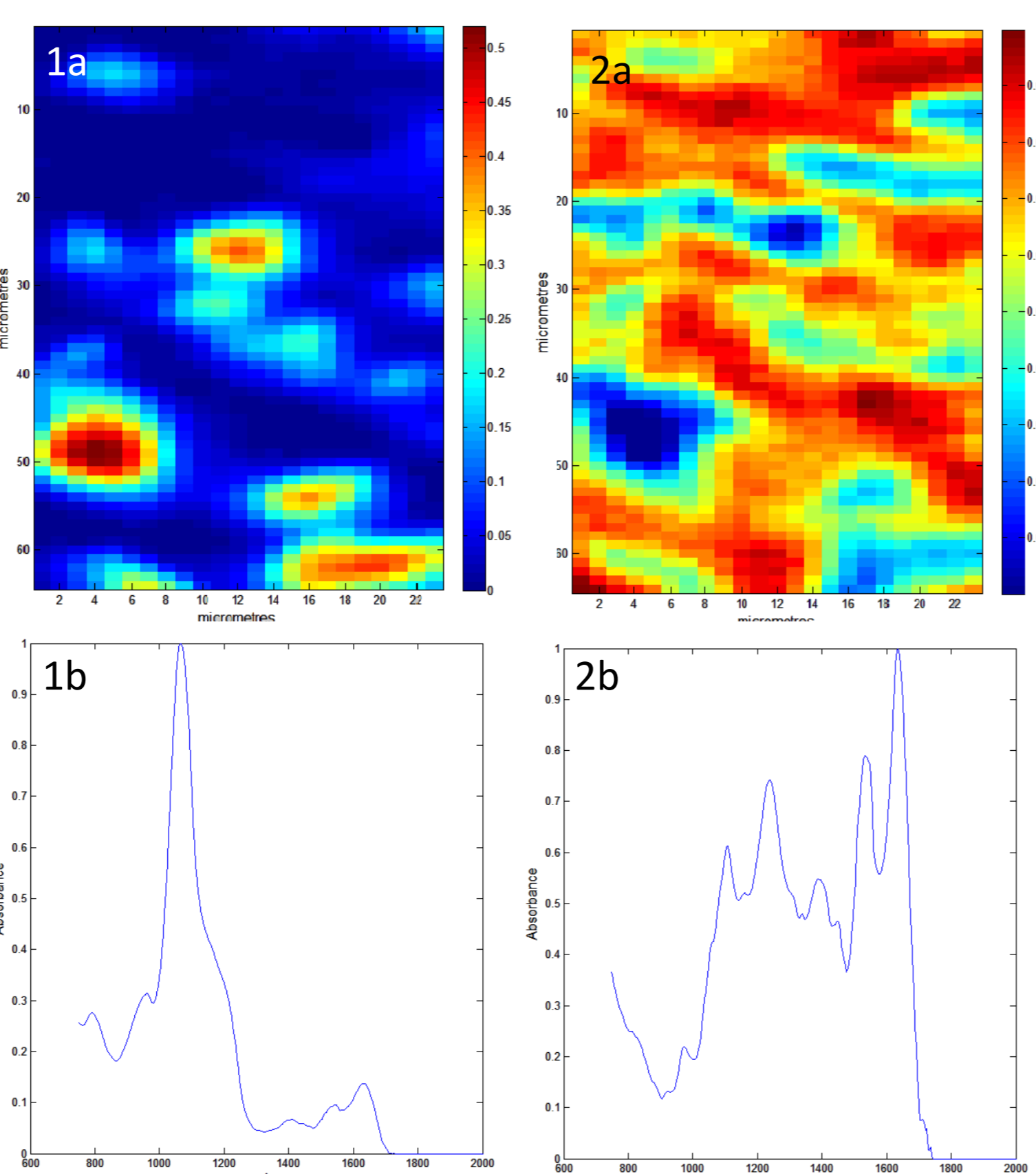


Fig.6. Imagen FT-IR de fronda vegetativa. (1a) Mapa de concentración relativa de (1b) laminarina. (2a) Mapa de concentración relativa de (2b) proteínas.

ABSTRACT: Seaweeds possess diverse compounds that have been used in food, pharmacology and biomaterials industries. Among these compounds, polyphenols are important because of their Antioxidant capacity, which has been analyzed in this work with the aim of generating bioactive materials, particularly paper. For the generation of paper, alginate constitutes an interference because of its rheological properties. Current methods of compound characterization require the use of extraction and spectrophotometric analysis methods. On the other side, infrared spectroscopy is fast, repeatable and requires small samples with minimal pre-treatment. The main objective of this work is to assess the use of spectroscopic techniques in brown seaweed *Macrocystis pyrifera*. On one side, near and mid infrared spectroscopy was evaluated for direct polyphenol and antioxidant capacity determination. This was performed through Partial Least Squares (PLS) regression method. On the other side, the use of FT-IR imaging was assessed for the analysis of fresh seaweed samples to characterize main chemical components. This second assessment was performed by the use of Multivariate Curve Resolution with Alternating Least Squares (MCR-ALS) method. Samples of *Macrocystis pyrifera* were collected and separated in four morphological structures: air bladder, stipe, vegetative frond and reproductive frond. In relation to PLS regression, total polyphenolic content and antioxidant capacity were measured by using Folin-Ciocalteu and ABTS•+ as reference methods respectively. In addition, dried samples where measured for near and mid infrared spectroscopy. In terms of MCR-ALS analysis, fresh structure samples were measured for FT-IR imaging. The results of PLS showed proper adjustment between regression models and reference methods, proving Residual Predictive Deviation greater than 2,5. In the case of MCR-ALS, results showed differences in polysaccharide contents of each morphological structure, showing mostly alginate and cellulose in the air bladder and stipe, fucoidan and proteins in the reproductive fronds and laminarin and proteins in the vegetative fronds. These results demonstrate the applicability of spectroscopic techniques as analytical tools to be used in the development of functional biomaterials.

INTRODUCCION: Chile se ha posicionado como uno de los principales países exportadores de algas pardas, esto principalmente orientado a la producción de alginato (1). Sin embargo, se han caracterizado diversos metabolitos secundarios que, dada su actividad biológica, poseen el potencial de generar nuevos productos con valor agregado (2). Tal es el caso de los florotaninos, compuestos polifenólicos con capacidad antioxidante (3). Para facilitar el buen uso de materias primas, es de gran importancia el uso de técnicas analíticas que optimicen los tiempos de caracterización y cuantificación de los componentes de interés. Los métodos de espectroscopia infrarroja son idóneos por ser rápidos y requerir pocas cantidades de muestra con mínimos pretratamientos (4, 5). El objetivo de este trabajo fue evaluar el uso de las técnicas de espectroscopia infrarroja y análisis quimiométrico para la caracterización y cuantificación de componentes de interés comercial en las distintas estructuras morfológicas de la especie *Macrocystis pyrifera*. Por un lado se realizó una caracterización a nivel microscópico de los principales componentes químicos presentes en las muestras utilizando la técnica de microespectroscopia FT-IR de imágenes en modo ATR y el método de resolución multivariada de curva con mínimos cuadrados parciales (MCR-ALS). Por otro lado se utilizaron las técnicas convencionales de espectroscopia infrarroja y cercana con transformadas de Fourier (FT-MIR y FT-NIR), en combinación con el método de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) para la generación de un modelo predictivo que permita la determinación directa de contenido polifenólico y capacidad antioxidante a partir de los espectros de infrarrojo.

METODOLOGIA: Se obtuvieron 12 individuos de la especie *Macrocystis pyrifera*, cada uno de estos fue separado en sus cuatro estructuras morfológicas, aerocisto, estipe, fronda vegetativa y fronda reproductiva. Las muestras fueron molidas y tamizadas. Se realizaron extracciones semicontinuas en acetona:agua 70% por 4 h. Los extractos fueron centrifugados y se evaporó la porción de acetona en un evaporador. La determinación de contenido polifenólico y capacidad antioxidante se determinó mediante los métodos espectrofotométricos de Folin-Ciocalteu (6) y del radical ABTS•+ (7), respectivamente. Para la obtención de espectros de infrarrojo, se utilizaron algas secas, molidas y tamizadas. Para el caso de FT-MIR, la medición fue realizada en transmitancia utilizando discos de KBr, mientras que en el caso de FT-NIR, la medición fue realizada directamente en reflectancia difusa. El método de regresión de PLS fue realizado utilizando el software *Pirouette 4.5 (Infometrix)*. Para la validación de los modelos predictivos generados se utilizaron los métodos de validación cruzada (leave-one-out) y validación externa. La selección de estos se realizó en base al coeficiente de correlación de Pearson de calibración (RCal) y validación cruzada (RVal), y la desviación residual predictiva de validación cruzada (RPDcv) y de validación externa (RPDev). Para el análisis microscópico, se utilizaron muestras secadas a temperatura ambiente por aproximadamente 8 horas, y se obtuvieron imágenes con un tamaño de pixel de 1,56 μm. El análisis de estas por MCR-ALS fue realizado en el software *Matlab (Mathworks)*.

RESULTADOS:

- ❖ El preprocesamiento que generó los mejores modelos fue, en todos los casos, centrado a la media.
- ❖ Para el caso de los espectros de FT-MIR, la data fue suavizada, normalizada, se corrigió su línea base y se calculó su primera derivada. Para el caso del modelo de contenido polifenólico, además se utilizó SNV (Tabla 1).
- ❖ Para el caso de los espectros de FT-NIR, sólo se calculó el log10 para el contenido polifenólico (Tabla 1).
- ❖ El número de componentes principales (PC's) utilizados en los modelos de FT-MIR fue de 7, con una varianza explicada por sobre el 95% (Tabla 1).
- ❖ Para los modelos de FT-NIR se utilizaron 10 PC's con una varianza explicada sobre el 99% (Tabla 1).
- ❖ Los modelos de predicción de contenido polifenólico resultaron ser mejores que los de capacidad antioxidante (Tabla 1).
- ❖ En las imágenes analizadas de aerocisto y estipe se observó principalmente alginato y celulosa (Fig. 3 y Fig.4).
- ❖ En las imágenes analizadas de fronda reproductiva se observó principalmente fucoidano y proteínas (Fig. 5).
- ❖ En las imágenes analizadas de fronda vegetativa se observó principalmente laminarina y proteínas (Fig. 6).

DISCUSIÓN:

- ❖ En los modelos generados a través de FT-MIR, el número de PC's utilizado resultó ser menor al de los utilizados en los modelos de FT-NIR. Esto, corroborado con el mayor porcentaje de varianza explicada, hace presumir que los modelos de FT-NIR contienen un mayor nivel de ruido, producto de interferencias físicas, que los modelos de FT-MIR (8).
- ❖ Los valores de RPDcv y RPDev de todos los modelos se encuentra por sobre 2,5, definido como el valor crítico para cuantificación. Sin embargo, sólo el modelo de FT-NIR para contenido polifenólico supera el valor de 3, definido como valor recomendado (9, 10).
- ❖ La presencia de alginato y celulosa en aerocisto y estipe puede deberse a que estos son polisacáridos que otorgan resistencia mecánica a la estructura celular (11).
- ❖ El contenido proteico en ambas frondas concuerda con estudios que demuestran una mayor cantidad de estas con respecto a estipe y aerocisto (11).
- ❖ La presencia del polisacárido de reserva energética laminarina, en fronda vegetativa concuerda con los estudios realizados en *Macrocystis integrifolia*, en donde se evidencia una mayor cantidad en frondas que en estipes y aerocistos (12).
- ❖ No se reporta en literatura estudios intraindividuos sobre el contenido de fucoidano en especies del género *Macrocystis*, por lo tanto este es el primer estudio en realizar esta comparación entre estructuras.

CONCLUSIÓN:

- ❖ Las técnicas de FT-MIR y FT-NIR pueden ser utilizadas en combinación con el método de regresión de PLS para la determinación directa de contenido polifenólico y capacidad antioxidante, propiedad de importancia para la generación de papeles bioactivos a base de algas.
- ❖ En particular el uso de FT-NIR requiere menor pretratamiento de la muestra para la toma de espectros, más aún, la determinación de contenido polifenólico resultó entregar los mejores modelos.
- ❖ La técnica de microespectroscopia FT-IR de imágenes en modo ATR permite identificar los principales polisacáridos de distintas estructuras morfológicas de *Macrocystis Pyrifera*.
- ❖ Los aerocistos y estipes de *Macrocystis pyrifera* son una potencial fuente de alginato y celulosa.
- ❖ Frondas reproductivas de *Macrocystis pyrifera* son una potencial fuente de fucoidano y proteínas.
- ❖ Frondas vegetativas son una potencial fuente de Laminarina y proteínas.
- ❖ *Macrocystis pyrifera* puede ser utilizada como materia prima para producción de polisacáridos de interés comercial, como el caso de laminarina, que puede ser utilizada como suplemento alimenticio para animales (13), alginato, utilizado principalmente en la industria alimenticia (14), y fucoidano al cual se le han asociado propiedades antitumorales y moduladoras del sistema inmune (15).
- ❖ La técnica de microespectroscopia infrarroja de imágenes permite la identificación de alginato, polisacárido que corresponde a un interferente en la generación de papeles bioactivos a base de algas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) McHugh, D. 2003. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- (2) Holdt, S. et al. 2011. *J Appl Phycol*, 23(3), 543-597.
- (3) Zubia, M. et al. (2009). *Food Chemistry*, 116(3), 693-701.
- (4) Holdt, S., & Kraan, S. 2011. *J Appl Phycol*, 23(3), 543-597.
- (5) Hay, K. et al. 2010. *Journal Of Phycology*, 46(5), 937-946.
- (6) Jerez, M. et al. 2007. *Food Chemistry*, 100(2), 439-444.
- (7) Re, R. et al. 1999. *Free Radical Biology And Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- (8) GELADI, P., & KOWALSKI, B. 1986. *Analytica Chimica Acta*, 185, 1-17.
- (9) Ferreira, D. et al. 2013. *Food Research International*, 51(1), 53-58.
- (10) Lobos, I. et al. 2013. *Journal Of Soil Science And Plant Nutrition*, 13 (2), 463-468.
- (11) Westemeier, R. et al. 2011. *J Appl Phycol*, 24(5), 1191-1201.
- (12) Powell, J., & Meeuse, B. 1964. *Econ Bot*, 18(2), 164-166.
- (13) Heim, G. et al. 2015. *Animal Feed Science And Technology*, 204, 28-41.
- (14) Dominguez, H. 2013. *Burlington: Elsevier Science*.
- (15) Zhang, W. et al. 2015. *Marine Drugs*, 13(3), 1084-1104.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al personal GIBMAR por el trabajo realizado y especialmente a la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología CONICYT por el financiamiento otorgado a través de los proyectos FONDEF D111-1226 y FONDECYT 11130388. Adicionalmente, agradecemos el compromiso y apoyo de nuestras empresas asociadas, TERRA NATUR S.A., FAME LTDA., PLÁSTICOS BESALLES LTDA., PROYECTOS PLÁSTICOS EIRL, INDUGRAS S.A., e INNOCON S.A.