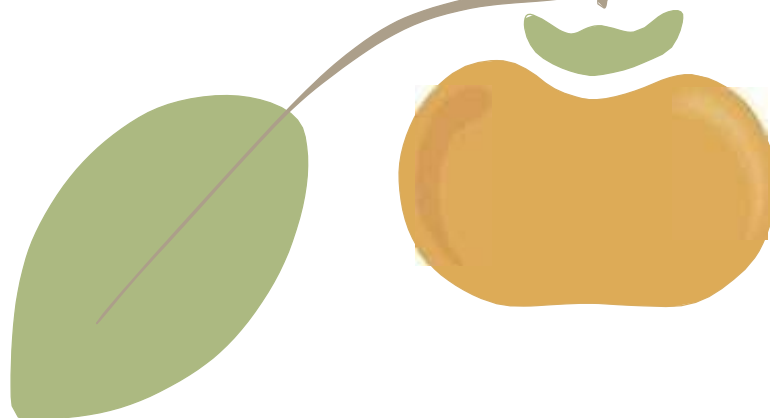


Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular



TESIS DOCTORAL 2024

SIMBIOSIS INDUSTRIAL EN EL APROVECHAMIENTO DEL RESIDUO DEL CAQUI PARA LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS FORMULADOS CON BIOACTIVOS

Sara Gea Botella

Director: Dr. Domingo Saura López
Codirector: Dr. Manuel Valero Roche



Universidad Miguel Hernández de Elche
Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche





La presente Tesis Doctoral, titulada “SIMBIOSIS INDUSTRIAL EN EL APROVECHAMIENTO DEL RESIDUO DEL CAQUI PARA LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS FORMULADOS CON BIOACTIVOS”, se presenta bajo la modalidad de **Tesis por compendio** de las siguientes publicaciones:

CAPÍTULO 1

- Sara Gea-Botella, Laura Agulló, Nuria Martí, Maria Concepción Martínez-Madrid, Victoria Lizama, Francisco Martín-Bermudo, Genoveva Berná, Domingo Saura, Manuel Valero. 2020. Carotenoids from persimmon juice processing. Food Research International, 141, 109882. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109882>.

CAPÍTULO 2

- Sara Gea-Botella, Bryan Moreno-Chamba, Laura de la Casa, Julio Salazar-Bermeo, Nuria Martí, Maria Concepción Martínez-Madrid, Manuel Valero, Domingo Saura. 2021. Carotenoids from persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) byproducts exert photoprotective, antioxidative and microbial anti-adhesive effects on HaCaT. Pharmaceutics, 13, 1898. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111898>.



El **Dr. Domingo Saura López**, director, y el **Dr. Manuel Valero Roche**, codirector de la Tesis Doctoral titulada “SIMBIOSIS INDUSTRIAL EN EL APROVECHAMIENTO DEL RESIDUO DEL CAQUI PARA LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS FORMULADOS CON BIOACTIVOS”.

INFORMAN:

Que Dña. **Sara Gea Botella** ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado “SIMBIOSIS INDUSTRIAL EN EL APROVECHAMIENTO DEL RESIDUO DEL CAQUI PARA LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS FORMULADOS CON BIOACTIVOS” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como Tesis Doctoral.

Y **DAN SU CONFORMIDAD** para la presentación de dicha Tesis Doctoral bajo la modalidad de **Compendio de Publicaciones**.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en Elche a de.....de 2024.

Director de la Tesis
Domingo Saura López

Codirector de la Tesis
Manuel Valero Roche



El Dr. D. **Gregorio Joaquín Fernández Ballester**, Coordinador del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE),

DA SU CONFORMIDAD a la lectura de la Tesis Doctoral, titulada “SIMBIOSIS INDUSTRIAL EN EL APROVECHAMIENTO DEL RESIDUO DEL CAQUI PARA LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS FORMULADOS CON BIOACTIVOS”, realizada por Dña. Sara Gea Botella en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) de la Universidad Miguel Hernández para optar al grado de Doctora con Mención Industrial.

Para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche a de de 2024.

Dr. Gregorio Joaquín Fernández Ballester
Coordinador del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular



Dña. **Sara Gea Botella** ha realizado la presente Tesis Doctoral gracias a la concesión de una de las Ayudas para contratos para la formación de doctores en empresas (Doctorados Industriales) (DI-16-08465) concedidas por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, a través del proyecto de I+D+i titulado 'Evaluación *in vitro* e *in vivo* de un extracto procedente de subproductos de la industrialización del caqui'. Además, desea agradecer a Mitra Sol Technologies, S.L. la asistencia técnica prestada durante años.



AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mis **tutores Domingo y Manuel**, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral en su grupo de investigación y junto al magnifico equipo laboral que lo compone, en especial a **Nuria Martí** por su preocupación y dedicación constante en mi investigación.

Gracias a todos los **compañeros** que me han acompañado en esta etapa de mi vida porque sin su apoyo y ayuda no hubiera sido nada sencillo llegar a la etapa final de este trabajo. En especial a **Mariló** por la gran amistad que compartimos y por el apoyo incondicional en esos momentos en lo que parecía que nada tenía sentido.

A mi **familia** por estar siempre en las situaciones más difíciles apoyándome y dándome fuerzas en todo momento. Por su cariño y ejemplo de persistencia durante este proceso de formación.

A mi pareja **Alejandro** quien me ha enseñado lo precioso que es amar a alguien sin pedir nada a cambio y por hacer que no pierda mis objetivos de vista.





“Cuida tus pensamientos, porque se convertirán en tus palabras. Cuida tus palabras, porque se convertirán en tus actos. Cuida tus actos, porque se convertirán en tus hábitos. Cuida tus hábitos, porque se convertirán en tu destino.”

Mahatma Gandhi

ÍNDICE

OBJETIVOS	8
INTRODUCCIÓN	9
Origen del cultivo del caqui y sus variedades	9
Producción e importancia económica	10
Subproductos del caqui en la industria	12
Composición nutricional y compuestos bioactivos	14
Estructura de los carotenoides y composición en el caqui	14
Estabilidad de los carotenoides	15
Efecto de la radiación UV en la piel y protectores solares naturales	16
Permeación en celdas de Franz	17
Microorganismos en la piel	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Sustancias químicas, reactivos	19
Materia vegetal y extracción sólido-líquido	20
Caracterización por HPLC-DAD	20
Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante	21
Líneas celulares y citotoxicidad	21
Efecto fotoprotector en células expuestas a radiación UV-A y UV-B	22
Permeación del extracto en celdas de Franz	22
Ensayos microbiológicos	23
- Actividad antimicrobiana	23
- Inhibición de la adhesión microbiana en HaCaT	24
Análisis estadístico	25
RESULTADOS	26
Resultados del Capítulo 1	26
Resultados del Capítulo 2	30
DISCUSIÓN	37
Discusión del Capítulo 1	37
Discusión del Capítulo 2	37
CONCLUSIONES GENERALES	40
REFERENCIAS	42
CAPÍTULO 1	52
CAPÍTULO 2	59

RESUMEN

Debido a la elevada generación de subproductos industriales en la industria alimentaria se plantea la revalorización y aprovechamiento industrial de dos subproductos (A y B) procedentes del fruto de caqui para la obtención de un extracto rico en carotenoides mediante la extracción con disolventes puros o mezclas, empleando etanol, acetona, etanol/acetona (50:50 v/v) y etanol/acetona/hexano (25:25:50 v/v/v). El subproducto B resultante de un tratamiento enzimático con pectinasa para optimizar la extracción del zumo fue especialmente adecuado para la recuperación de valiosos compuestos bioactivos, en este caso carotenoides. El análisis HPLC-DAD detectó e identificó un total de nueve carotenoides individuales presentes en los diferentes extractos: violaxantina, neoxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina 5,6-epóxido, β -criptoxantina, α -caroteno y β -caroteno. Los compuestos mayoritarios fueron la β -criptoxantina y el β -caroteno con un 49,2% y 13,2% del contenido de carotenoides totales (CCT) en el extracto de acetona del subproducto B. El CCT contribuyó en gran medida a la actividad antioxidante del extracto de acetona derivado de este subproducto. Además, se determinó el contenido de polifenoles totales (CPT) y la actividad antioxidante de dichos extractos mediante el ensayo de eliminación de radicales ABTS^{••} y el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (CARO). Los resultados indicaron nuevamente que el extracto de acetona del subproducto B era el más ventajoso con valores de 101,28 mg GAE/100 g, 138,98 mM TE/100 g y 454,63 mM TE/100 g, respectivamente.

Con la intención de evaluar la actividad biológica del extracto de acetona rico en carotenoides procedente del subproducto B de caqui (ECC) frente a la radiación solar, se determinó la actividad fotoprotectora de ECC en células de queratinocitos de piel humana (HaCaT) expuestas a radiación UV-A o UV-B, bien previamente tratadas con dos concentraciones diferentes de ECC (20 o 50 μ g/mL de DMEM) durante 24 h (pretratamiento largo) o 3 h (pretratamiento corto), bien después de la irradiación (postratamiento). También se evaluó el poder de reducción de los niveles de especies de oxígeno reactivas (EOR) intracelulares inducidas tras la exposición a UV-B en dicha línea celular. Independientemente del subtipo de radiación UV utilizado, el efecto de la concentración de ECC sobre la viabilidad de las células HaCaT irradiadas dependió del momento en el que se añadió ECC. La adición de ECC a las células después de la exposición a los rayos UV mejoró la viabilidad de la mayoría de los cultivos monocapa irradiados de queratinocitos HaCaT. Los resultados sugieren un efecto fotoprotector y regenerador del tratamiento con ECC en los cultivos monocapa de queratinocitos HaCaT sometidos a radiación UV. Además, la administración de concentraciones de ECC iguales o mayores a 10 μ g/mL mostró una marcada disminución de las EOR intracelulares.

Considerando el posible efecto beneficioso aportado por ECC tras sufrir daños por radiación solar en la piel, se planteó estudiar el efecto del mismo en la microbiota propia de la piel humana. ECC exhibió una notable actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum* con valores de concentración mínima fungicida (CMF) de 30,00 y 7,50 mg/mL respectivamente, mientras que las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) para las cepas patógenas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fue de 60,00 mg/mL, no detectándose efecto bactericida frente a los residentes comunes de la piel *Cutibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis* a los niveles de concentración probados. También se estudió la capacidad de adhesión de dichos microorganismos a las monocapas de células HaCaT. El tratamiento con ECC estimuló la capacidad de adhesión de los integrantes del microbioma de la piel humana a las células HaCaT, al tiempo que mostró una actividad antiadherente significativa contra todos los patógenos probados.

Finalmente, para evaluar la liberación tópica de ECC en posibles tratamientos transdérmicos, se estudió la dinámica de acumulación de sus carotenoides en celdas de difusión de Franz. El análisis HPLC-PDA-MS/MS (de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detectores de espectrometría de masas en tándem y matriz de fotodiodos) mostró que, de los carotenoides encontrados en ECC, β -criptoxantina y β -caroteno, junto con sus variantes isoméricas, mostraron mayor permeación y, por lo tanto, el anillo de ciclohexano constitutivo resultó ser un factor determinante en la permeabilidad global de los carotenoides.

ABSTRACT

Due to the high generation of industrial by-products in the food industry, the valorization and industrial use of two by-products (A and B) from the persimmon fruit are proposed to obtain an extract rich in carotenoids through extraction with pure solvents or mixtures, using ethanol, acetone, ethanol/acetone (50:50 v/v) and ethanol/acetone/hexane (25:25:50 v/v/v). By-product B resulting from an enzymatic treatment with pectinase to optimize juice extraction was particularly suitable for the recovery of valuable bioactive compounds, in this case carotenoids. HPLC-DAD analysis detected and identified a total of nine individual carotenoids present in the different extracts: violaxanthin, neoxanthin, antheraxanthin, lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin 5,6-epoxide, β -cryptoxanthin, α -carotene and β -carotene. The major compounds were β -cryptoxanthin and β -carotene with 49.2% and 13.2% of the total carotenoid content (TCC) in the acetone extract of by-product B. TCC contributed greatly to the activity antioxidant of the acetone extract derived from this by-product. In addition, the content of total phenolic

compounds (TPC) and the antioxidant activity of these extracts were determined by means of the ABTS^{••} radical scavenging assay and the oxygen radical absorption capacity (ORAC) test. The results again indicated that the acetone extract of by-product B was the most advantageous with values of 101.28 mg GAE/100 g, 138.98 mM TE/100 g and 454.63 mM TE/100 g, respectively.

In order to evaluate the biological activity of persimmon extract rich in carotenoids (PEC) extracted with acetone from by-product B against solar radiation, the photoprotective activity of PEC was determined in human skin keratinocyte cells (HaCaT) exposed to UV-A or UV-B radiation, either previously treated with two different concentrations of PEC (20 or 50 µg/mL of DMEM) for 24 h (long pretreatment) or 3 h (short pretreatment), either after irradiation (posttreatment). The power to reduce the levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) induced after exposure to UV-B in the same cell line was also evaluated. Regardless of the subtype of UV radiation used, the effect of PEC concentration on irradiated HaCaT cell viability depended on the time point at which PEC was added. Addition of PEC to cells after UV exposure enhanced the viability of most irradiated monolayer cultures of HaCaT keratinocytes. The results suggest a photoprotective and regenerative effect of PEC treatment on monolayer cultures of HaCaT keratinocytes subjected to UV radiation. In addition, the administration of PEC concentrations equal to or greater than 10 µg/mL showed a marked decrease in intracellular ROS.

Considering the possible beneficial effect provided by PEC after suffering damage by solar radiation on the skin, it was proposed to study its effect on the microbiota of human skin. PEC exhibited remarkable antifungal activity against *Candida albicans* and *Trichophyton rubrum* with minimum fungicidal concentration (MFC) values of 30.00 and 7.50 mg/mL, respectively, while minimum bactericidal concentrations (MBC) for pathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains were 60.00 mg/mL, with no bactericidal effect detected against the common skin residents *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* at the concentration levels tested. The ability of these microorganisms to adhere to HaCaT cell monolayers was also studied. PEC treatment stimulated the adhesion capacity of members of the human skin microbiome to HaCaT cells, while showing significant anti-adherence activity against all pathogens tested.

Finally, to evaluate the topical release of PEC in possible transdermal treatments, the dynamics of accumulation of its carotenoids in Franz diffusion cells was studied. HPLC-PDA-MS/MS (high performance liquid chromatography coupled to photodiode array and tandem mass spectrometry detectors) analysis showed that, of the carotenoids found in PEC, β-cryptoxanthin and β-

carotene, together with their isomeric variants, showed the highest permeation and, therefore, the constitutive cyclohexane ring turned out to be a determining factor in the global permeability of carotenoids.



OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el aprovechamiento de subproductos industriales procedentes de la industrialización del zumo de caqui para la obtención de productos ricos en carotenoides de alto valor añadido.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos secundarios:

- * Obtener un extracto rico en carotenoides a partir de subproductos de caqui mediante extracción sólido/líquido usando distintos disolventes.
- * Determinar los rendimientos de materia seca y carotenoides extraídos.
- * Identificar y cuantificar los carotenoides presentes en el extracto por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD).
- * Determinar el contenido de fenoles totales (TPC) y la actividad antioxidante del extracto.
- * Evaluar el efecto citotóxico del extracto en la línea celular de queratinocitos de piel humana adulta (HaCaT).
- * Estudiar la actividad fotoprotectora del extracto en células HaCaT expuestas a radiación UV-A o UV-B.
- * Determinar el efecto derivado de la presencia del extracto en la generación intracelular de especies de oxígeno reactivas (ROS) inducidas por irradiación con UV-B en células HaCaT.
- * Estudiar la actividad antimicrobiana del extracto frente a microorganismos comensales y patógenos de la piel humana.
- * Evaluar el efecto del extracto sobre la adhesión microbiana en cultivos monocapa de células HaCaT.
- * Determinar la cinética de liberación y permeación *in vitro* del extracto en celdas de difusión de Franz.

INTRODUCCIÓN

Origen del cultivo del caqui y sus variedades

El caqui (*Diospyros kaki* Thunb.) es un árbol frutal de la familia botánica Ebenáceas. Es cultivado preferentemente en climas subtropicales. Su nombre genérico en latín, *Diospyros*, proviene del griego “dios” (divino) y “pyros” (fruto). Es originario de China, Japón y Corea, donde se cultiva desde el siglo VIII, pero a principios del siglo XIX, se extendió a los países occidentales como Brasil, Estados Unidos de América (USA), Australia y en algunos países del mar Mediterráneo destacando Israel, Francia, Italia y España [1,2]. Tanta es la repercusión e importancia de este fruto en el mercado alimentario que en España (Comunidad Valenciana, provincia de Valencia) existe la denominación de origen protegida (PDO) ‘Kaki Ribera del Xúquer’ de la variedad Rojo Brillante. En Andalucía se cultiva la variedad Sharon o Triumph comercializada bajo la marca Sharoni.



Figura 1: Árbol del caqui

En cuanto a las variedades de caqui, se clasifican en cultivares astringentes (Rojo Brillante, Hachiya, Tomatero, etc.) y no astringentes (Sharon y Hana Fuyu) dependiendo de si pierden o no la astringencia durante su madurez en el árbol [3-7]. La astringencia viene determinada por la estructura y cantidad de taninos (proantocianidinas) presentes en el fruto en el momento de la recolección y se caracteriza por aportar una sensación de sequedad intensa acompañada de amargor que se experimenta en la boca tras ingerir el fruto [8]. Las variedades astringentes son comestibles tras un proceso de sobremaduración, o eliminación de la astringencia de manera artificial, debido a que el contenido en taninos es elevado, son de bajo peso molecular y presentan un estado soluble en agua. Por el contrario, las variedades no astringentes son aquellas que presentan taninos insolubles de alto peso molecular e insolubles en agua, los cuales permiten el consumo del fruto inmediatamente después de su recolección sin un proceso postcosecha de maduración [9,10].

En la actualidad, la comercialización de los frutos del caqui astringentes es posible debido a los tratamientos de eliminación de dicha astringencia mediante tratamientos artificiales, tales como la exposición a gas dióxido de carbono o vapor de etanol [11] o el secado y las altas presiones hidrostáticas [12,13].

Producción e importancia económica

El caqui es un fruto de gran interés comercial. Tan solo en el año 2019, se registra en la base de datos FAOSTAT una producción mundial de caqui de 4.270.074 t, con una superficie cultivada de 992.425 ha. A nivel internacional, cabe destacar que China Continental es el principal país productor de caquis a nivel mundial con 3.207.516 t, seguida de España, República de Corea y Japón (Figura 2) con valores comprendidos entre 200.000 y 500.000 t en el año 2019. En España, la producción de caquis cuenta con un valor de 484.315 t y un total de 18.479 ha de cultivo total.



Figura 2. Producción de caqui de los 10 primeros productores a nivel mundial, desde 2016 hasta 2017 [14]. Los valores de producción total en España en el año 2018 y 2019 han sido extraídos de MAPA, 2021.

A nivel nacional, las principales comunidades autónomas productoras de caquis son la Comunidad Valenciana, Andalucía y Cataluña con una exportación de 156.031 t, 15.978 t y 15.400 t en el año 2020, respectivamente [15]. En Andalucía destaca el cultivo de la variedad Sharon, mientras que en la Comunidad Valenciana la variedad estrella es el Rojo Brillante con la denominación de origen protegida “Kaki Ribera del Xúquer” [16].

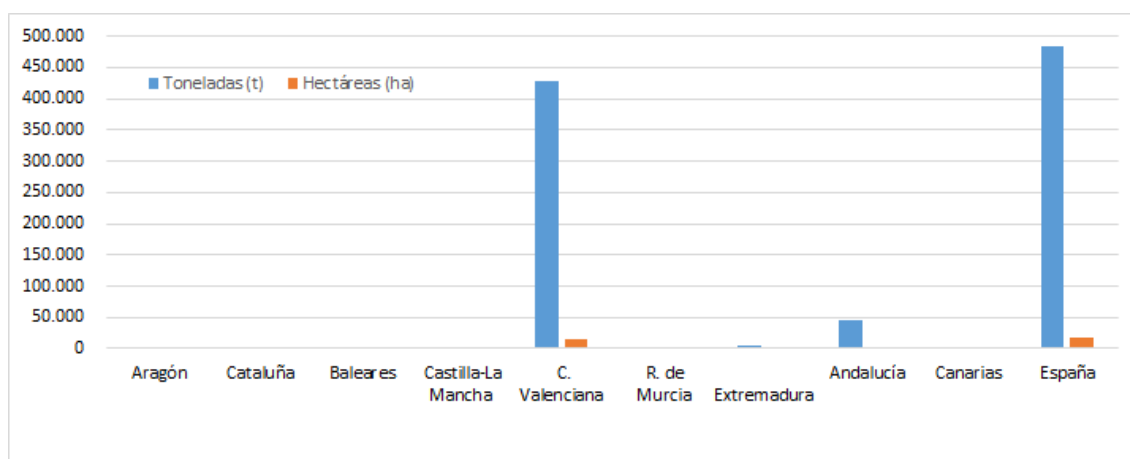


Figura 3. Producción (t) y superficie (ha) cultivada en España en 2020, por comunidades autónomas (Datos provisionales) [16].

A modo de visualización general, en la Figura 4 puede observarse la evolución exponencial que ha tenido la producción de este fruto a nivel nacional desde el año 1990 hasta el año 2019 [16]. Cabe destacar que la temporada de este fruto, a nivel nacional, es de octubre a diciembre, mientras que otras variedades se recolectan en septiembre y enero.

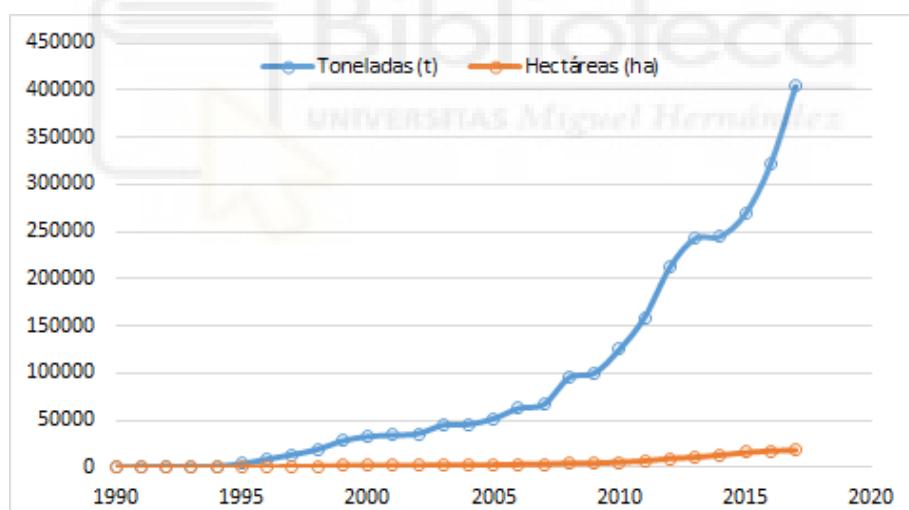


Figura 4. Evolución de la producción total de caqui en España y del área cosechada, desde 1990 hasta 2017 [14].

La elevada productividad de esta especie junto con los altos estándares de calidad de los supermercados, las estrictas regulaciones gubernamentales y las altas expectativas que tienen los consumidores al comprar los frutos de caqui, en cuanto a tamaño, forma y color [17], genera miles de toneladas de destrío. Los frutos excedentes, inaceptables para su comercialización en fresco, y aquellos que resultan dañados por el almacenamiento prolongado y los tratamientos químicos a que han sido sometidos requieren el desarrollo de nuevos productos derivados. Por

razones comerciales, logísticas y económicas [18] estos frutos deben ser procesados lo que genera grandes cantidades de subproductos que incluyen pieles, semillas y pulpa en diferentes pasos de la cadena de procesamiento. Estos subproductos son ricos en compuestos bioactivos que se pueden utilizar en diversas industrias como fuentes novedosas, económicas y naturales de fibra dietética, antioxidantes, pectina, enzimas, ácidos orgánicos, aditivos alimentarios, aceites esenciales y otros, utilizando diferentes métodos de extracción, purificación y fermentación [19,20]. Las acciones de reutilización de subproductos vegetales están de acuerdo con el Objetivo de Desarrollo Sostenible número 12 (ODS 12) de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible de las Naciones Unidas (Asamblea General de la ONU, 2015).

Subproductos del caqui en la industria

La FAO define como pérdidas de alimentos a “la disminución de la masa de alimentos comestibles en la parte de la cadena de suministro que conduce específicamente a los alimentos comestibles para el consumo humano”.

La cadena alimentaria genera una gran cantidad de subproductos alimentarios cada año, los cuales se pierden o desperdician sin poder ser aprovechados por los consumidores. Se calcula que aproximadamente 1.300 millones de toneladas de desechos son producidos en todo el mundo, esto equivale a un tercio de la producción de los alimentos destinados al consumo humano. Estos desperdicios son generados a lo largo de toda la cadena de producción alimentaria, iniciándose en la parte agrícola hasta el consumo final del producto por parte del consumidor en los hogares.

A nivel mundial, en Europa y América del Norte el desperdicio per cápita de alimentos es de 95 a 115 kg/año, mientras que en el África Subsahariana y en Asia Meridional y Sudoriental esta cifra representa de 6 a 11 kg/año [14]. Esto indica que en los países desarrollados los alimentos se desperdician en mayor proporción mientras que en los países subdesarrollados es menos significativo. Las pérdidas producidas por los países desarrollados se deben en parte por los acuerdos de ventas entre agricultor y comprador, debido a los bajos precios de venta o a los elevados estándares de calidad que deben superar los alimentos para ser bien recibidos por el consumidor (forma o apariencia perfectas), sin embargo en los países subdesarrollados pueden deberse a las limitaciones económicas, falta de instalaciones apropiadas para la buena manipulación y almacenamiento, como puede ser la refrigeración, el envasado y la comercialización, entre otros.

Esto lleva a la reflexión de que parte de los recursos limitados (plantaciones, agua, energía, fertilizantes, entre otros) destinados a la producción de estos alimentos son empleados en vano, además de la contaminación ambiental generada (producción de CO₂) por los procesos industriales en ciertas ocasiones [14].

Referente al fruto del caqui, la Asociación Española del Kaki (<https://aekaki.es/>) indica que aproximadamente unas 18.000 t de frutos son desechadas en la Comunidad Valenciana cada año. Este destrío por campaña de caqui puede utilizarse para la producción de biogás y compost (materia orgánica estabilizada, libre de patógenos y elementos contaminantes, cuya aplicación al suelo resulta beneficiosa) en una ingeniería especializada en soluciones energéticas, o bien para la elaboración industrial de zumos y mermeladas, entre otros productos. Los subproductos resultantes de este proceso de industrialización constituyen una gran fuente de compuestos bioactivos para el desarrollo de nuevos productos de alto valor añadido (revalorizados), cerrando el círculo dentro de las grandes industrias alimentarias de frutas y cereales y/o crear nuevas sinergias entre las industrias de procesamiento de frutas y cereales y las industrias productoras de alimentos, dando como resultado una mejora de la sostenibilidad general, la competitividad de la industria alimentaria europea y convirtiendo un costo en un beneficio [21].

Actualmente, entre los consumidores existe una mayor concienciación científica y gran interés social por los beneficios que aportan para la salud ciertos compuestos naturales como los carotenoides, por lo que cada vez son más los estudios que investigan los métodos de extracción, aislamiento y estabilización de estos compuestos en nuevas formulaciones de productos funcionales de provecho para el sector alimenticio, nutracéutico, farmacéutico, piensos para animales, productos químicos y cosmética [22,23].

En el mercado, la industria alimentaria se centra cada vez más en satisfacer la demanda del consumidor de alimentos con beneficios para la salud, por lo que los carotenoides son empleados como nutrientes esenciales (por ejemplo, β -caroteno), también como antioxidantes frente al estrés oxidativo (por ejemplo, licopeno), evitando la oxidación de ciertos lípidos en emulsiones, como en aderezos para ensaladas, mayonesas, productos lácteos y grasas [24]. Además, se utilizan como pigmentos naturales aportando color o fortificando alimentos, que han sufrido pérdidas de color tras el procesamiento o almacenamiento, nutracéuticos y cosméticos [21,25,26]. También, son empleados en la suplementación de piensos animales para la pigmentación de las carnes y huevos [27,28]. Por otro lado, los carotenoides también se utilizan por su efecto beneficioso en la prevención de enfermedades como el cáncer [29], las enfermedades cardiovasculares [30] y la degeneración de la visión óptica [31]. Incluso, los

productos de degradación de carotenoides, como damasconas, damascenonas e iononas se utilizan como fragancias en la industria de los perfumes [25].

Composición nutricional y compuestos bioactivos

Dependiendo de la variedad el fruto del caqui posee un peso medio comprendido entre 80-250 g, un diámetro medio de 60 mm y un volumen medio de 180 cm³. El color del fruto varía desde un color verde amarillento, amarillo, anaranjado o rojizo. Generalmente, por cada 100 g de porción comestible presenta un elevado contenido en agua (80%) y proporciona aproximadamente unas 73 kcal [32].

Referente a los macronutrientes, el caqui presenta alrededor de un 16% de hidratos de carbono, principalmente fructosa, glucosa y sacarosa [33] y destaca por su bajo contenido en proteínas y grasas. También, posee pectina y mucílagos como parte de la fibra soluble y una gran cantidad de fibra insoluble [34].

Con respecto a los micronutrientes, destaca por su contenido en calcio, fósforo y hierro [33], mientras que el sodio, manganeso, zinc y cobre se encuentran en bajo porcentaje [34]. También, presenta fitoquímicos conocidos como compuestos fenólicos, destacando las proantocianidinas o taninos condensados (también denominadas inicialmente leucoantocianinas), flavonoides (catequinas, kaempferol y quercetina) y carotenoides, entre otros. La acción de la mayoría de estos componentes bioactivos, consiste en la eliminación de los radicales libres uniéndose a los metales e inhibiendo la peroxidación lipídica. Cabe destacar el contenido medio de 160-250 mg de compuestos fenólicos/100 g de peso fresco (PF) y 2 mg de carotenoides/100 g de PF. Asimismo, es una fuente excepcional de provitamina A, como β -caroteno (160 μ g/100 g de PF), y también una notable fuente de vitamina C (16 mg/100 g de PF) [1].

Estructura de los carotenoides y composición en el caqui

Los carotenoides son pigmentos lipídicos naturales derivados de isoprenoides (tetraterpenos) con 40 átomos de carbono (C40) y responsables de la mayoría de los colores amarillo, naranja y rojo, tanto de frutas como de verduras. Su grado de solubilidad dependerá de los grupos sustituyentes de la molécula ($-\text{OH}$, $-\text{C}=\text{O}$, etc.), ya que, debido a su naturaleza, son solubles en disolventes apolares. Actualmente, se identifican más de 700 carotenoides diferentes que, en función de su composición química, se clasifican en dos tipos: carotenos (por ejemplo, el β -caroteno, licopeno, etc.), compuestos por átomos de carbono e hidrógeno, y xantofilas (por

ejemplo, la luteína, neoxantina, β -criptoxantina, etc.), que están compuestos por carbono, hidrógeno y oxígeno [35,36].

Algunos carotenoides tienen la capacidad para actuar como provitamina A, dependiendo de la presencia de un anillo de β -ionona no sustituido, así como de la conversión en retinol por los animales. El β -caroteno presenta una actividad de vitamina A próxima al 100%. Sin embargo, otros carotenoides presentan menor actividad, como el α -caroteno (50-54%), β -zeacaroteno (20-40%), γ -caroteno (50-52%), β -criptoxantina (50-60%) y β -apo-8'-carotenal (72%) [37].

Los seres humanos no pueden sintetizar estos compuestos y, por lo tanto, los obtienen a través de la dieta (frutas y verduras). Alrededor de 20 tipos de carotenoides se han caracterizado en tejidos o sangre humana, incluyendo: β -criptoxantina, α - y β -caroteno, zeaxantina, licopeno y luteína [38]. Se sabe que organismos como bacterias [39], algas [40], hongos [41], plantas [42-44], y algunos animales [45] pueden sintetizar carotenoides.

Los carotenoides más comunes en el fruto del caqui son el β -caroteno, como predominante, seguido de β -criptoxantina y α -carotenos [46]. En otros estudios, se remarca la β -criptoxantina como predominante [47], además de detectarse luteína, violaxantina, zeaxantina, 9-cis-violanxantina, licopeno y β -caroteno. La neoxantina, violaxantina, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno, α -caroteno y licopeno son los carotenoides más comunes extraídos y purificados de frutos de caqui [46,48]. La composición de carotenoides de los extractos de frutos de caqui varía según la variedad, las partes del fruto utilizadas en la extracción (piel, pulpa, semillas y hojas o combinación de las mismas), el estado de maduración, así como las técnicas de extracción y condiciones empleadas. Los subproductos de esta fruta tienen una concentración considerable de estos compuestos, principalmente por β -criptoxantina y β -caroteno [49].

Estabilidad de los carotenoides

Teniendo en cuenta la estructura de los carotenoides, la gran mayoría son insolubles en agua, lo que reduce las pérdidas por lixiviación durante el proceso de lavado y procesamiento de los frutos. Estos compuestos, son estables en su ambiente natural, pero ciertos factores externos como la exposición a la luz, actividad de agua, temperatura, presencia de oxidantes y antioxidantes, presencia de sulfitos, pH, almacenamiento, entre otros, influyen en su desestabilización y posterior degradación. Los estudios de estabilización dentro de la matriz de los alimentos son complejos, debido a las diferencias estructurales y de composición, así como a los diferentes tipos de procesos industriales [22,24].

Efecto de la radiación UV en la piel y protectores solares naturales

La luz ultravioleta (UV) es el componente de la luz solar con mayor efecto nocivo sobre la piel y es invisible al ojo humano. Además, se considera un factor exógeno muy influyente en la patogénesis de la piel, ya que puede inducir al desarrollo de una serie de trastornos cutáneos, como quemaduras solares, arrugas, eritema, edema, hiperplasia, fotocarcinogénesis, daño del ADN, inmunosupresión, fotoenvejecimiento [51,52] y apoptosis celular, cuyos mecanismos implican contribuciones sinérgicas de tres vías independientes, incluido el daño del ADN, la activación del receptor de la muerte y la formación de ROS [53]. No existe un nivel seguro de radiación UV y es más intensa entre las 10 de la mañana y las 3 de la tarde en verano.

La radiación UV se puede dividir en tres tipos según su longitud de onda: UV-A ($\lambda = 320-400$ nm), UV-B ($\lambda = 290-320$ nm) y UV-C ($\lambda = 190-210$ nm) [54]. La capa de ozono actúa como pantalla frente a la radiación UV, lo cual evita, en parte, que lleguen a incidir en la superficie terrestre. Mientras que la radiación UV-C (extremadamente peligrosa) es totalmente absorbida, la UV-B consigue traspasar aproximadamente de 1 al 10%. Sin embargo, la UV-A alcanza la superficie terrestre en un 90-99%.

De manera natural, los tejidos epiteliales que conforman la piel del cuerpo humano contienen una diversidad de moléculas y antioxidantes enzimáticos que pueden prevenir el daño oxidativo inducido por la producción excesiva de ROS, la cual a menudo excede la capacidad antioxidante propia de la piel [55]. Además, la piel actúa como barrera externa frente a agentes externos como radiaciones, contaminantes físicos, químicos y biológicos [56]. Un claro ejemplo de esta defensa es la presencia de melanocitos en la epidermis que bloquean la luz UV al producir un pigmento denominado melanina que oscurece la piel (conocido como bronceado) y proporciona cierta protección natural evitando la penetración de la luz UV a tejidos más profundos, ya que la melanina consigue absorber la energía lumínica lo que reduce el daño en las células cutáneas.

En la actualidad, el gran interés social por los productos de origen natural con baja probabilidad de absorción sistémica brinda un aumento en la investigación y utilización de compuestos bioactivos procedentes de fuentes naturales como plantas, frutas y verduras, entre otros [57]. Dichos compuestos son utilizados por la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria por sus beneficios en la salud y la reducción de compuestos químicos.

La forma más común que se conoce de proteger la piel frente a la radiación UV es la aplicación tópica de protectores solares cuya formulación se compone de moléculas activas que absorben o reflejan los rayos UV, suelen estar reguladas y limitadas en concentración de uso al tener un

origen sintético (Reglamento (CE) N° 1223,2009). Por este motivo, se están incorporando sustancias naturales en la formulación de protectores solares [58].

En este ámbito, las plantas son fuente de compuestos bioactivos que muestran efectos protectores frente a la radiación UV a través de su actividad antiinflamatoria, antioxidante y de agentes inmunomoduladores, que proporcionan protección adicional contra los efectos perjudiciales de la exposición a la radiación UV [59] y sustituyen a los productos sintéticos de uso común. Los carotenoides han evolucionado para desempeñar un papel clave en la absorción de diferentes longitudes de onda debido a su estructura [60]. En particular, se ha demostrado que los carotenoides como la luteína tienen propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias después de la exposición a la radiación UV-B [61] en el modelo de línea celular de queratinocitos humanos.

Los carotenoides que actúan como provitamina A son beneficiosos para la piel a través de la producción de ácido retinoico que interviene en procesos que incluyen la proliferación de queratinocitos, diferenciación y queratinización epidérmica, reducción de la inflamación y oxidación, mejora de la permeabilidad de los agentes tópicos, tratamiento del acné y otras afecciones de la piel [62,63].

Permeación en celdas de Franz

Las celdas de Franz son consideradas como una de las metodologías más utilizadas en la evaluación de la penetración transepitelial de moléculas biológicamente activas donde de manera *in vitro* se permite controlar una cinética de liberación de los compuestos de estudio a partir de una cámara donora y otra aceptora. Para la permeación es necesario el empleo de una membrana que simula la piel humana siendo de origen animal, humana o sintética. En el compartimento dador se añade la solución de estudio y en el receptor se extraen las muestras para su posterior análisis mediante técnicas analíticas [64].

Desde su desarrollo en 1975, dicho ensayo ha proporcionado información entre la combinación de piel, fármaco y formulación [65,66] y han sido empleadas en diversos estudios debido a que la administración transdérmica de fármacos es ventajosa en comparación con otras vías de administración al disminuir la toxicidad y reducir los efectos secundarios en comparación con otras vías de administración [67]. Este método consiste en la permeación de compuestos activos desde la cámara donora hacia la cámara aceptora mediante un continuo movimiento de agua localizada en el interior del compartimento receptor mediante agitación magnética continua, la cual favorece una homogeneidad de la muestra permeada con el agua facilitando la permeación.

Microorganismos en la piel

Comúnmente se conoce como microbiota de la piel a todo microorganismo que reside en ella, como bacterias, hongos y parásitos los cuales contribuyen a la formación de un ecosistema en permanente interacción entre la piel y huéspedes. La mayor parte de estos microorganismos se encuentran depositados en la superficie de la epidermis y en las partes superiores de los folículos capilares donde aportan un beneficio al tener función de barrera física e inmunológica, protegiendo la piel de patógenos transitorios [68].

La acción de defensa de estos microorganismos propios de la piel consiste en limitar los nutrientes para evitar la proliferación de los patógeno externos, además secretar compuestos químicos o estimular el sistema inmunológico de la piel para provocar una respuesta de defensa [69]. Esta microbiota propia de la piel puede verse afectada por el fotodaño o agresión que produce la radiación solar en la piel, lo cual podría conducir a una eventual predisposición a amenazas exógenas como las infecciones microbianas. Por ejemplo, se ha informado que en la psoriasis las bacterias filamentosas en la piel pueden promover la acumulación de células proinflamatorias, con un aumento de los trastornos inflamatorios de la piel. También podría alterar la homeostasis de la piel con un impacto en la diferenciación, proliferación y crecimiento de comensales cutáneos y patógenos en la superficie de la piel [62,70].

Generalmente, los cambios fisiológicos de la piel como resultado de la exposición a los rayos UV pueden causar cambios no deseados por microbios lipofílicos en sitios sebáceos y en la proliferación de microbios patógenos como *Staphylococcus aureus* o algunas cepas de hongos [63]. Para evitar todo lo mencionado anteriormente, es necesario nutrir adecuadamente la piel para fomentar el blindaje antimicrobiano propio de la piel con fines terapéuticos o preventivos [71].

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos utilizados durante esta Tesis se describen detalladamente en los artículos publicados que componen el **Capítulo 1** y **Capítulo 2**. Los ensayos, a continuación descritos a modo de resumen, se realizaron por triplicado.

Sustancias químicas, reactivos

Los estándares de carotenoides: violaxantina (pureza $\geq 95\%$), neoxantina (pureza $\geq 97\%$), anteraxantina (pureza $\geq 95\%$), luteína (pureza $\geq 99\%$), zeaxantina (pureza $\geq 97\%$), β -criptoxantina (pureza $\geq 97\%$), α -caroteno (pureza $\geq 97\%$) y β -caroteno (pureza $\geq 96\%$) se obtuvieron de CaroteNature (Lupsingen, Suiza). Metanol (MeOH), acetona (Ac), etanol (EtOH), hexano (Hx), éter dietílico, ácido acético, acetonitrilo e hidróxido de potasio (KOH, pureza = 90%) fueron de Panreac Química SLU (Castellar del Vallès, Barcelona, España). Todos los disolventes orgánicos eran de calidad analítica HPLC. Reactivo de Folin-Ciocalteu, persulfato de potasio, carbonato de sodio, ácido gálico, ABTS [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)], AAPH [2,2'-Azobis (2-amidinopropano) diclorhidrato], bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) y dimetilsulfóxido (DMSO) se adquirieron de Sigma-Aldrich Corp. (Saint Louis, Missouri, USA). La fluoresceína (FL) y el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) se adquirieron de Fluka Chemika (Neu-Ulm, Alemania). Se obtuvo agua ultrapura de un sistema de agua purificada Q-Gard® 1 de Merck Millipore (Darmstadt, Alemania) con una resistividad de 18.0 M Ω ·cm. El nitrógeno gaseoso se ha obtenido de Air Liquide (Madrid, España).

Para los ensayos celulares, el medio celular Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, 4,5 g/L de glucosa), suero bovino fetal (FBS), penicilina/estreptomicina y solución salina Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) se adquirieron en Gibco Laboratories (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Sin embargo, para los ensayos microbiológicos los medios de cultivo utilizados fueron: caldo y agar de patata dextrosa (PDB y PDA), caldo y agar tróptico de soja (TSB y TSA), medio reforzado para clostridios (RCM) y agua de peptona tamponada (BPW). Los antibióticos empleados fueron kanamicina, gentamicina, eritromicina, ketoconazol y cloruro de trifetil tetrazolio (TTC) adquiridos de Sigma-Aldrich, Panreac y Thermo Fisher Scientific.

Se adquirieron celdas de difusión de Franz fabricadas por PermeGear, Inc. (Hellertown, PA, USA) y membranas Strat-M® de Millipore.

Materia vegetal y extracción sólido-líquido

Los subproductos de caqui variedad Sharon (subproducto A y B) se seleccionaron en dos fases distintas del proceso de industrialización del zumo de caqui. El subproducto B se obtuvo mediante tratamiento enzimático con pectinasa del subproducto A para optimizar la extracción del jugo. Así, el subproducto B tenía apariencia granular homogénea y color naranja, mientras que el subproducto A, que se obtuvo licuando las partes comestibles de los frutos del caqui utilizando una máquina industrial de jugo de frutas, muestra un aspecto más viscoso y heterogéneo. Ambos subproductos se componen de pulpa, piel y semillas y se adquirieron de Mitra Sol Technologies, S.L. (Elche, Alicante, España). Se determinó el contenido de humedad (% MC) de los dos subproductos. Para ello, se secaron muestras de 10 g a 60 ± 1 °C en un horno de secado (JP Selecta, Barcelona, España) y se llevaron a peso constante.

Para la extracción de los carotenoides, los subproductos de caqui se someten a una extracción sólido-líquido con etanol, acetona, etanol/acetona (50:50 v/v) y etanol/acetona/hexano (25:25:50 v/v/v). Luego, la mezcla se filtra para obtener un extracto líquido y se saponifica con KOH, para posteriormente ser decantado con éter dietílico. El sedimento se lava con agua para decantar las resinas generadas en la saponificación. El disolvente se evapora en un evaporador rotatorio al vacío y se liofiliza para eliminar el agua restante del subproducto de caqui. El extracto de carotenoides se almacena a -80 °C antes de su uso.

Caracterización por HPLC-DAD

El análisis de cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) de los carotenoides presente en los extractos se llevó a cabo mediante el empleo de patrones o estándares individuales. Los patrones utilizados fueron violaxantina, neoxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno y β -caroteno. Se construyó una curva de calibración con cinco concentraciones (3.125, 6.25, 12.5, 25.0 y 50.0 mg/L) para cada patrón de carotenoide. La β -criptoxantina 5,6-epóxido se expresó como equivalentes de β -criptoxantina. El contenido de carotenoides se determinó mediante HPLC-DAD. Se inyectaron 10 μ L de muestras en la columna YMC Carotenoid HPLC, C30, 4.6×250 mm, 5 μ m (Teknokroma Analítica, Sant Cugat del Vallès, Barcelona, España) acoplada al filtro precolumna y el cartucho de protección. La fase móvil consistió en un gradiente de 60:40 (v/v) tanto en la fase A (metanol/acetona) como en la fase B (acetona/agua). La velocidad de flujo fue de 0.5 mL/min. El perfil de gradiente de la fase móvil se estableció como sigue: disminución del 60% de B al 30% de B en 3 min; 30% de B durante 19 min; disminuyendo del 30% B al 10% B en 4 min; B al 10%

durante 15.5 min; y aumentando del 10% B al 60% B en 3.5 min (tiempo total de ejecución 45 min).

Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante

La determinación de compuestos fenólicos totales (TPC) se realizó mediante espectrofotometría empleando como base el método de Folin-Ciocalteu [72]. Se mezclaron 10 μ L de solución de extracto (previamente disueltos en etanol), 50 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu, 100 μ L de Na_2CO_3 acuoso al 20% y 100 μ L de agua destilada, manteniendo la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente.

La actividad antioxidante de los extractos se evaluó mediante dos ensayos: eliminación de radicales ABTS^{•+} y capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC).

Para el ensayo ABTS, previamente se preparó un catión radical mediante una reacción entre ABTS, agua y una solución de persulfato potásico [72]. Posteriormente, esta solución se diluyó con etanol hasta alcanzar la absorbancia deseada. Para determinar la actividad antioxidante de los extractos, se mezclaron 200 μ L de la solución ABTS^{•+} (con absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 734 nm) con 20 μ L de una disolución etanólica de extracto (5 mg/mL) y después de 6 min se midió la absorbancia a 734 nm.

Con el método ORAC, se analizó la capacidad de los extractos para eliminar radicales peroxilo. Para ello se empleó la FL como sonda fluorescente (ORACFL) [73]. Para cada determinación se utilizó una solución acuosa de AAPH recién preparada. La temperatura de la incubadora se fijó en 37 °C y se registró la fluorescencia de FL cada minuto después de la adición de AAPH.

Como estándares de calibración se utilizaron el ácido gálico, expresando los resultados como equivalentes de ácido gálico (mg GAE/100 g de extracto) para el ensayo TPC, mientras que para los ensayos ABTS y ORAC se empleó el Trolox, expresándose los resultados como equivalentes de Trolox (mM TE/100 g de extracto). Las medidas de absorbancia y fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV/Vis lector de microplacas SPECTROstar OMEGA y en un lector de microplacas de fluorescencia FLUOstar OMEGA respectivamente, ambos adquiridos a BMG LABTECH GmbH (Offenburg, Alemania).

Líneas celulares y citotoxicidad

Se seleccionó la línea celular de queratinocitos inmortalizados de piel humana adulta (HaCaT) adquirida de la American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Las células HaCaT se

cultivaron en DMEM, suplementado con FBS, 50 U/mL de penicilina y 50 mg/mL de estreptomycin, en frascos de 75 cm². El medio de cultivo se cambió dos veces por semana y se mantuvo a 37 °C en atmósfera humidificada con CO₂.

Para el ensayo citotóxico las células se trataron con diferentes concentraciones del extracto de acetona rico en carotenoides procedente del subproducto B de caqui (PEC) (10, 20, 50, 80, 110, 150, 180 y 200 µg/mL) durante 48 h y se revelaron con el reactivo MTT. La viabilidad celular se midió a 570 nm con un espectrofotómetro UV/Vis lector de microplacas SPECTROstar OMEGA.

Efecto fotoprotector en células expuestas a radiación UV-A y UV-B

Se determinó la actividad fotoprotectora de PEC en células de queratinocitos de piel humana (HaCaT) expuestas a radiación UV-A o UV-B, bien previamente tratadas con dos concentraciones diferentes de PEC (20 o 50 µg/mL de DMEM) durante 24 h (pretratamiento largo) o 3 h (pretratamiento corto), bien después de la irradiación (postratamiento). Las células se irradiaron con 50 µL de PBS por pocillo a dos potencias diferentes de radiación UV-A (5 y 20 J/cm²) o UV-B (500 y 1000 J/cm²). Finalmente, las células se incubaron con DMEM durante 48 h. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo colorimétrico MTT.

Asimismo, se evaluó el poder de reducción de PEC en los niveles intracelulares de especies de oxígeno reactivas (ROS) inducidos tras la exposición a UV-B en la línea celular mencionada anteriormente, utilizando la sonda fluorescente DCFH-DA. Brevemente, las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se trataron con 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 y 75 µg/mL de PEC durante 24 h, luego las células fueron irradiadas con UV-B a 500 J/cm² y se incorporó la sonda DCFH-DA durante 1 h a 37 °C. La fluorescencia se midió usando un lector multiplaca (Cytation™ 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader, BioTek Instruments, Inc., Bad Friedrichshall, Alemania).

Permeación del extracto en celdas de Franz

Se prepararon soluciones de 120 µg/L de PEC-DMSO o β-caroteno-DMSO y se evaluó la permeación *in vitro* en un modelo de celda de difusión de Franz [67]. Brevemente, las células receptoras se llenaron con 5 mL de tampón fosfato 1 mM (pH 7) con 5% de DMSO. Se colocó encima una membrana sintética Strat-M® de 9 mm de diámetro (área de difusión: 0.636 cm²), se fijó con la tapa del compartimiento del donante y se dejó equilibrar durante 30 min en contacto. La temperatura de la celda receptora y las condiciones de agitación se estabilizaron a 32 ± 0.5 °C y 200 rpm, respectivamente, antes de realizar el experimento. Se aplicaron soluciones de 314.3 µL/cm² de PEC-DMSO o β-caroteno-DMSO a la célula donante. A través del brazo de

muestreo se tomaron alícuotas de 200 μL a las 0.5, 1.5, 2, 3, 4, 5 y 24 h desde la colocación de las soluciones; luego, las alícuotas extraídas se reemplazaron inmediatamente con medio receptor nuevo.

La cuantificación y el perfil de carotenoides de la solución de PEC-DMSO permeada en las células receptoras se determinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas en tándem (HPLC-PDA-MS/MS) en un Shimadzu LCMS-QP (Kyoto, Japón), equipado con bombas binarias (LC-40D X3) y conectado, en serie, a un detector de matriz de fotodiodos (PDA) (SPD-M30A) y espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (LCMS-8050TM). Los espectros UV-visible se obtuvieron entre 250 y 700 nm y los cromatogramas se procesaron a 450 nm. Se sometió a análisis de carotenoides un volumen de 1 μL de cada una de las alícuotas extraídas de la solución permeada de PEC-DMSO.

Se construyeron curvas de calibración para luteína, β -criptoxantina, β -caroteno y licopeno con un mínimo de cinco niveles de concentración (0.01–0.50 mg/mL). Los tiempos de retención de las especies moleculares de carotenoides se determinaron utilizando compuestos estándar. Los espectros UV-visible (λ_{max}) y de masas se compararon con los datos disponibles en la literatura [74,75].

Ensayos microbiológicos

Todos los microorganismos empleados se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universitat de València, España). La activación del inóculo de cada microorganismo se realizó de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Para el ensayo, todas las suspensiones microbianas se normalizaron a una densidad de 0.5 McFarland (10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL) en 1% de BPW, utilizando un lector de placas para medir la densidad óptica (DO) a 600 nm.

- Actividad antimicrobiana

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC), la concentración mínima bactericida (MBC), la concentración mínima fungicida (MFC) y las concentraciones subinhibitorias (sICs) de PEC mediante un método colorimétrico modificado de microdilución en caldo [76] para cepas bacterianas residentes de la piel humana como *Cutibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis*, patógenos de la piel como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y hongos como *Trichophyton rubrum* y *Candida albicans*. Brevemente, se añadieron 100 μL de TSB (bacterias), PDB (hongos) o RCM (*C. acnes*) a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se agregaron 100 μL de PEC (previamente disuelto en DMSO) en la primera columna de la placa y a continuación

se realizaron diluciones en serie en un intervalo de concentración de 60 a 0.117 mg/mL por pocillo, descartándose la alícuota final. Finalmente, se agregaron a cada pocillo 100 µL de suspensión microbiana a 10^8 UFC/mL. Como control positivo para bacterias se utilizaron kanamicina (200 µg/mL), gentamicina (20 µg/mL) y eritromicina (8 µg/mL), mientras que para los hongos fue ketoconazol (500 µg/mL). Como control negativo se usó DMSO, además se tuvo en cuenta un blanco con medio de cultivo y PEC para cada microorganismo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h (bacterias) y a 25 °C durante 3 a 5 días (hongos) mientras que *C. acnes* se incubó en condiciones de anaerobiosis. Después de la incubación, se midió la DO mediante un lector de placas a 600 nm. El porcentaje de inhibición (%Inh) de la población microbiana se calculó siguiendo la ecuación descrita en la metodología del Capítulo 2 de esta Tesis.

Los datos de inhibición se confirmaron mediante colorimetría añadiendo 10 µL de solución acuosa de TTC al 0.5% a cada pocillo e incubando durante 1 h. Por un lado, la CMI se definió como la concentración mínima de PEC en la que había un cambio de color apreciable en comparación con el %Inh (> 50%). Por otro lado, las MBC y MFC se definieron como la ausencia de crecimiento microbiano observado (> 99%), sembrándose alícuotas de 10 µL de cada pocillo anterior a la MIC en la superficie de placas conteniendo medio de cultivo TSA, PDA o RCM. Las placas se incubaron de acuerdo con los requerimientos de cada microorganismo. Se consideraron sICs de PEC aquellas que generaron un %Inh microbiana entre 0 y 50%. Se realizaron imágenes ópticas de pocillos que contenían células vivas tratadas con la MIC de PEC y sin tratar utilizando el lector de microplacas Cytation™ 3.

- Inhibición de la adhesión microbiana en HaCaT

El ensayo de adhesión microbiana se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Sardi et al. (2017) [77], con modificaciones. Inicialmente, se inocularon 1×10^5 células HaCaT en una placa de 24 pocillos para la generación de una monocapa. Posteriormente, se añadió PEC a la concentración de MIC/4 y se agregaron 500 µL de suspensión microbiana (10^3 UFC/mL) a cada pocillo, completando con DMEM un volumen final de 1 mL. Las placas se incubaron a 37 °C bajo una atmósfera humidificada de CO₂ (5% v/v). Después de 1, 2, 3, 4 y 5 h de incubación, las células se lavaron tres veces con PBS estéril. Posteriormente, se tripsinizaron y se sembraron alícuotas de 100 µL en placas con TSA, PDA o RCM para el recuento microbiano. Dichas placas se incubaron dependiendo del requerimiento de cada microorganismo. El control negativo fueron los pocillos no tratados con la sIC de PEC, mientras que los controles positivos fueron aquellos tratados con 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina. Para asegurar la esterilidad del ensayo, se evaluó un blanco de pocillos sin suspensión microbiana. La curva de

adhesión microbiana a la monocapa de células HaCaT se trazó en función del número final de bacterias adheridas en grupos no tratados después de 5 h de incubación.

Análisis estadístico

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresaron como media $\pm$ desviación estándar (SD). El análisis de varianza (ANOVA) se realizó con GraphPad Prism® versión 8.0.2 y las diferencias entre las medias se estimaron mediante la prueba de Tukey.

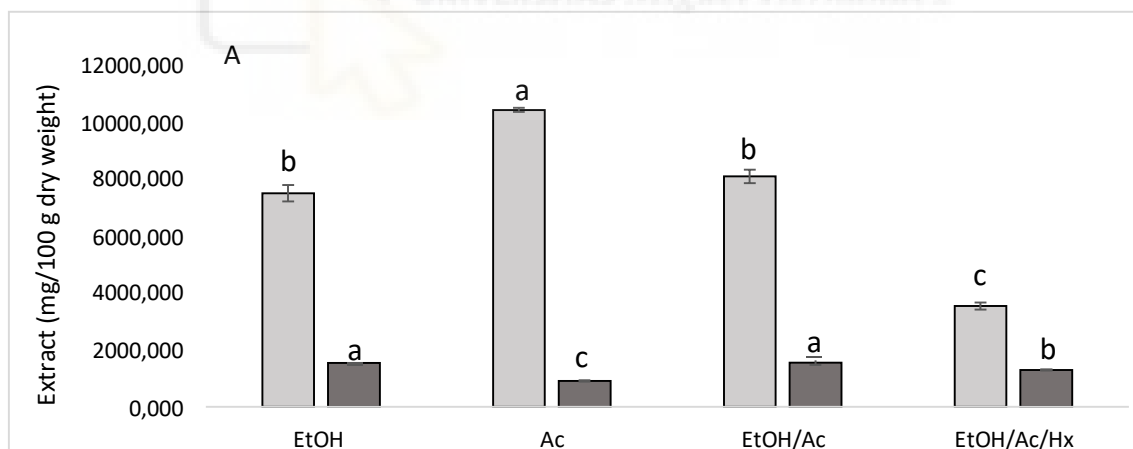


RESULTADOS

Resultados del capítulo 1

El contenido de humedad (%MC) de los dos subproductos de caqui varió mucho. Los valores estimados, expresados como g de agua por 100 g de peso fresco (FW), resultaron ser $94.10 \pm 0.73\%$ y $69.23 \pm 0.08\%$ para los subproductos A y B, respectivamente.

La extracción sólido-líquido para el subproducto A fue más efectiva que para el subproducto B. Independientemente del solvente utilizado en el proceso de extracción, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de materia seca extraída. La mayor cantidad de materia seca se obtuvo utilizando acetona absoluta como disolvente orgánico [$10,413.66 \pm 72.90$ mg/100 g de peso seco (DW)], seguido del etanol y la mezcla de ambos disolventes. El rendimiento más bajo se obtuvo utilizando la combinación de disolventes etanol/acetona/hexano ($3,537.01 \pm 119.90$ mg/100 g DW) (**Fig. 5A**). Por el contrario, los contenidos de carotenoides totales (TCC) fueron más altos en el subproducto B que en el subproducto A (**Fig. 5B**). El valor más alto de TCC se obtuvo utilizando acetona absoluta como disolvente orgánico ($33,970.25 \pm 1,542.61$ mg/100 g DW), seguido del disolvente etanol ($13,953.20 \pm 891.87$ mg/100 g DW).



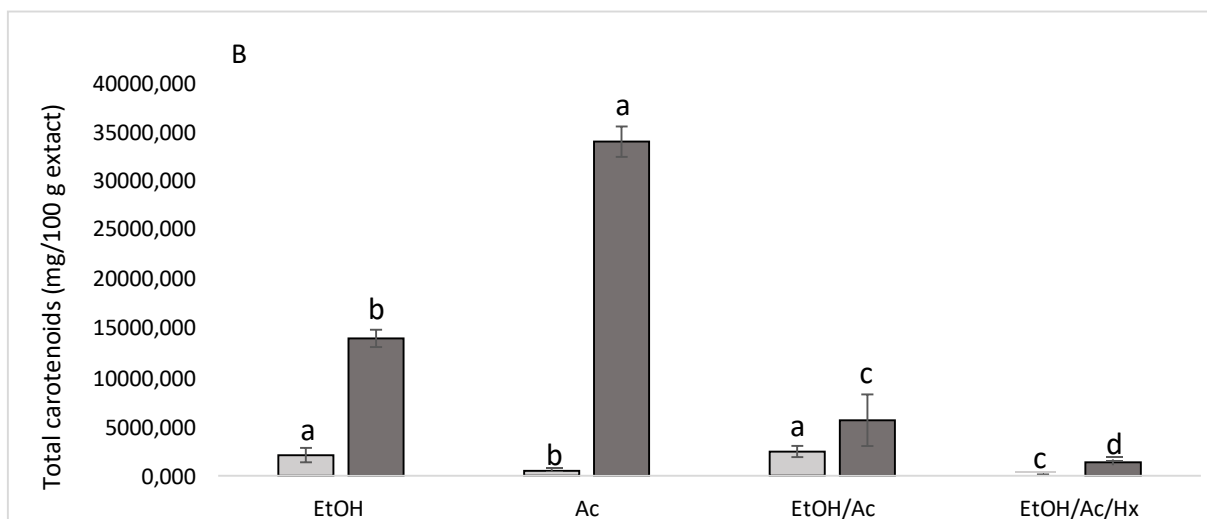


Figura. 5. (A) Rendimientos de extracción (mg/100 g FW) y (B) contenido total de carotenoides (mg/100 g de extracto) de extractos de caqui obtenidos del subproducto A (□) y B (■) usando diferentes solventes o combinaciones de solventes.

La determinación del contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) mostró variaciones considerables entre los extractos del subproducto B, que había sido seleccionado por su mayor concentración en carotenoides. El valor más alto se registró en el extracto de acetona (101.28 ± 6.53 mg GAE/100 g DW), seguido del extracto de etanol (86.64 ± 5.23 mg GAE/100 g DW). Además, se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos de caqui mediante dos métodos analíticos diferentes. Los valores más altos de actividad antioxidante por el método ABTS se encontraron en el extracto de acetona del subproducto B (138.98 ± 14.59 mM TE/100 g DW), seguido del extracto etanólico (123.37 ± 11.73 mM TE/100 g DW). Los resultados del ensayo ORAC con respecto a la actividad biológica ensayada fueron superiores a los ya comentados para el método ABTS. El extracto de acetona mostró una actividad antioxidante moderadamente grande (~ 455 mM TE/100 DW) mientras que los extractos de etanol, etanol/acetona y etanol/acetona/hexano mostraron valores entre ~ 210 y ~ 302 mM TE/100 g DW (**Tabla 1**).

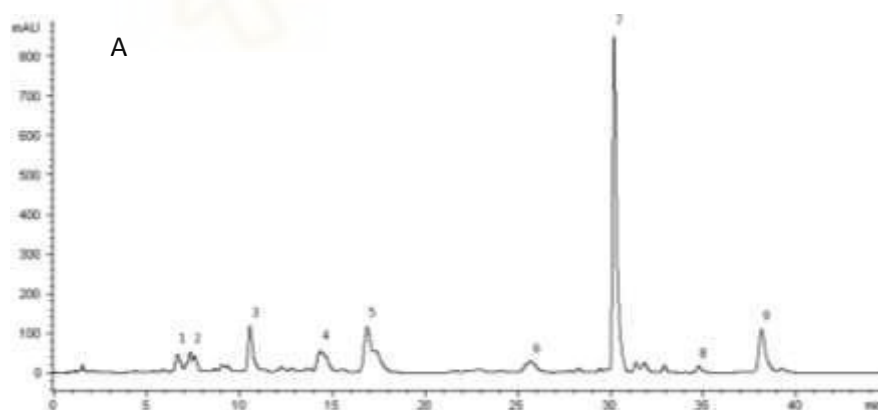
Los resultados de TPC se correlacionaron con los de ABTS ($r = 0.9783$; $R^2 = 95.7141$) y ORAC ($r = 0.9116$; $R^2 = 83.1099$) con un nivel de confianza del 95% ($P = 0.0217 < 0.05$) y del 90 % ($P = 0.0884 < 0.10$), respectivamente. Asimismo, se estimó una relación estadísticamente significativa entre los valores de TCC en los diferentes extractos del subproducto B y los valores de ORAC al 99% ($r = 0.9999$; $R^2 = 99.9836$; $P = 0.0001 < 0.01$) nivel de confianza. Dichas correlaciones sugieren que los carotenoides contribuyeron en gran medida a la actividad antioxidante de los extractos obtenidos por extracción sólido-líquido de subproductos de caqui (**Tabla 1**).

Organic Solvents and Solvent Combinations	TPC (mg GAE/100 g extract)	ABTS (mM TE/100 g extract)	ORAC (mM TE/100 g extract)
Ethanol	86.64* $\pm$ 5.23 b	123.37 $\pm$ 11.73 a	302.10 $\pm$ 8.77 b
Acetone	101.28 $\pm$ 6.53 a	138.98 $\pm$ 14.59 a	454.63 $\pm$ 11.65 a
Ethanol/Acetone	48.88 $\pm$ 3.84 c	11.61 $\pm$ 3.36 b	239.27 $\pm$ 10.60 c
Ethanol/Acetone/Hexane	54.79 $\pm$ 5.76 c	3.36 $\pm$ 0.29 c	210.00 $\pm$ 3.73 d

*Los valores se informan como media $\pm$ desviación estándar (DE). Medias seguidas de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Tukey.

Tabla 1. Compuestos fenólicos totales (TPC) y ensayos de actividad antioxidante (ABTS y ORAC) en diferentes extractos del subproducto A derivado del procesamiento del zumo de caqui.

Con la intención de determinar que carotenoides eran los responsables de esa actividad antioxidante, se procedió a evaluar la composición de carotenoides individuales presentes en los extractos secos obtenidos. Para ello, se realizó un análisis HPLC-DAD, donde se identificaron y cuantificaron nueve carotenoides que incluyen violaxantina, neoxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina 5,6-epóxido, β -criptoxantina, α -caroteno y β -caroteno por tiempos de retención (RT) (6.7, 7.4, 10.6, 14.5, 17.0, 25.9, 30.3, 34.9 y 38.4 min, respectivamente) coincidentes con los estándares comerciales respectivos o valores ya informados bajo condiciones cromatográficas idénticas (**Fig. 6**). Los carotenoides mayoritarios encontrados en PEC fueron la β -criptoxantina (49.2%) y el β -caroteno (13,2%) (**Fig. 7**).



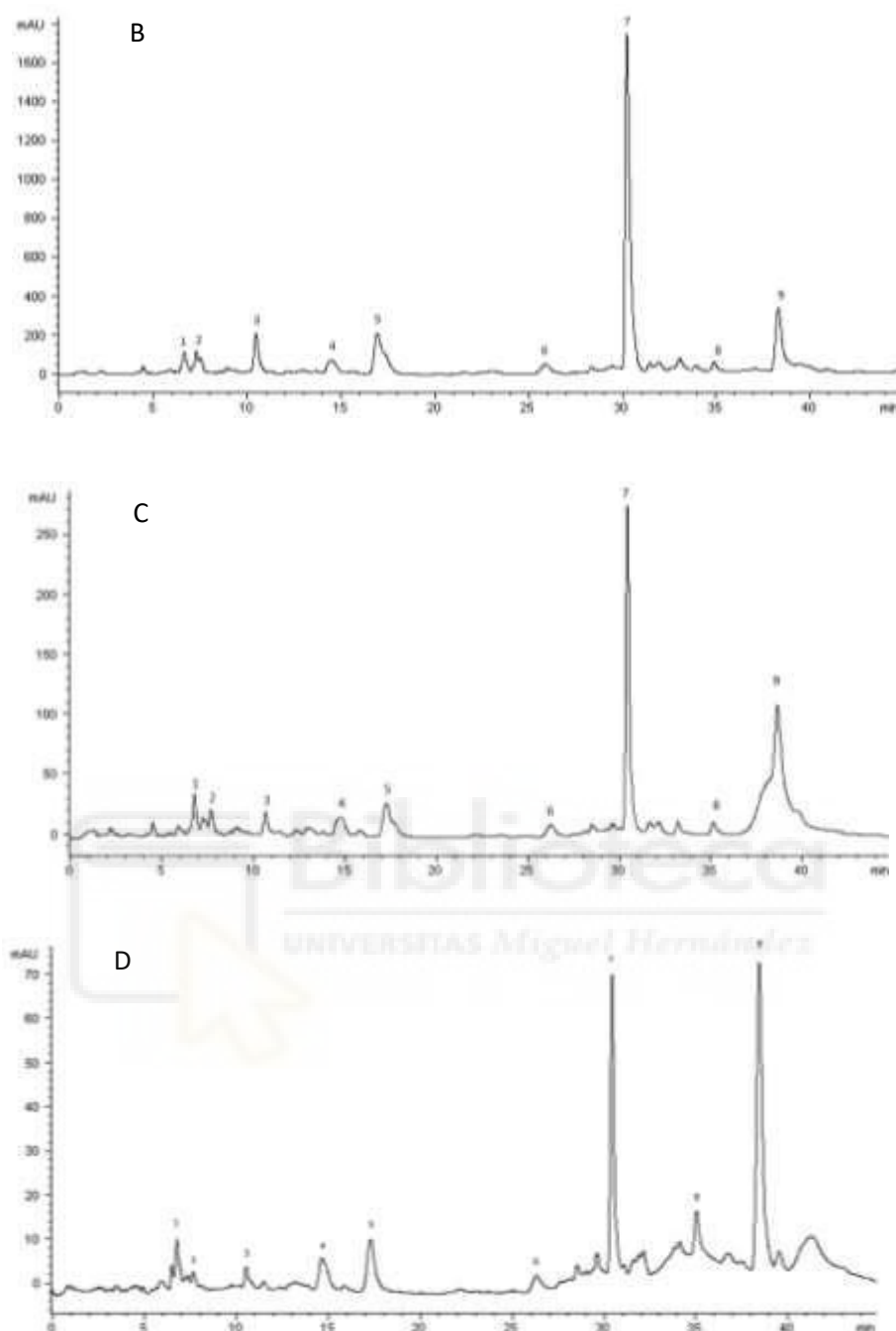


Figura 6. Cromatogramas de HPLC-DAD de carotenoides en diferentes extractos del subproducto de caqui A: (A) extracto en etanol, (B) extracto en acetona, (C) extracto en etanol/acetona (50:50 v/v) y (D) extracto de etanol/acetona/hexano (25:25:50 v/v/v). Los picos están etiquetados de la siguiente manera: 1 = neoxantina, 2 = violaxantina, 3 = zeaxantina, 4 = luteína, 5 = anteraxantina, 6 = β -criptoxantina 5,6-epóxido, 7 = β -criptoxantina, 8 = α -caroteno y 9 = β -caroteno.

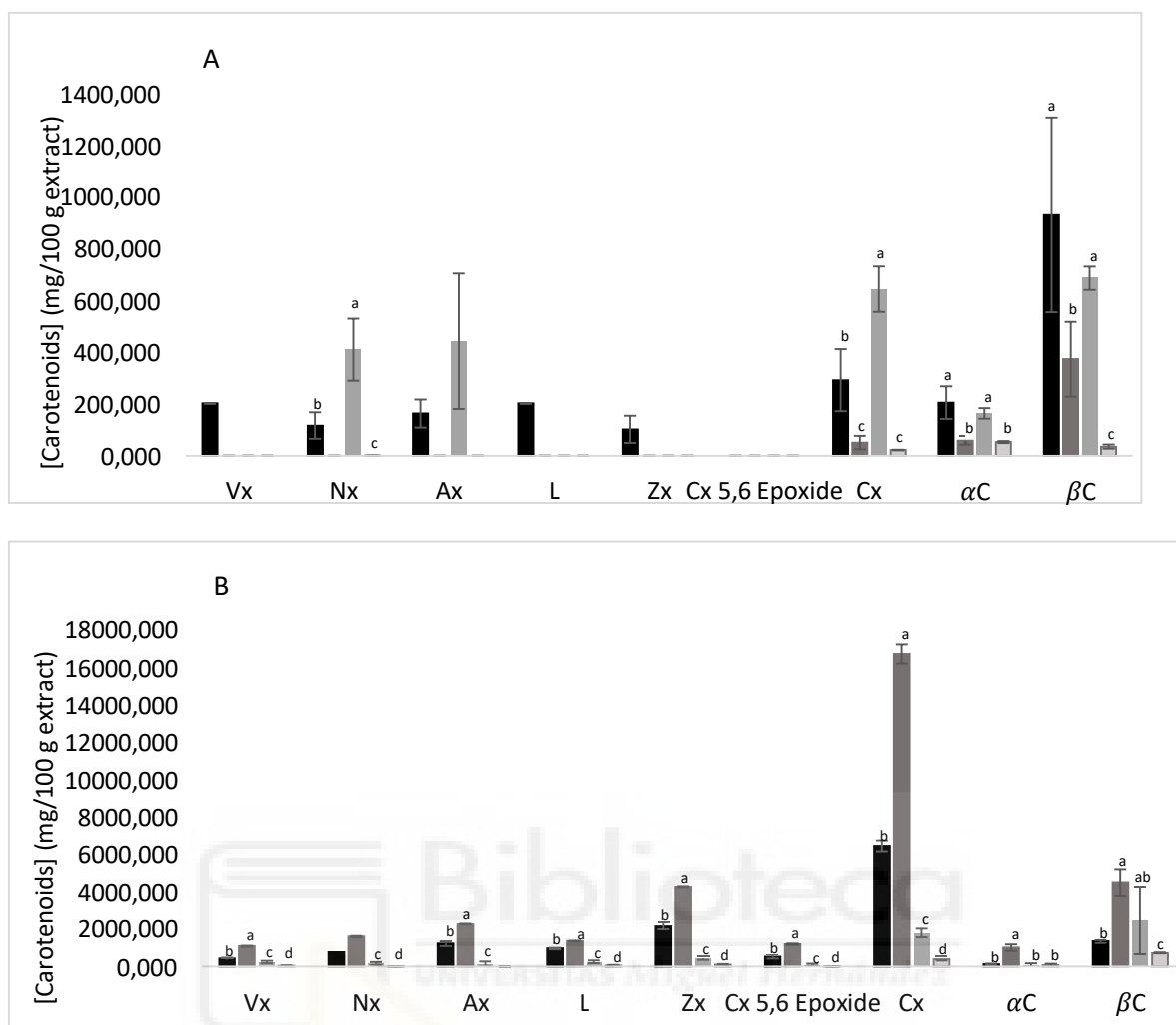


Figura 7. Contenido de carotenoides individuales (mg/100 g de extracto) de extractos de caqui obtenidos a partir de (A) subproducto A y (B) subproducto B utilizando diferentes disolventes o combinaciones de disolventes.

Resultados del capítulo 2

Para estudiar la viabilidad de las células HaCaT frente a diferentes concentraciones del extracto de acetona rico en carotenoides procedente del subproducto B de caqui (PEC), se realizó un ensayo MTT (**Fig. 8**). Los resultados mostraron que PEC, en el rango de concentración entre 10 y 180 $\mu\text{g/mL}$, no mostró ningún efecto tóxico en las células tratadas. Se seleccionaron dos concentraciones de PEC, una baja: 20 $\mu\text{g/mL}$ y otra alta: 50 $\mu\text{g/mL}$, para su posterior evaluación en el ensayo de fotoprotección de cultivos en monocapa de células HaCaT frente a la radiación tanto UV-A como UV-B.

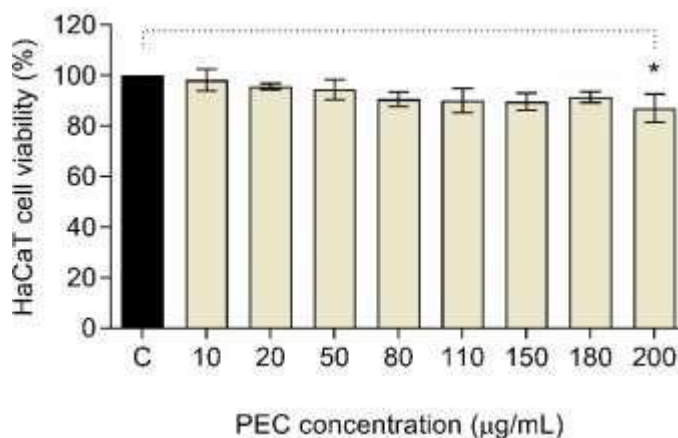


Figura 8. Actividades citotóxicas del extracto de subproducto de caqui (PEC) en la línea celular de queratinocitos humanos (HaCaT). El tratamiento con PEC a 200 µg/ml provocó una reducción ligeramente significativa de la viabilidad (* $p < 0,05$, ns $p > 0,05$, ANOVA y prueba post hoc de Dunnett).

Paralelamente, en un estudio preliminar en el que se ensayaron siete intensidades diferentes de UV-A (1, 5, 8, 10, 15, 20 y 25 J/m²) y cinco de UV-B (250, 500, 750, 1000 y 1250 J/m²) se seleccionaron las intensidades de 5 J/m² o 500 J/m², que permitían más del 50% de supervivencia celular en comparación con el control no irradiado, y 20 J/m² o 1000 J/m², que producían una baja viabilidad celular (~20%), para ensayos posteriores con radiación UV-A o UV-B, respectivamente. La viabilidad de las células irradiadas de queratinocitos humanos (HaCaT) después de un pretratamiento largo, corto y postirradiación con PEC se muestra en la **Fig. 9**. El tratamiento con PEC condujo a un aumento significativo de la viabilidad de HaCaT después de la irradiación, en comparación con el control irradiado, pero no tratado.

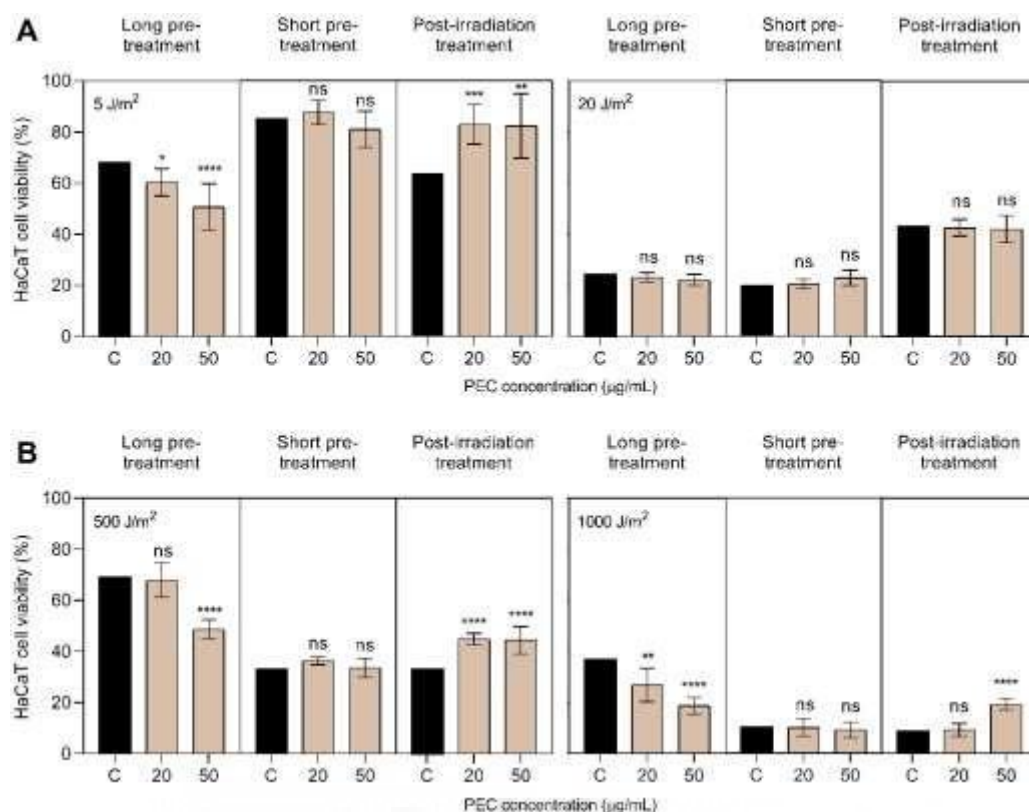


Figura 9. Viabilidad de las células de queratinocitos humanos (HaCaT) después de un tratamiento largo, corto y posterior con extracto de caqui rico en carotenoides (PEC) a baja (IPEC) y alta (hPEC) concentración contra (A) UV-A (5 y 20 J/cm²) y (B) intensidades de irradiación UV-B (500 y 1000 J/cm²). El tratamiento con PEC a IPEC (20 µg/mL) y hPEC (50 µg/mL) condujo a un aumento significativo de la viabilidad de HaCaT después de la irradiación en comparación con el control irradiado pero no tratado (C) (****p < 0,0001, ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05, ns p > 0,05, ANOVA y prueba post hoc de Dunnett). Todos los datos se normalizaron según el control no irradiado (100% de viabilidad).

Puesto que la exposición a la radiación UV-B incrementa los niveles intracelulares de especies de oxígeno reactivas (ROS), en un segundo ensayo se determinó el efecto sobre la generación de ROS en cultivos monocapa de células HaCaT previamente tratados con PEC. El tratamiento con PEC, en el rango de concentración entre 0.10 y 5.00 µg/mL, redujo los niveles de ROS intracelulares (**Fig. 10**).

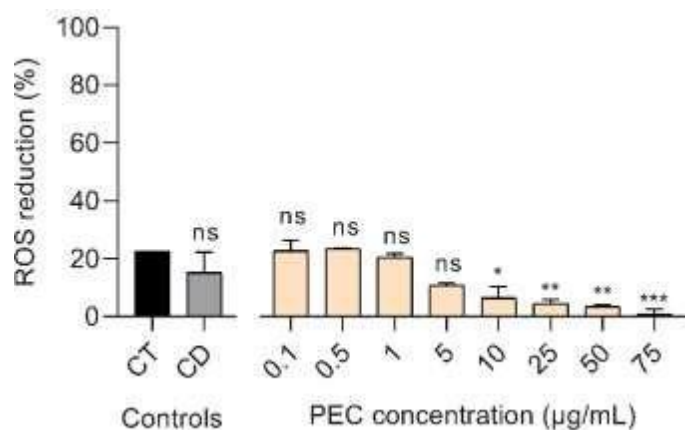


Figura 10. Porcentaje de reducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células HaCaT tratadas con extracto de caqui rico en carotenoides (PEC) después de la irradiación UV-B. El tratamiento con PEC de 0,10 a 5,00 µg/mL exhibió una reducción significativa en la producción de ROS similar al control con Trolox (CT) (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ns $p > 0,05$, ANOVA y prueba de Dunnett prueba a posteriori). Se utilizó control negativo con DMSO (CD) para determinar su interferencia en la producción de ROS. Todos los datos se normalizaron con la producción de ROS en células HaCaT no tratadas pero irradiadas.

Considerando una posible actividad antimicrobiana de PEC sobre la microbiota de la piel, se determinó, mediante un método colorimétrico de microdilución en caldo, la concentración mínima inhibitoria (MIC), la concentración mínima bactericida (MBC), la concentración mínima fungicida (MFC) y las concentraciones subinhibitorias (sICs) de PEC frente a cepas bacterianas o fúngicas residentes o patógenas de la piel. Todas las cepas probadas fueron susceptibles a PEC (**Fig. 11A**). Así, PEC exhibió una notable actividad antifúngica frente a *C. albicans* y *T. rubrum*, con valores de MIC de 3.75 y 0.94 mg/mL, respectivamente, así como valores de MFC de 30,00 y 7,50 mg/mL. Los valores de MIC para las cepas bacterianas de *C. acnes*, *E. coli*, *S. aureus* y *S. epidermidis* fueron 15.00, 7.50, 3.75 y 3.75 mg/ml, respectivamente. El valor de MBC para los patógenos *E. coli* y *S. aureus* fue de 60,00 mg/mL, mientras que el efecto bactericida de PEC contra *C. acnes* y *S. epidermidis* no se detectó a los niveles de concentración probados. PEC indujo una reducción significativa de las poblaciones de microorganismos, siendo el porcentaje de inhibición (%Inh) ligeramente mayor en hongos (~67%) que en bacterias (~58.3%). Las imágenes del efecto MIC de PEC en las poblaciones microbianas analizadas se muestran en la **Figura 11 B-G**.

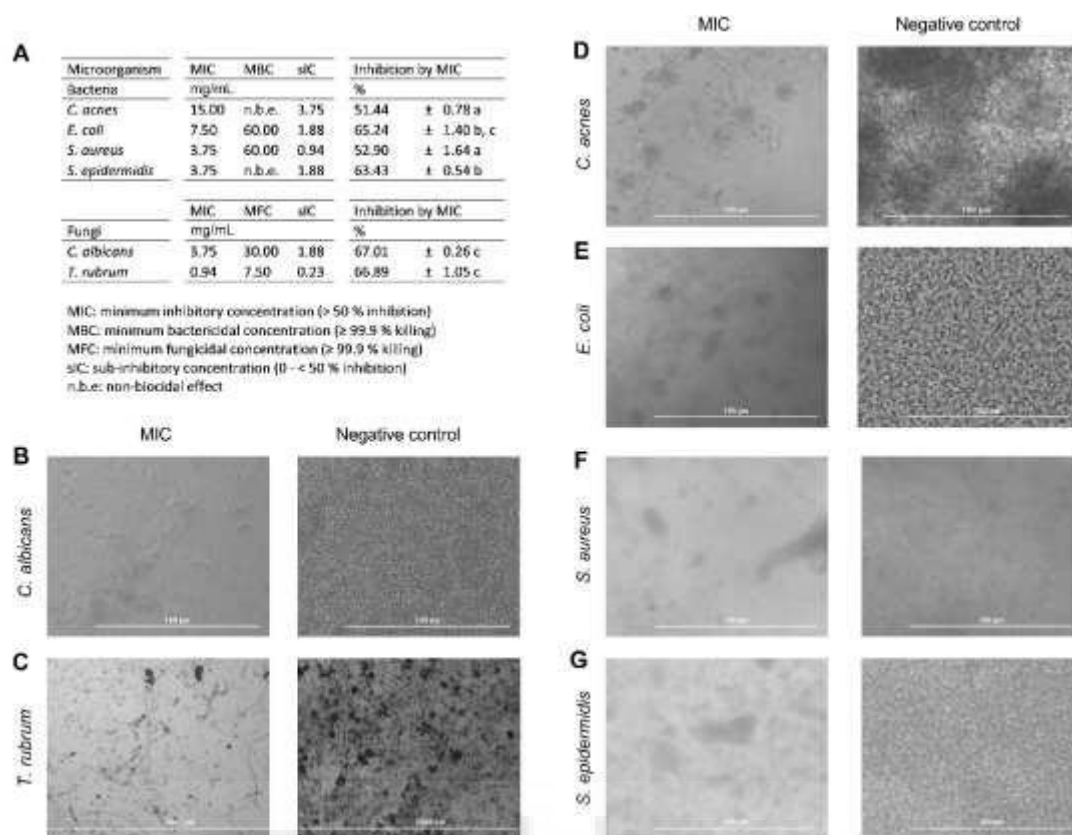


Figura 11. (A) Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC), biocidas (MBC) y subinhibitorias (sIC) del extracto de caqui rico en carotenoides (PEC) por ensayo de microdilución. Los valores de MIC de PEC dieron lugar a una inhibición significativa de las cepas microbianas pertenecientes al microbioma de la piel en comparación con los controles no tratados (diferentes letras mostraron diferencias significativas entre bloques microbianos ($p < 0,05$, ANOVA y prueba post hoc de Tukey)). Imágenes ópticas de pocillos que contenían PEC MIC -microorganismos vivos tratados (izquierda) o controles no tratados (derecha): (B) *Candida albicans*, (C) *Trichophyton rubrum*, (D) *Cutibacterium acnes*, (E) *Escherichia coli*, (F) *Staphylococcus aureus* y (G) *Staphylococcus epidermidis*.

Además, se evaluó el efecto de PEC sobre la adhesión microbiana en cultivos monocapa de las células HaCaT tratadas. *C. acnes* ($P < 0.05$), *S. epidermidis* ($P > 0.05$), *C. albicans* ($P < 0.001$) y *T. rubrum* ($P < 0.01$) aumentaron su capacidad de adhesión a las células monocapa HaCaT después de 2 a 3 h de coincubación, en comparación con los controles no tratados, alcanzando porcentajes de microorganismos adheridos iguales a 76.10 ± 7.86 , 106.67 ± 10.41 , 52.53 ± 1.87 y 29.73 ± 9.36 , respectivamente (Figs. 12A,B,E,F). Los resultados mostraron igualmente que las sICs de PEC afectaban negativamente el mecanismo de adhesión de los patógenos bacterianos

E. coli y *S. aureus* (Figs. 12C,D) a la monocapa de células HaCaT, mientras que estimulaban la capacidad de adhesión de los residentes comunes de la piel humana *C. acnes* y *S. epidermidis*.

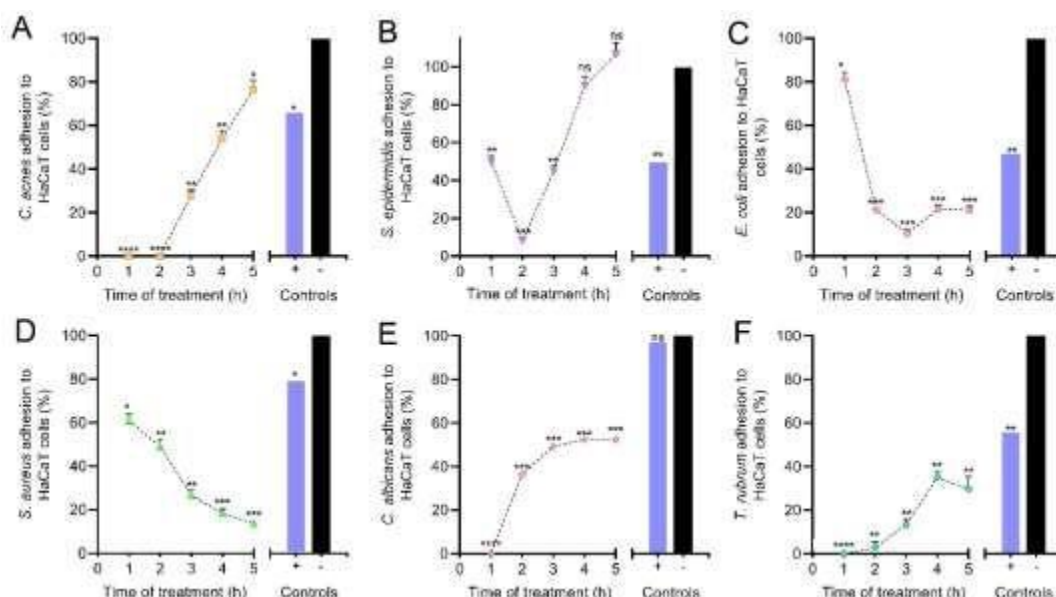


Figura 12. Porcentaje de adhesión microbiana (media $\pm$ DE) al extracto de caqui rico en células monocapa HaCaT tratadas con carotenoides (PEC). El tratamiento con PEC en MIC/4 condujo a una disminución significativa de la adhesión microbiana a las células HaCaT a lo largo del tiempo en comparación con el control negativo (**** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ns $p > 0,05$, ANOVA y prueba post hoc de Dunnett). Microorganismos: (A) *Cutibacterium acnes*, (B) *Staphylococcus epidermidis*, (C) *Escherichia coli*, (D) *Staphylococcus aureus*, (E) *Candida albicans*, (F) *Trichophyton rubrum*.

Finalmente, se determinó la cinética de liberación y permeación *in vitro* de una solución PEC-DMSO en celdas de difusión de Franz, así como el perfil de carotenoides de la solución permeada en las células receptoras mediante cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas en tándem (HPLC-PDA-MS/MS). El análisis MS/MS de muestras en el modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) mostró que de los carotenoides presentes en la solución PEC-DMSO, (cis)- α -criptoxantina, (cis)- β -criptoxantina, (cis)- α -caroteno, (cis)- β -caroteno, (All-trans)- α -caroteno y (All-trans)- β -caroteno, exhibieron un flujo más alto que los carotenoides restantes, por lo que fueron identificados en la solución permeada a través de membranas sintéticas Strat-M® en la celda receptora. Los carotenoides de PEC permearon significativamente más que el β -caroteno de control después de 24 h de exposición (Fig. 13).

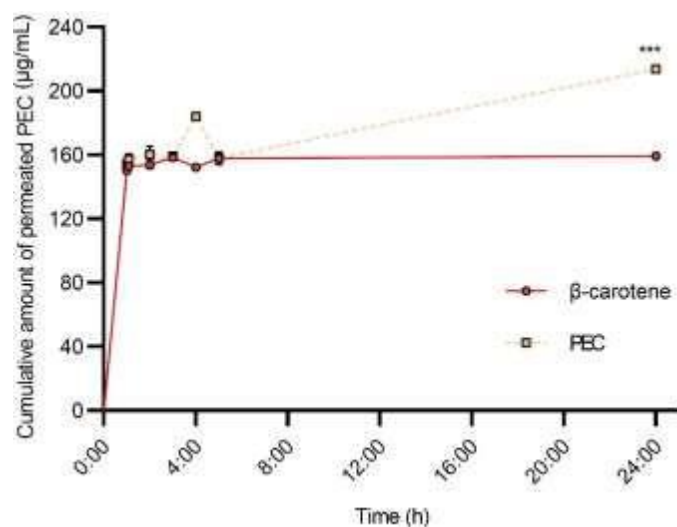


Figura 13. Cantidad acumulada (µg/mL) de extracto de caqui permeado rico en carotenoides (PEC) a través del modelo de membranas de piel sintética de células de difusión de Franz. Los carotenoides PEC permearon significativamente más que el β-caroteno de control después de 24 h de exposición (**p < 0,001, ANOVA y prueba t post hoc).



DISCUSIÓN

Discusión del capítulo 1

Una de las principales preocupaciones de las industrias alimentarias es la gran cantidad de residuos generados durante los diferentes procesos industriales, como por ejemplo, en la fabricación del zumo de caqui [72]. Para evitar la generación, acumulación y desperdicio de estos subproductos, se intenta promover el aprovechamiento y revalorización de los mismos. Las investigaciones y el desarrollo de procesos subyacentes en las industrias de alimentación llevan a investigadores como Jiménez-Sánchez et al. (2015) [78] a realizar analíticas cualitativas para caracterizar la composición de diferentes matrices de zumos obtenidos mediante distintas tecnologías para determinar qué procesos son los más eficientes. Otros [79] proponen nuevos usos para el aprovechamiento de las frutas descartadas y de los subproductos derivados de la industrialización del caqui. La nueva agroindustria debe convertirse en un sistema donde se utilice todo, tratando de eliminar la generación de residuos, según el concepto ZERI (emisiones cero investigaciones e iniciativas).

Los principales métodos de extracción de carotenoides, utilizando diferentes tejidos de caqui como fuentes naturales, son la extracción sólido-líquido [46,80], la extracción acelerada con solventes (ASE) [81], el tratamiento a alta presión (HP) [82], y la extracción con fluidos supercríticos (SFE) [83]. La elección del disolvente es siempre el factor más crítico para la extracción eficiente de carotenoides, y depende principalmente de la composición de carotenoides de la fuente natural [43]. Nuestros estudios revelaron la presencia predominante de xantofilas relativamente polares en los subproductos del caqui, lo que justificó la alta eficiencia de extracción alcanzada utilizando solventes polares como el etanol y especialmente la acetona.

Discusión del capítulo 2

Los experimentos de fotoprotección con cultivos monocapa de células HaCaT previamente irradiados con UV-B demostraron que PEC, a una concentración de 50 µg/mL, podría ser un ingrediente natural apto para su incorporación en formulaciones dermatológicas destinadas a la regeneración celular. Este efecto se requiere en la piel tras una alta exposición a la radiación solar, dado que puede sufrir daños graves como fotoenvejecimiento, carcinomas de piel y daño en el ADN [84,85].

Según Smith et al. (2009 [86] y Yeo & Liong (2013) [87] la radiación UV media sus efectos biológicos sobre las biomembranas predominantemente a través de la reacción de las ROS en la membrana celular, lo que conduce al deterioro de los lípidos de la membrana, la reorganización de la bicapa de fosfolípidos y la formación de poros. Tales alteraciones pueden aumentar la permeabilidad de la membrana, permitiendo la entrada rápida y masiva de PEC que bloquearía la producción de ROS y activaría un sistema completo para la reparación de las membranas celulares peroxidadas [88].

PEC indujo una reducción ligera, pero no estadísticamente significativa, de ROS a concentraciones entre 0.1 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$. A concentraciones altas de PEC (1-75 $\mu\text{g/mL}$), se observó una disminución en la reducción de ROS, lo que podría deberse a la interferencia en la medición de fluorescencia de la sonda DCF-DA con los carotenoides. Esto es así porque tanto la sonda DCF-DA utilizada para la evaluación de compuestos ROS como los carotenoides presentes en el PEC tienen su mayor absorbancia a 500 nm. Sería muy interesante utilizar otra sonda de medición para los compuestos ROS que no interfiriera con los carotenoides [89].

A pesar de la disponibilidad de una variedad de antibióticos naturales y sintéticos, el potencial de los carotenoides como nuevos antimicrobianos ha aumentado recientemente [90,91]. En este estudio, PEC demostró ser un agente antimicrobiano prometedor con actividad antibacteriana y antifúngica en los microorganismos probados y un gran impacto contra las cepas fúngicas (*C. albicans* y *T. rubrum*) y las bacterias grampositivas. Curiosamente, se observó una actividad antimicrobiana selectiva, debido a la falta de efectos biocidas contra los residentes comunes de la piel humana, *C. acnes* y *S. epidermidis*. Estos resultados sugieren que PEC podría actuar como un potencial agente prebiótico selectivo para la piel, evitando la proliferación de patógenos, al tiempo que permite el crecimiento de microorganismos residentes habituales. Esta actividad prebiótica potencial se observó en el ensayo de antiadherencia. PEC impidió la adhesión microbiana a las monocapas de células HaCaT de forma selectiva. *C. acnes* y *S. epidermidis* pudieron adherirse después de 5 h de incubación; por el contrario, los patógenos presentaron una disminución en su capacidad de adhesión, de manera progresiva.

Desde un punto de vista dermatológico, los carotenoides presentes en PEC se comportaron de acuerdo con la primera ley de Fick en modelos de piel sintética. Tanto la rápida estabilización de la acumulación de carotenoides como las altas tasas de liberación en las primeras horas favorecerían la administración transdérmica de PEC. Así, los resultados de permeación de carotenoide complementan y respaldan los obtenidos en los experimentos de fotoprotección con cultivos monocapa de células HaCaT previamente irradiados con UV-B. Ciertos carotenoides

presentes en PEC podrían penetrar y proteger las células contra ROS, mientras que la fracción no permeada reduciría el daño inducido en la superficie de la piel por los rayos UV.



CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones obtenidas de la Tesis son las siguientes:

1. Este estudio mostró que el subproducto B, resultante de un tratamiento con enzima pectinasa de maceración de pieles y pulpa de caqui para optimizar la extracción de zumo, era especialmente adecuado para la recuperación de carotenoides valiosos mediante extracción sólido-líquido, utilizando acetona absoluta como solvente.
2. El perfil de carotenoides individuales cuantificados en el extracto mediante HPLC-DAD incluye violaxantina, neoxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina 5,6-epóxido, β -criptoxantina, α -caroteno y β -caroteno.
3. El alto contenido de carotenoides que contienen un anillo de β -ionona no sustituido otorga a este extracto una importante actividad provitamina A y capacidad para desarrollar efectos biológicos y antioxidantes similares, bien sea en productos alimentarios o de otros usos, bien en la protección de membranas celulares o subcelulares.
4. El liofilizado de este extracto rico en carotenoides podría ser utilizado como ingrediente nutracéutico o biocéutico como alternativa farmacéutica con beneficios fisiológicos.
5. No se observó ningún efecto citotóxico tras la incubación del extracto de acetona rico en carotenoides procedente del subproducto B de caqui (PEC) con queratinocitos HaCaT a la concentración ensayada.
6. PEC ejerció un efecto regenerador en las células HaCaT previamente irradiadas con luz UV.
7. Los carotenoides β -criptoxantina y β -caroteno, junto con sus variantes isoméricas, fueron internalizados por los queratinocitos HaCaT y redujeron la generación de ROS inducida por la radiación UV-B en las células tratadas.
8. PEC mostró una actividad antimicrobiana selectiva dada la falta de efectos biocidas frente a los integrantes residentes comunes del microbioma de la piel humana.
9. El tratamiento con PEC estimuló la capacidad de adhesión de los microorganismos residentes comunes de la piel humana a las células HaCaT, al tiempo que mostró una actividad antiadherente significativa contra todos los patógenos probados.

10. PEC tiene un gran potencial para ser utilizado como ingrediente funcional en lociones o cremas para después del sol.



REFERENCIAS

- [1] Butt, M. S., Sultan, M. T., Aziz, M., Naz, A., Ahmed, W., Kumar, N., & Imran, M. (2015). Persimmon (*Diospyros kaki*) fruit: Hidden phytochemicals and health claims. *EXCLI Journal*, 14, 542-561.
- [2] Martínez-Calvo, J., Naval, M., Zuriaga, E., Llácer, G., & Badenes, M. (2013). Morphological characterization of the IVIA persimmon (*diospyros kaki thunb.*) germplasm collection by multivariate analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60(1), 233-241.
- [3] Chung, H., Kim, H., Lee, Y., & Seong, J. (2015). Effect of deastringency treatment of intact persimmon fruits on the quality of fresh-cut persimmons. *Food Chemistry*, 166, 192-197.
- [4] Giordani, E., Doumett, S., Nin, S., & Del Bubba, M. (2011). Selected primary and secondary metabolites in fresh persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.): A review of analytical methods and current knowledge of fruit composition and health benefits. *Food Research International*, 44(7), 1752-1767.
- [5] Li, P., Du, G., & Ma, F. (2011). Phenolics concentration and antioxidant capacity of different fruit tissues of astringent versus non-astringent persimmons. *Scientia Horticulturae*, 129(4), 710-714.
- [6] Mir-Marqués, A., Domingo, A., Cervera, M. L., & de la Guardia, M. (2015). Mineral profile of kaki fruits (*Diospyros kaki* L.). *Food Chemistry*, 172, 291-297.
- [7] Yamada, M., Giordani, E., & Yonemori, K. (2012) Persimmon. In: Badness, M.L. and Byrne D.H. (Eds.) *Fruit Breeding, Handbook of Plant Breeding*, pp. 663–693. Springer, New York.
- [8] Akagi, T., Ikegami, A., Suzuki, Y., Yoshida, J., Yamada, M., Sato, A., & Yonemori, K. (2009). Expression balances of structural genes in shikimate and flavonoid biosynthesis cause a difference in proanthocyanidin accumulation in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit. *Planta*, 230(5), 899-915.
- [9] Arnal, L., & Del Río, M.A. (2003). Removing astringency by carbon dioxide and nitrogen-enriched atmospheres in persimmon fruit cv. "Rojo Brillante". *Journal of Food Science*, 68(4), 1516-1518.

- [10] Arnal, L., Besada, C., Navarro, P., & Salvador, A. (2008). Effect of controlled atmospheres on maintaining quality of persimmon fruit cv. "Rojo Brillante". *Journal of Food Science*, 73(1), S26-S30.
- [11] Sato, A., & Yamada, M. (2016). Persimmon breeding in Japan for pollination-constant non-astringent (PCNA) type with marker-assisted selection. *Breeding Science*, 66(1), 60-68.
- [12] Giordani, E., Doumett, S., Nin, S., & Del Bubba, M. (2011). Selected primary and secondary metabolites in fresh persimmon (*diospyros kaki thunb.*): A review of analytical methods and current knowledge of fruit composition and health benefits. *Food Research International*, 44(7), 1752-1767.
- [13] Vázquez-Gutiérrez, J. L. (2012). Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre la estructura y estabilidad de tejidos vegetales. Relación con la extractabilidad de compuestos bioactivos. Universitat Politècnica de València.
- [14] FAOSTAT (2019). Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. Crops. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- [15] FEPEX (2021). Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas Vivas. Datos del sector. Exportación/Importación española de frutas y hortalizas. Fepex.es/datos-del-sector/exportación-importación-española-frutas-hortalizas.
- [16] MAPA (2021). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Anuario de Estadística. <https://www.mapa.gob.es/es/estadística/temas/estadísticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>.
- [17] Porter, S. D., Reay, D. S., Bomberg, E., & Higgins, P. (2018). Avoidable food losses and associated production-phase greenhouse gas emissions arising from application of cosmetic standards to fresh fruit and vegetables in Europe and the UK. *Journal of Cleaner Production*, 201, 869-878.
- [18] Ayala-Zavala, J. F. N., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J. A., Siddiqui, M. W., Dávila-Aviña, J.E., & González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7), 1866-1874.

- [19] Kodagoda, K. H. G. K., & Marapana, R. A. U. J. (2017). Utilization of fruit processing by-products for industrial applications: A review.
- [20] Lapornik, B., Prošek, M., & Wondra, A. G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*, 71(2), 214-222.
- [21] Fava, F., Zanaroli, G., Vannini, L., Guerzoni, E., Bordoni, A., Viaggi, D., & Esturo, A. (2013). New advances in the integrated management of food processing by-products in Europe: Sustainable exploitation of fruit and cereal processing by-products with the production of new food products (NAMASTE EU). *New Biotechnology*, 30(6), 647-655.
- [22] Boon, C. S., McClements, D. J., Weiss, J., & Decker, E. A. (2010). Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(6), 515-532.
- [23] Pinho, L., Rodrigues, C., Favaro-Trindade, C., & Campanella, O. (2021). The incorporation of carotenoids on ready to eat foods studied through their stability during extrusion processing. *Food Engineering Reviews*, 1-14.
- [24] Dimakou, C., & Oreopoulou, V. (2012). Antioxidant activity of carotenoids against the oxidative destabilization of sunflower oil-in-water emulsions. *LWT-Food Science and Technology*, 46(2), 393-400.
- [25] Berman, J., Zorrilla-López, U., Farré, G., Zhu, C., Sandmann, G., Twyman, R. M., & Christou, P. (2015). Nutritionally important carotenoids as consumer products. *Phytochemistry Reviews*, 14(5), 727-743.
- [26] Jaswir, I., Noviendri, D., Hasrini, R.F., & Octavianti, F. (2011) Carotenoids: Sources, medicinals properties and their application in food and nutraceutical industry. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 7119-7131.
- [27] Grashorn, M. (2016). Feed additives for influencing chicken meat and egg yolk color. *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages*, pp. 283-302. Elsevier.

- [28] Jamilah, B., Mohamed, A., Abbas, K., Abdul Rahman, R., & Karim, R. (2009). A review on the effect of animal diets and presence of selected natural antioxidants on lipid oxidation of meat. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7, 76-81.
- [29] Bolhassani, A. (2015). Cancer chemoprevention by natural carotenoids as an efficient strategy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 15(8), 1026-1031.
- [30] Csepanyi, E., Czompa, A., Haines, D., Lekli, I., Bakondi, E., Balla, G., & Bak, I. (2015). Cardiovascular effects of low versus high-dose beta-carotene in a rat model. *Pharmacological Research*, 100, 148-156.
- [31] Harrison, E. H. (2019). Mechanisms of transport and delivery of vitamin A and carotenoids to the retinal pigment epithelium. *Molecular Nutrition & Food Research*, 63(15), 1801046.
- [32] Celik, A., & Ercisli, S. (2008). Persimmon cv. hachiya (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit: Some physical, chemical and nutritional properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(7-8), 599-606.
- [33] Quispe, M. C. (2017). Cultivo del caqui (*Diospyros kaki* L.). *Revista Estudiantil AGRO-VET*, 1(1), 16-19.
- [34] Pérez-Burillo, S., Oliveras, M., Quesada, J., Rufián-Henares, J., & Pastoriza, S. (2018). Relationship between composition and bioactivity of persimmon and kiwifruit. *Food Research International*, 105, 461-472.
- [35] Meléndez-Martínez, A. J., Britton, G., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chemistry*, 101(3), 1145-1150.
- [36] Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345-351.
- [37] Carranco Jáuregui, M. E., Calvo Carrillo, M., & Pérez-Gil Romo, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos De Nutricion*, 61(3), 233-241.
- [38] Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(6), 459-516.

- [39] Nupur, L., Vats, A., Dhanda, S. K., Raghava, G. P., Pinnaka, A. K., & Kumar, A. (2016). ProCarDB: A database of bacterial carotenoids. *BMC Microbiology*, 16(1), 96.
- [40] Diprat, A. B., Menegol, T., Boelter, J. F., Zmozinski, A., Rodrigues Vale, M. G., Rodrigues, E., & Rech, R. (2017). Chemical composition of microalgae *Heterochlorella luteoviridis* and *Dunaliella tertiolecta* with emphasis on carotenoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(10), 3463-3468.
- [41] Zhao, Y., Guo, L., Xia, Y., Zhuang, X., & Chu, W. (2019). Isolation, identification of carotenoid-producing *Rhodotorula* sp. from marine environment and optimization for carotenoid production. *Marine Drugs*, 17(3), 161.
- [42] Berry, H. M., Rickett, D. V., Baxter, C., Enfissi, E., & Fraser, P. D. (2019). Carotenoid biosynthesis and sequestration in red chilli pepper fruit and its impact on colour intensity traits. *Journal of Experimental Botany*, 70(10), 2637–2650.
- [43] Saini, R. K., & Keum, Y. (2017). Progress in microbial carotenoids production. *Indian Journal of Microbiology*, 57(1), 129-130.
- [44] Zhu, C., Bai, C., Sanahuja, G., Yuan, D., Farré, G., Naqvi, S., & Christou, P. (2010). The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 504(1), 132-141.
- [45] Lehnert, S. J., Garver, K. A., Richard, J., Devlin, R. H., Lajoie, C., Pitcher, T. E., & Heath, D. D. (2018). Significant differences in maternal carotenoid provisioning and effects on offspring fitness in chinook salmon colour morphs. *Journal of Evolutionary Biology*, 31(12), 1876-1893.
- [46] Veberic, R., Jurhar, J., Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F., & Schmitzer, V. (2010). Comparative study of primary and secondary metabolites in 11 cultivars of persimmon fruit (*Diospyros kaki* L.). *Food Chemistry*, 119(2), 477-483.
- [47] Novillo, P., Besada, C., Tian, L., Bermejo, A., & Salvador, A. (2015). Nutritional composition of ten persimmon cultivars in the “ready-to-eat crisp” stage. Effect of deastringency treatment. *Food and Nutrition Sciences*, 6(14), 1296-1296.

- [48] Zhou, C., Zhao, D., Sheng, Y., Tao, J., & Yang, Y. (2011). Carotenoids in fruits of different persimmon cultivars. *Molecules*, 16(1), 624-636.
- [49] Gea-Botella, S., Agulló, L., Martí, N., Martínez-Madrid, M.C, Lizama, V., Martín-Bermudo, F., Berná, G., Saura, D., & Valero, M. (2021). Carotenoids from persimmon juice processing. *Food Research International*, 141, 109882.
- [50] Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2), 209-215.
- [51] Alam, S., Pal, A., Singh, D., & Ansari, K. M. (2018). Topical application of nextrutine inhibits ultraviolet B-induced cutaneous inflammatory responses in SKH-1 hairless mouse. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 34(1), 82-90.
- [52] Hatakeyama, M., Fukunaga, A., Washio, K., Taguchi, K., Oda, Y., Ogura, K., & Nishigori, C. (2017). Anti-inflammatory role of Langerhans cells and apoptotic keratinocytes in ultraviolet-B-induced cutaneous inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 199(8), 2937-2947.
- [53] Wu, N., Fang, J., Chen, M., Wu, C., Huang, C., & Hung, C. (2011). Chrysin protects epidermal keratinocytes from UVA- and UVB-induced damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(15), 8391-8400.
- [54] Baccarin, T., Mitjans, M., Ramos, D., Lemos-Senna, E., & Vinardell, M. P. (2015). Photoprotection by *Punica granatum* seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 153, 127-136.
- [55] Afaq, F., Syed, D. N., Malik, A., Hadi, N., Sarfaraz, S., Kweon, M., & Mukhtar, H. (2007). Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(1), 222-232.
- [56] Woodby, B., Penta, K., Pecorelli, A., Lila, M. A., & Valacchi, G. (2020). Skin health from the inside out. *Annual Review of Food Science and Technology*, 11, 235-254.

- [57] Golmohammadzadeh, S., Imani, F., Hosseinzadeh, H., & Jaafari, M. R. (2011). Preparation, characterization and evaluation of sun protective and moisturizing effects of nanoliposomes containing safranal. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 14(6), 521-533.
- [58] Saewan, N., & Jimtaisong, A. (2015). Natural products as photoprotection. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 14(1), 47-63.
- [59] Svobodová, A., Psotová, J., & Walterová, D. (2003). Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 147(2), 137-145.
- [60] Balić, A., & Mokos, M. (2019). Do we utilize our knowledge of the skin protective effects of carotenoids enough? *Antioxidants* 2019, 8(8):259.
- [61] Oh, J., Kim, J. H., Park, J. G., Yi, Y. S., Park, K. W., Rho, H. S., Lee, M. S., Yoo, J. W., Kang, S. H., Hong, Y. D., Shin, S. S., & Cho, J. Y. (2013). Radical scavenging activity-based and AP-1-targeted anti-inflammatory effects of lutein in macrophage-like and skin keratinocytic cells. *Mediators of Inflammation* 2013, 2013:787042.
- [62] Woodby, B., Penta, K., Pecorelli, A., Lila, M. A., & Valacchi, G. (2020). Skin health from the inside out. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, 11, 235-254.
- [63] Zerres, S., & Stahl, W. (2019). Carotenoids in human skin. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 158588.
- [64] Salamanca, C. H., Barrera-Ocampo, A., Lasso, J. C., Camacho, N., & Yarce, C. J. (2018). Franz diffusion cell approach for pre-formulation characterisation of ketoprofen semi-solid dosage forms. *Pharmaceutics* 2018, 10(3), 148.
- [65] Franz, T. J. (1975). Percutaneous absorption. On the relevance of *in vitro* data. *Journal of Investigative Dermatology*, 64(3), 190-195.
- [66] Franz, T. J. (1978). The finite dose technique as a valid *in vitro* model for the study of percutaneous absorption in man. *Current Problems in Dermatology*, 7, 58-68.

- [67] Ng, S. F., Rouse, J. J., Sanderson, F. D., Meidan, V., & Eccleston, G. M. (2010). Validation of a static franz diffusion cell system for *in vitro* permeation. *AAPS PharmSciTech*, 11(3), 1432-1441.
- [68] Patiño, L., & Morales, C. (2013). Microbiota de la piel: El ecosistema cutáneo. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, 21(2): 147-158.
- [69] Cogen, A., Nizet, V., & Gallo, R. (2008). Skin microbiota: A source of disease or defence? *British Journal of Dermatology*, 158(3), 442-455.
- [70] Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), 143.
- [71] Meléndez-Martínez, A. J. (2019). An overview of carotenoids, apocarotenoids, and vitamin A in agro-food, nutrition, health, and disease. *Molecular Nutrition & Food Research* 2019, 63, 1801045.
- [72] González, E., Vegara, S., Martí, N., Valero, M., & Saura, D. (2015). Physicochemical characterization of pure persimmon juice: Nutritional quality and acceptability. *Journal of Food Science*, 80(3), C532- C539.
- [73] Vegara, S., Mena, P., Martí, N., Saura, D., Valero, M. (2014). Approaches to understanding the contribution of anthocyanins to the antioxidant capacity of pasteurized pomegranate juices. *Food Chemistry*, 141, 1630-1636.
- [74] Kopec, R., Schweiggert, R.M., Riedl, K., Carle, R., & Schwartz, S.J. (2013). Comparison of high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/photo-diode array detection for the quantitation of carotenoids, retinyl esters, α -tocopherol and phylloquinone in chylomicron-rich fr. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27, 1393-1402.
- [75] Rivera, S.M., Christou, P., & Garayoa, R.C. (2014). Identification of carotenoids using mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 33, 353-372.
- [76] Giner, M.J., Hizarci, Ö., Martí, N., Saura, D., Valero, M. (2013). Novel approaches to reduce brown pigment formation and color changes in thermal pasteurized tomato juice. *European Food Research and Technology*, 236, 507-515.

- [77] Sardi, J.D.C.O., Polaquini, C.R., Freires, I.A., Galvao, L.C.D.C., Lazarini, J.G., Torrezan, G.S., Regasini, L.O., & Rosalen, P.L. (2017). Antibacterial activity of diacetylcurcumin against *Staphylococcus aureus* results in decreased biofilm and cellular adhesion. *Journal of Medical Microbiology*, 66, 816-824.
- [78] Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Martí, N., Saura, D., Valero, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2015). Characterization of polyphenols, sugars, and other polar compounds in persimmon juices produced under different technologies and their assessment in terms of compositional variations. *Food Chemistry*, 182, 282-291.
- [79] Martínez, A., Vegara, S., Saura, D., Valero, M., Martí, N. (2017). Physicochemical characterization of special persimmon fruit beers using Bohemian Pilsner malt as a base. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(3), 319-327.
- [80] Izuchi, R., Takahashi, H., & Inada, Y. (2009). Preparing a carotenoid polyphenol-enriched extract from the peel of persimmon, *Diospyros kaki* L.f. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(12), 2793-2795.
- [81] Zaghdoudi, K., Pontvianne, S., Framboisier, X., Achard, M., Kudaibergenova, R., Ayadi-Trabelsi, M., Guiavarc'h, Y. (2015). Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Food Chemistry*, 184, 131-139.
- [82] De Ancos, B., González, E., & Cano, M. P. (2000). Effect of high-pressure treatment on the carotenoid composition and the radical scavenging activity of persimmon fruit purees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3542-3548.
- [83] Zaghdoudi, K., Ngomo, O., Vanderesse, R., Arnoux, P., Myrzakhmetov, B., Frochot, C., & Guiavarc'h, Y. (2017). Extraction, identification and photo-physical characterization of persimmon (*Diospyros kaki* L.) carotenoids. *Foods*, 6(1), 4.
- [84] Nishigori, C. (2006). Cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 5, 208-214.
- [85] Sajo, M.E.J., Kim, C.-S., Kim, S.-K., Shim, K.Y., Kang, T.-Y., & Lee, K.-J. (2017). Antioxidant and Anti-inflammatory effects of shungite against ultraviolet B irradiation-induced skin damage in hairless mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017, 7340143.

- [86] Smith, H.L., Howland, M.C., Szmodis, A.W., Li, Q., Daemen, L.L., Parikh, A., & Majewski, J. (2009). Early stages of oxidative stress-induced membrane permeabilization: A neutron reflectometry study. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 3631-3638.
- [87] Yeo, S.-K., & Liong, M.-T. (2013). Effects and applications of sub-lethal ultrasound, electroporation and UV radiations in bioprocessing. *Annals of Microbiology*, 63, 813-824.
- [88] Fisher, A.B. (2017). Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 617, 68-83.
- [89] Lohan, S.B., Vitt, K. Scholz, P., Keck, C., & Meinke, M.C. (2018). ROS production and glutathione response in keratinocytes after application of β -carotene and VIS/NIR irradiation. *Chemico-Biological Interactions*, 280, 1-7.
- [90] Hraishawi, R.M., Abdul-Razak, A.S., Al-Hayder, M.N., & Al-wafi, H. (2020). Investigation the antimicrobial and antioxidant activity of lycopene extraction from *Solanum lycopersicum*.. *EurAsian Journal of BioSciences*, 14, 5305-5310.
- [91] Vargas-Sinisterra, A.F., & Ramírez-Castrillón, M. (2021). Yeast carotenoids: Production and activity as antimicrobial biomolecule. *Archives of Microbiology*, 203, 873-888.

Carotenoids from persimmon juice processing

S. Gea-Botella^a, L. Agulló^a, N. Martí^a, M.C. Martínez-Madrid^b, V. Lizama^c,
F. Martín-Bermudo^d, G. Berná^d, D. Saura^a, M. Valero^{a,*}

^a Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Edificio Torregaitán, Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH), Avenida de la Universidad s/n, 03202 Elche, Alicante, Spain

^b Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente, Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH), Campus de Orihuela, Carretera de Beniel km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

^c Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universidad Politécnica de Valencia, Avenida Fausto Elio s/n, Edificio 8E, Acceso F Planta 0, 46022 Valencia, Spain

^d Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa-CABIMER, Universidad Pablo de Olavide, Universidad de Sevilla, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 41092 Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Diospyros kaki

Persimmon

By-products

Solid-liquid extraction

Carotenoids

ABSTRACT

The aim of this study was the use and revalorization of two persimmon by-products A and B generated in the juice production process. The by-product B resulting from a pectinase enzymatic treatment of peels and pulp to optimize juice extraction was especially suitable for recovery of valuable bioactive carotenoids. The extraction solvents and solvent combinations used were: ethanol, acetone, ethanol/acetone (50:50 v/v) and ethanol/acetone/hexane (25:25:50 v/v/v). HPLC-DAD analysis detected and identified a total of nine individual carotenoids namely violaxanthin, neoxanthin, antheraxanthin, lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin 5,6-epoxide, β -cryptoxanthin, α -carotene, and β -carotene. β -cryptoxanthin and β -carotene represented 49.2% and 13.2% of the total carotenoid content (TCC) in the acetone extract from by-product B. TCC contributed greatly to anti-oxidant activity of acetone extract derived from this by-product. Pectinase enzymatic treatment of persimmon peels and pulp followed by absolute acetone extraction of carotenoids could be an efficient method to obtain a rich extract in these compounds that could be used as nutraceutical ingredient.

1. Introduction

The persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) is a tree of the Ebenaceae botanical family and is cultivated in subtropical climates (Martínez-Calvo, Badenes, & Llácer, 2012). It originates from China, Japan and Korea, but nowadays it has been extended to other countries such as Brazil, United States of America (USA), Australia and some countries present in the Mediterranean Sea coast such as Israel, Italy or Spain. After China and Korea, Spain is today the third largest world producer (404,131 t) ahead of Japan and Brazil (FAOSTAT, 2017). The western area of Andalucía mainly in the province of Huelva (specifically, in the municipalities of Cartaya, Lepe, Isla Cristina and Villablanca) and Sevilla, and Valencia Region highlight as the largest producers. According to Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) estimates, in 2018 production of persimmon in Andalucía was 56,780 t from the variety Sharon or Triumph marketed under the Sharoni brand, while Valencia Region produced 425,075 t of the Rojo Brillante variety

marketed under the protected denomination of origin (PDO) 'Kaki Ribera del Xúquer'.

It is remarkable that thousands tons of persimmon fruits (in particular, the Spanish Association of Persimmon currently estimates discarded fruits in the Valencia Region by about 18,000 t) are discarded every year due to a combination of the high quality standards of supermarkets, strict government regulations and the high expectations that consumers have when buying these fruits in terms of size, shape and color (Porter, Reay, Bomberg, & Higgins, 2018). Surplus fruits, damaged fruits and those fruits unacceptable to the consumers that result from prolonged storage and chemical treatments (Arnal & Del Río, 2003) require the development of new derivative products. In addition, fruits must be processed to facilitate their consumption and for commercial, logistic and economical reasons (Ayala-Zavala et al., 2011). This generates large quantities of by-products including peels, seeds and unused flesh in different steps of processing chain. These by-products are rich in valuable compounds which can be utilized in various industries as novel,

economical and natural sources of dietary fiber, antioxidants, pectin, enzymes, organic acids, food additives, essential oils, and others using different methods of extraction, purification and fermentation (Kodagoda & Marapana, 2017; Lapornik, Prošek, & Wondra, 2005). The actions of reusing plant by-products agree with Sustainable Development Goal number 12 (SDG 12) of the 2030 Agenda for Sustainable Development of the United Nations (UN General Assembly, 2015).

Persimmon fruits are rich dietary source of bioactive compounds such as vitamin C, dietary fiber, polyphenols and carotenoids (Gorinstein et al., 2001; Pérez-Burillo, Oliveras, Quesada, Rufián-Henares, & Pastoriza, 2018; Veberic, Jurhar, Mikulic-Petkovsek, Stampar, & Schmitzer, 2010) which may act in concert to provide their antioxidant, anti-inflammatory and other health-related properties useful to protect against non-communicable chronic diseases (Aune et al., 2017; Hosseini et al., 2018). Nowadays, the carotenoids have a great interest in the industry. Extensive research is allocated to the recovery and production of these compounds because of their functional properties. They are used as feed additives in animal nutrition (Jamilah, Mohamed, Abbas, Abdul Rahman, & Karim, 2009), natural colorants in foods, nutraceuticals and cosmetics (Berman et al., 2015; Jaswir, Noviendri, Hasrini, & Octavianti, 2011), and aromatic compounds precursors (Crupi et al., 2010). On the other hand, carotenoids are also used for their beneficial effect in the prevention of diseases such as cancers (Bolhassani, 2015), cardiovascular diseases (Csepányi et al., 2015), and degeneration of optical vision (Harrison, 2019).

The aim of this study was to obtain an extract rich in carotenoid pigments, using various solvents with different combinations such as ethanol, acetone, ethanol/acetone (1:1), and ethanol/acetone/hexane (25:25:50). As plant material, two by-products derived from the industrial production of persimmon juice were used. Various extracted carotenoids were identified and quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC), using diode array detector (DAD) and analytical standards.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

The carotenoid standards: violaxanthin (purity $\geq 95\%$), neoxanthin (purity $\geq 97\%$), antheraxanthin (purity $\geq 95\%$), lutein (purity $\geq 99\%$), zeaxanthin (purity $\geq 97\%$), β -cryptoxanthin (purity $\geq 97\%$), α -carotene (purity $\geq 97\%$) and β -carotene (purity $\geq 96\%$) were obtained from CaroteNature (Lupsingen, Switzerland). Methanol (MeOH), acetone (Ac), ethanol (EtOH), *n*-hexane (Hx), ethyl ether, chloroform, and potassium hydroxide (KOH, purity=90%) were from Panreac Química SLU (Castellar del Vallès, Barcelona, Spain). All HPLC organic solvents were of analytical grade. Folin-Ciocalteu reagent, potassium persulfate, sodium carbonate, gallic acid, ABTS [2,2'-Azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)], and AAPH [2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride] were purchased from Sigma-Aldrich Corp. (Saint Louis, Missouri, USA). Fluorescein (FL) and Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) were purchased from Fluka Chemika (Neu-Ulm, Germany). Ultrapure water was obtained from a purified water system Q-Gard® 1 from Merck Millipore (Darmstadt, Germany) with a resistivity of 18.0 M Ω ·cm. Gas nitrogen has been obtained from Air Liquide (Madrid, Spain).

2.2. Plant material

Batches of the fresh by-products A and B discarded in different days of fruit processing were purchased from Mitra Sol Technologies (Elche, Spain). Both by-products derived from persimmon fruits of the Sharon or Triumph variety (non-astringent, seedless, and hard) and are composed of peels and pulp resulting from different stages of industrial processing of persimmon juice (Fig. 1). By-product B was obtained by pectinase enzymatic treatment of by-product A to optimize juice extraction. So by-

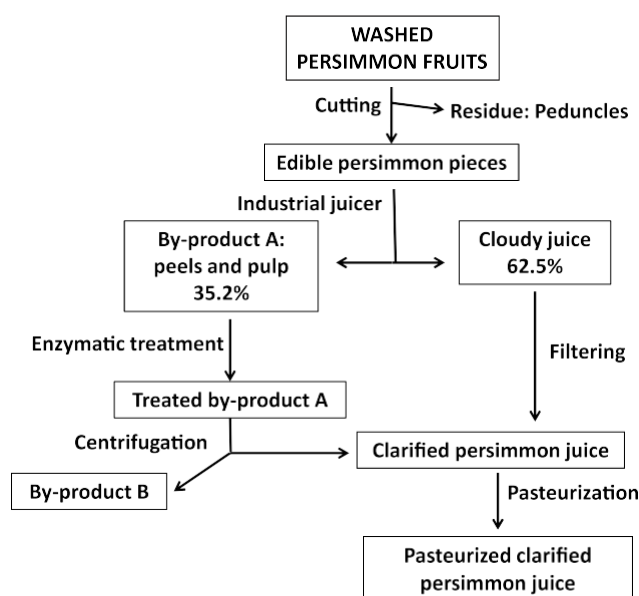


Fig. 1. Flow diagram of industrial production of persimmon juice.

product B had homogeneous granular appearance and orange color, while by-product A, which was obtained liquefying the edible parts of persimmon fruits using an industrial fruit juice machine, showed a more viscous and heterogeneous appearance.

Moisture content (%MC) for the two by-products was determined. 10 g samples were dried at 60 $\pm$ 1 °C in a drying oven (JP Selecta, Barcelona, Spain) and led to constant weight.

2.3. Solid-liquid extraction

The methodology for carotenoids extraction was described by Olives Barba, Cámara Hurtado, Sánchez Mata, Fernández Ruiz, and López Sáenz de Tejada (2006). Initially, fresh by-product A was washed with water (25:75 w/v) to eliminate residual sugars that could interfere with the subsequent drying process of extracts. Then, samples from both by-products A and B were divided into 4 portions and each of them were individually extracted three times with one of the solvents or solvent combinations assayed for 20 min at 40 °C and 150 rpm, until a colorless liquid was obtained. Extraction solvents and solvent combinations used were: ethanol, acetone, ethanol/acetone (50:50 v/v) and ethanol/acetone/hexane (25:25:50 v/v/v). The different extracts were reduced using a rotary evaporator low pressure (Series R-210, Buchi) at 40 °C in darkness. Residue was saponified with 5 mL of KOH (30%) during 1 h at 56 °C according to Müller (1997). Obtained solution was transferred to a funnel and mixed with 100 mL ethyl ether to separate the organic phase, which was subsequently washed three times with water according to Izuchi, Takahashi, and Inada (2009). Extracts were dried in a Genevac™ miVac Centrifugal Vacuum Concentrator (SP Scientific) at 40 °C for removing the residual water and lyophilized (Telstar Cryodos-80, Terrassa, Barcelona, Spain). Lyophilized extracts were stored at -80 °C. Extraction yield (EY) was expressed as mg/100 g dry weight (DW). The different extracts were obtained in triplicate.

2.4. Preparation of standards, calibration curve and HPLC-DAD analysis

All standard stock solutions were prepared and kept under nitrogen atmosphere at -20 °C until analysis. Violaxanthin, neoxanthin, antheraxanthin, lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, α -carotene, and β -carotene were separately dissolved in 1 mL of chloroform. Calibration curves were built with five concentrations (3.125, 6.25, 12.5, 25.0, and 50.0 mg/L) for each carotenoid standard, reaching R^2 values between

0.9279 and 0.9917. β -cryptoxanthin 5,6-epoxide was expressed as β -cryptoxanthin equivalents.

Lyophilized extracts were dissolved in acetone at a concentration of 20 mg/mL and were filtered through a 0.45 μ m PVDF syringe filter. In each sample, carotenoids composition was analyzed by HPLC-DAD (Rivera & Canela-Garayoa, 2012). Injection volume was 10 μ L. YMC Carotenoid HPLC Column, C30, 4.6 $\times$ 250 mm, 5 μ m (Teknokroma Analítica, Sant Cugat del Vallès, Barcelona, Spain) was used. Analysis was performed at 25 °C. Mobile phase consisted in a gradient of 60:40 (v/v) methanol/acetone (A), and 60:40 (v/v) acetone/water (B). Flow rate was 0.5 mL/min. The gradient profile of the mobile phase was set as follows: decreasing from 60% B to 30% B in 3 min; 30% B for 19 min; decreasing from 30% B to 10% B in 4 min; 10% B for 15.5 min; and increasing from 10% B to 60% B in 3.5 min (total run time 45 min). Chromatograms were recorded at 450 nm. Carotenoids were identified by comparison of the retention times (RTs) with those of authentic standards; just β -cryptoxanthin 5,6-epoxide was identified by matching the observed versus literature RT under identical chromatographic conditions (Cano, Gómez-Maqueo, Welti-Chanes, & García-Cayuela, 2018).

2.5. Determination of total phenols

For total phenolic compounds (TPC) determination, 5 mg lyophilized extracts were dissolved in 1 mL ethanol. TPC were determined with Folin-Ciocalteu reagent in a SPECTROstar Omega UV/VIS absorbance microplate reader (BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Germany) (González, Vegara, Marti, Valero, & Saura, 2015). 10 μ L of extract solution, 50 μ L Folin-Ciocalteu reagent, 100 μ L of aqueous 20% Na_2CO_3 and 100 μ L of distilled water were mixed. The mixture was kept for 30 min at room temperature before measuring absorbance at 750 nm. Gallic acid was used as calibration standard (concentrations: 100, 150, 200, 300, 350, 500, 750, and 1,000 mg/L; $R^2=9884$). Results were expressed as gallic acid equivalents (mg GAE/100 g extract).

2.6. Antioxidant activity

The antioxidant activity of the extracts was evaluated by both the ABTS radical scavenging and the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) antioxidant assay. The radical cation was prepared by the reaction between a 7 mM solution of ABTS in water mixed with a 2.45 mM solution of potassium persulfate and incubated 24 h in the dark at room temperature (González et al., 2015). Then, this solution was diluted with ethanol to reach an absorbance of 0.7 ± 0.02 at 734 nm, measured in the microplate reader SPECTROstar Omega. To determine the antioxidant activity of extracts, 200 μ L of the ABTS $^{+\cdot}$ solution was mixed with 20 μ L of a 5 mg/mL ethanolic solution of extract and after 6 min the absorbance was measured at 734 nm. Trolox was used as calibration standard (concentrations: 20.60, 41.25, 82.50, 165, and 330 mM; $R^2=9766$) and results were expressed as Trolox equivalents (mM TE/100 g extract).

To assay the capacity of extracts to scavenge peroxy radicals a validated ORAC method, which uses FL as the fluorescent probe (ORAC_{FL}), was utilized (Vegara et al., 2014). The automated ORAC assay was carried out on a FLUOstar Galaxy fluorescence microplate reader (BMG LABTECH GmbH). A freshly prepared AAPH water solution was used for each determination. The temperature of the incubator was set at 37 °C and the FL fluorescence was recorded every minute after the addition of AAPH. ORAC values were calculated by using a regression equation between the Trolox concentration and the net area of the FL decay curve ($R^2=0.9729$) and expressed as Trolox equivalents (mM TE/100 g extract).

2.7. Statistical analysis

Experiments were carried out in triplicate and results were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Analysis of variance (ANOVA) was

performed with GraphPad Prism® version 6.0 (San Diego, California, USA) and differences between means were estimated by post-hoc Tukey's HSD (honestly-significant-difference) test. Regression analysis was used to describe the relationship between TPC and ABTS or ORAC, as well as between total carotenoid content (TCC) and ABTS or ORAC.

3. Results

3.1. %MC of persimmon by-products

The %MC of the two persimmon by-products varied greatly. Estimated %MC, expressed as g water per 100 g fresh weight (FW), were found to be $94.10\pm0.73\%$ and $69.23\pm0.08\%$ for by-product A and B, respectively. The high %MC of by-product A suggests a large sugars content that would explain its sticky appearance.

3.2. EY

The EY for both by-products (A and B) obtained by the different extraction solvents are shown in Fig. 2A. In general, solid-liquid extraction for by-product A was more effective than for by-product B. Regardless of the solvent used in the extraction process, there were statistically significant differences in the amount of final dry extract. The highest amount of dry matter was obtained using absolute acetone as organic solvent ($10,413.66\pm2.90$ mg/100 g DW), followed by ethanol and the mixture of both solvents. The lowest EY was obtained using the solvent combination ethanol/acetone/hexane ($3,537.01\pm9.90$ mg/100 g DW). Significant differences were also observed between the determined EYs for by-product B. The highest EY was obtained with the solvent combination ethanol/acetone ($1,550.19\pm76.29$ mg/100 g DW) as well as ethanol alone ($1,531.99\pm50.56$ mg/100 g DW). The lowest EY was obtained using acetone as solvent (902.82 ± 21.14 mg/100 g DW) (Fig. 2A).

3.3. Extracted carotenoid quantity

TCC from the two persimmon by-products A and B was determined by summing up the individual carotenoid concentrations measured in each extract. In all cases, TCCs were higher in by-product B than in by-product A (Fig. 2B). The lowest TCC values were recorded for by-product A with values varying from $2,444.54\pm566.61$ mg/100 g in the ethanol/acetone extract to 111.61 ± 13.39 mg/100 g in the ethanol/acetone/hexane extract. By-product B provided the largest TCCs, i.e., $33,970.25\pm1,542.61$ mg/100 g in the acetone extract and $13,953.20\pm891.87$ mg/100 g in the ethanol extract (Fig. 2B).

3.4. Identification and quantification of extracted carotenoids

Representative HPLC-DAD chromatograms of carotenoids in different extracts from the persimmon by-product B are shown in Fig. 3A-D. Nine carotenoids including violaxanthin, neoxanthin, antheraxanthin, lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin 5,6-epoxide, β -cryptoxanthin, α -carotene, and β -carotene were identified by RTs (6.7, 7.4, 10.6, 14.5, 17.0, 25.9, 30.3, 34.9, and 38.4 min, respectively) coincident with the respective commercial standards or already reported values under identical chromatographic conditions (Cano et al., 2018).

As expected, the chromatographic profile of the main carotenoids found in all the extracts of persimmon by-products A and B was similar. On the contrary, individual concentration of all carotenoids present was clearly higher in by-product B than in by-product A (Fig. 4A and B). Moreover, the acetone extract derived from by-product B was the richest in carotenoids. The predominant carotenoid was β -cryptoxanthin ($16,709.90\pm518.70$ mg/100 g extract) followed by β -carotene ($4,479.07\pm13.71$ mg/100 g extract), zeaxanthin ($4,250.83\pm27.90$ mg/100 g extract), and antheraxanthin ($2,265.48\pm19.37$ mg/100 g extract) (Fig. 4A). The major carotenoid in the ethanol extract was

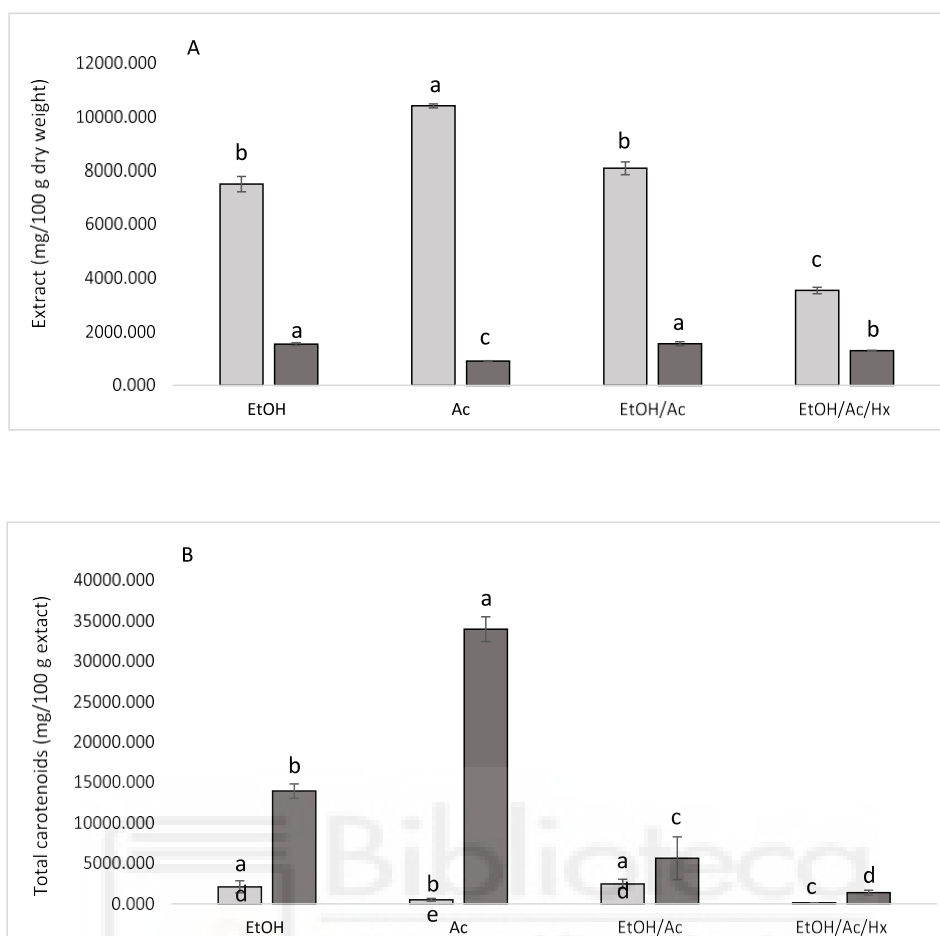


Fig. 2. (A) Extraction yields (mg/100 g dry weight) and (B) total carotenoid contents (mg/100 g extract) of persimmon extracts obtained from by-product A (□) and B (■) using different solvents or solvent combinations.

β -cryptoxanthin ($6,436.06 \pm 286.17$ mg/100 g extract) followed by zeaxanthin ($2,161.05 \pm 60.04$ mg/100 g extract). In comparison to previous both extracts, individual concentrations of all carotenoids were noticeably lower in the ethanol/acetone and the ethanol/acetone/hexane extracts from the same by-product B.

In by-product A, the highest individual carotenoid amounts were measured in the ethanol/acetone extract (Fig. 4B). The most abundant carotenoids in decreasing order were β -carotene (688.34 ± 45.20 mg/100 g extract), β -cryptoxanthin (645.65 ± 88.35 mg/100 g extract), antheraxanthin (443.94 ± 262.73 mg/100 g extract), and neoxanthin (411.43 ± 120.09 mg/100 g extract).

3.5. TPC

TPC determination indicated considerable variations among extracts from by-product B, which was selected for its higher concentration in carotenoids, since levels oscillated between ~ 49 and ~ 101 mg GAE/100 g extract (Table 1). The lowest value was recorded in the ethanol/acetone extract and the highest in acetone one, with 48.88 ± 3.84 and 101.28 ± 6.53 mg GAE/100 g extract, respectively.

3.6. Antioxidant activity

In this study, *in vitro* antioxidant activity of persimmon extracts was measured by two different analytical methods: ABTS and ORAC. Results are summarized in Table 1. Concerning ABTS, values varied significantly from ~ 3 to ~ 139 mM TE/100 g extract. According to TPC, the highest values were found in the acetone extract from by-product B, whilst the

lowest ones were recorded both in the ethanol/acetone and the ethanol/acetone/hexane extracts. ORAC results were higher than those already remarked for ABTS with respect to the biological activity assayed (Table 1). The acetone extract displayed a moderately large antioxidant activity (~ 455 mM TE/100 g extract) while the ethanol, ethanol/acetone, and ethanol/acetone/hexane extracts showed values between ~ 210 and ~ 302 mM TE/100 g extract.

TPC results were correlated to ABTS ($r = 0.9783$; $R^2 = 95.7141$) and ORAC ($r = 0.9116$; $R^2 = 83.1099$) at the 95% ($P = 0.0217 < 0.05$) and 90% ($P = 0.0884 < 0.10$) confidence level, respectively. Since the confidence level of correlations is $< 99\%$, this suggests that TPC contributes only partially to the antioxidant activity of the extracts studied in this work. The initial washing with water of the fresh by-product drastically decreased the extractable amount of these compounds. In contrast, there was a statistically significant relationship between TCC in the different extracts from by-product B and ORAC values at the 99% ($r = 0.9999$; $R^2 = 99.9836$; $P = 0.0001 < 0.01$) confidence level, suggesting that the carotenoids contribute greatly to the antioxidant activity of the persimmon by-product extracts.

4. Discussion

Although production of persimmon fruits is mainly intended for fresh consumption, many unsuitable fruits must be processed annually to produce new derived products such as persimmon juice. González et al. (2015) reported for the first time an enzyme maceration process for production of persimmon juice at semi industrial scale which has been successfully tested in the juice industry. Jiménez-Sánchez et al. (2015)

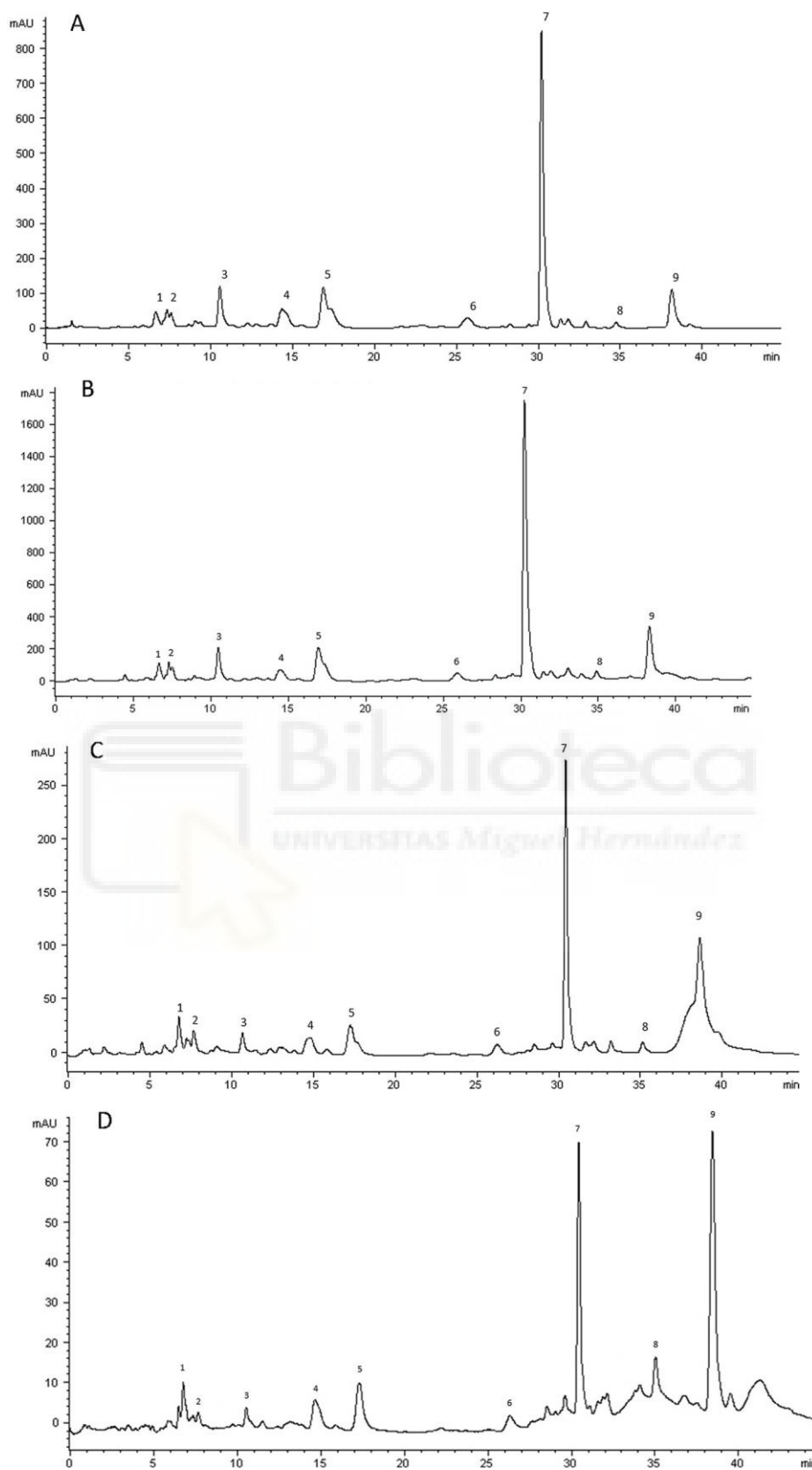


Fig. 3. HPLC-DAD Chromatograms of carotenoids in different extracts from persimmon by-product B: (A) Ethanol extract, (B) Acetone extract, (C) Ethanol/acetone (50:50 v/v) extract, and (D) Ethanol/acetone/hexane (25:25:50 v/v/v) extract. Peaks are labeled as follows: 1 = violaxanthin, 2 = neoxanthin, 3 = antheraxanthin, 4 = lutein, 5 = zeaxanthin, 6 = β -cryptoxanthin 5,6-epoxide, 7 = β -cryptoxanthin, 8 = α -carotene, and 9 = β -carotene.

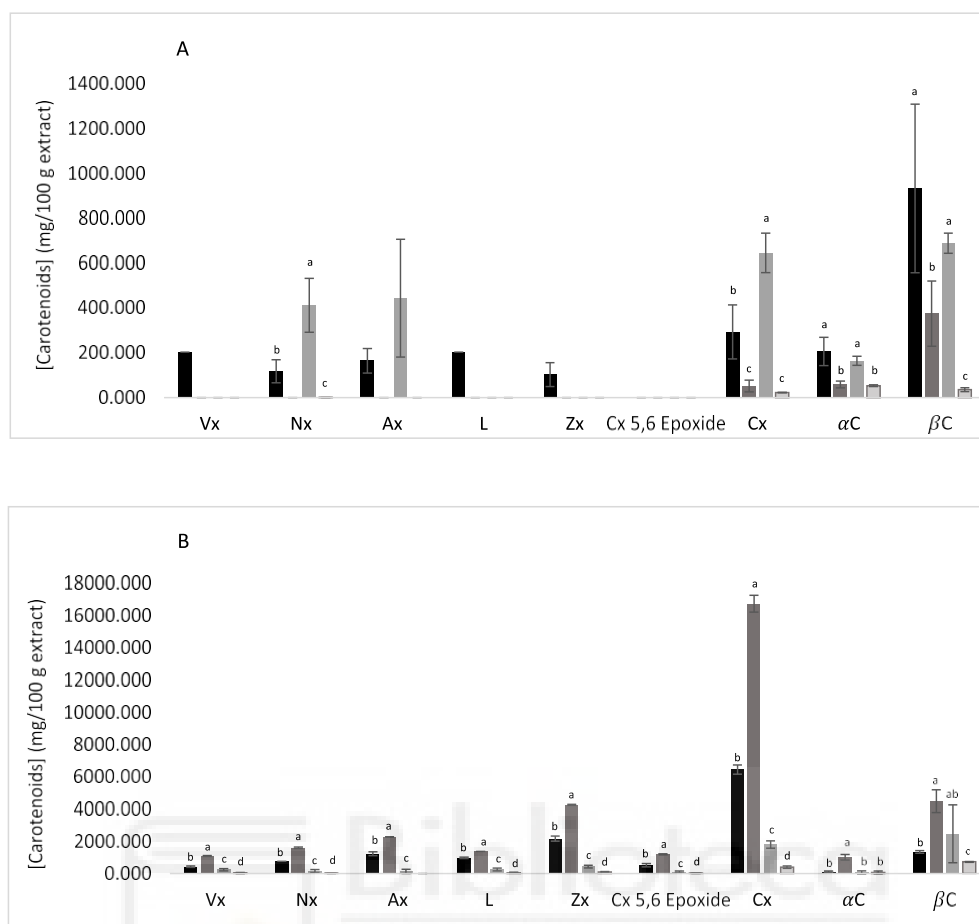


Fig. 4. Individual carotenoid contents (mg/100 g extract) of persimmon extracts obtained from (A) by-product A and (B) by-product B using different solvents or solvent combinations. Vx, violaxanthin; Nx, neoxanthin; Ax, antheraxanthin; L, lutein; Zx, zeaxanthin; Cx 5,6 Epoxide, β -cryptoxanthin 5,6 epoxide; Cx, β -cryptoxanthin; α C, α -carotene; and β C, β -carotene.

Table 1

Total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity assays (ABTS and ORAC) in different extracts from persimmon by-product B derived from juice processing.

Organic Solvents and Solvent Combinations	TPC (mg GAE/ 100 g extract)	ABTS (mM TE/ 100 g extract)	ORAC (mM TE/ 100 g extract)
Ethanol	86.64* $\pm$ 5.23b	123.37 $\pm$ 11.73	302.10 $\pm$ 8.77 b
Acetone	101.28 $\pm$ 6.53 a	138.98 $\pm$ 14.59 a	454.63 $\pm$ 11.65 a
Ethanol/Acetone	48.88 $\pm$ 3.84 c	11.61 $\pm$ 3.36 b	239.27 $\pm$ 10.60 c
Ethanol/Acetone/Hexane	54.79 $\pm$ 5.76 c	3.36 $\pm$ 0.29 c	210.00 $\pm$ 3.73 d

* Values are reported as mean $\pm$ standard deviation (SD). Means followed by different lower-case letters are significantly different ($P < 0.05$) according to the Tukey's multiple range test.

performed a complete qualitative analytical characterization through HPLC-DAD-ESI-TOF/MS of different persimmon juices produced under different technologies. Additionally, [Martínez, Vegara, Martí, Valero, and Saura \(2017\)](#) showed that production of persimmon beverages might open up new uses for discarded fruits. Unfortunately, juice industry generates a serious environmental problem of accumulation and waste disposal after processing. The new agro-industry should become a system where everything is used, trying to eliminate the generation of

waste, according to the ZERI (zero emissions researches and initiatives) concept.

In relation to the use and revalorization of persimmon by-products generated in the juice production process, by-product B resulting from a macerating pectinase treatment to optimize juice extraction was especially suitable for recovery of valuable bioactive compounds like carotenoids. Furthermore, enzymatic pretreatment of a persimmon slurry was also effective in releasing carotenoids from complex food matrix, thus significantly improving the extraction yield in a similar way to an enzyme-assisted extraction (EAE) non-thermal method ([Saini & Keum, 2018](#)). In the other hand, by-product B showed the lowest %MC, what is generally considered favorable for the efficient extraction of carotenoids due to their hydrophobic nature. In summary both enzymatic treatment of by-product A and low %MC of by-product B influenced greatly the carotenoid yields obtained.

The main extraction methods of carotenoids reported using different persimmon tissues, as natural sources, are solid-liquid extraction ([Izuchi et al., 2009; Veberic et al., 2010](#)), accelerated solvent extraction (ASE) ([Zaghdoudi et al., 2015](#)), high-pressure treatment (HP) ([De Ancos, González, & Cano, 2000](#)), and supercritical fluid extraction (SFE) ([Zaghdoudi et al., 2016](#)). The choice of solvent is always the most critical factor for efficient extraction of carotenoids, and mainly depends on the carotenoid composition of the natural source ([Saini & Keum, 2018](#)). Usually, presence of carotenoids with varied levels of polarity makes their simultaneous extraction difficult. Polar solvents such as acetone and ethanol were chosen for extraction of dipolar (lutein and zeaxanthin) and monopolar (β -cryptoxanthin) carotenoids, whereas a mixture of ethanol/acetone/hexane was applied for the simultaneous extraction of polar and non-polar carotenoids (lycopene and carotenes). In general, solvent combinations provide synergistic effects on the

extraction of carotenoids. Our studies revealed the predominant presence of relatively polar xanthophylls in the persimmon by-products, which justified the high reached extraction efficiency using polar solvents such as ethanol and especially acetone.

Persimmon by-products A and B showed different EYs expressed as mg dry extract per 100 g DW. The highest EYs were exhibited by the by-product A and these were approximately 4.9, 11.5, 5.2, and 2.7 times higher than those from by-product B for the solvents ethanol, acetone or the solvent combinations ethanol/acetone and ethanol/acetone/hexane, respectively. Obtained EYs were higher than those from the agro-industrial by-products grape marc, mango bagasse and peanut skin (Braga et al., 2016). Intermediate EYs were obtained when extractions from persimmon seed powder were performed with ethanol (4,850 mg/100 g extract) and acetone (2,580 mg/100 g extract) as absolute solvents (Akteer, Ahmed, & Eun, 2010). According to Babbar, Oberoi, Uppal, and Patil (2011), the type of plant residue would be more influential than the solvent system on extraction yield.

HPLC has become the method of choice for carotenoid analysis (Rivera & Canela-Garayoa, 2012) and reverse-phase columns like YMC Carotenoid C30 are the most widely used stationary phases for the analysis of these molecules. All of the identified carotenoids, except β -cryptoxanthin 5,6-epoxide and α -carotene, have been found in saponified extracts from flesh of persimmon fruits cv. Sharon grown in Spain (De Ancos et al., 2000). Carotenoid pattern changes in the peel of ripening persimmon fruits cv. Triumph were determined by Ebert and Gross (1985) using successive Thin-Layer Chromatographic (TLC) analytical methods. In this sense, the content of antheraxanthin, zeaxanthin, β -cryptoxanthin 5,6-epoxide, and β -cryptoxanthin increased in post-harvest intermediate ripe fruits (no fully ripe). The presence of lutein and β -carotene decreased drastically at the same ripening stage. In any case, β -cryptoxanthin and β -carotene represented 49.2% and 13.2% of the TCC determined in the acetone extract from by-product B. Additionally, the high content of both carotenoids give to this extract an important provitamin A value (De Ancos et al., 2000; Saini & Keum, 2018). Carotenoids which contain an unsubstituted β -ionone ring can be converted *in vivo* into vitamin A, developing the same biological effects.

Carotenoids have potential health benefits and some of them have been attributed to their antioxidant activity (Seifried, Harrison, & Seifried, 2017). According to Jomova and Valko (2013), carotenoids effectively scavenge peroxy radicals and act predominantly as antioxidants. The growing interest in the substitution of synthetic food antioxidants by natural ones has fostered research on plant sources and the screening of inexpensive or residual materials from agricultural industries for extracting new antioxidants (Moure et al., 2001). Although polyphenols are the major plant compounds with antioxidant activity, various studies (González et al., 2015; Mena et al., 2011; Tezcan, Gültekin-Özgüven, Diken, Özçelik, & Erim, 2009) have reported differences relating to the phenolic compounds contribution to antioxidant capacity assays. Our data pointed out that TPC contributed only partially to the antioxidant activity of persimmon by-product extracts obtained herein whereas the TCC greatly did.

5. Conclusion

Two by-products derived from the industrialization of persimmon juice were used for carotenoid extraction in order to revalue these agro-industrial residues. This study showed that the by-product B resulting from a macerating pectinase enzyme treatment to optimize juice extraction was especially suitable for recovery of valuable carotenoids. The high content of carotenoids which contain an unsubstituted β -ionone ring gave to this extract an important provitamin A activity and capacity to develop similar biological effects. Sequence of processing persimmon peels and pulp by a macerating pectinase enzyme followed by the solid-liquid extraction of carotenoids from the resulting by-product using absolute acetone as solvent could be an efficient method to obtain a lyophilized extract that could be used as a

nutraceutical ingredient.

CRedit authorship contribution statement

S. Gea-Botella: Investigation, Methodology, Formal analysis. **L. Agulló:** Investigation, Methodology. **N. Martí:** Conceptualization, Validation. **M.C. Martínez-Madrid:** Visualization, Supervision. **V. Lizama:** Methodology, Formal analysis. **F. Martín-Bermudo:** Conceptualization, Supervision. **G. Berná:** Investigation, Supervision. **D. Saura:** Conceptualization, Validation, Project administration. **M. Valero:** Conceptualization, Formal analysis, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Project administration.

Declaration of Competing 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.

Acknowledgment

This study was supported by Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades through the funded project 'Simbiosis industrial en el aprovechamiento integral del caqui (*Diospyros kaki*); Ejemplo de bioeconomía' (CTM2017-88978-R). Sara Gea-Botella thanks the Agencia Estatal de Investigación la Ayuda para la Formación de Doctores en Empresas "Doctorados Industriales" (DI-16-08465) through the B.D.I project entitled 'Evaluación *in vitro* e *in vivo* de un extracto procedente de subproductos de la industrialización del caqui'. The authors wish to thank Mitra Sol Technologies S.L. the given technical assistance.

References

- Akteer, M. S., Ahmed, M., & Eun, J. (2010). Solvent effects on antioxidant properties of persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Daebong) seeds. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(11), 2258–2264.
- Arnal, L., & Del Río, M. A. (2003). Removing astringency by carbon dioxide and nitrogen-enriched atmospheres in persimmon fruit cv. "Rojo brillante". *Journal of Food Science*, 68(4), 1516–1518.
- Aune, D., Giovannucci, E., Boffetta, P., Fadnes, L. T., Keum, N., Norat, T., ... Tonstad, S. (2017). Fruit and vegetable intake and the risk of cardiovascular disease, total cancer and all-cause mortality—a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Epidemiology*, 46(3), 1029–1056.
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J. A., Wasim Siddiqui, Md., ... González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44, 1866–1874.
- Babbar, N., Oberoi, H. S., Uppal, D. S., & Patil, R. T. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*, 44(1), 391–396.
- Berman, J., Zorrilla-López, U., Farré, G., Zhu, C., Sandmann, G., Twyman, R. M., ... Christou, P. (2015). Nutritionally important carotenoids as consumer products. *Phytochemistry Reviews*, 14(5), 727–743.
- Bolhassani, A. (2015). Cancer chemoprevention by natural carotenoids as an efficient strategy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents)*, 15(8), 1026–1031.
- Braga, G. C., Melo, P. S., Bergamaschi, K. B., Tiveron, A. P., Massarioli, A. P., & de Alencar, S. M. (2016). Extraction yield, antioxidant activity and phenolics from grape, mango and peanut agro-industrial by-products. *Ciência Rural*, 46(8), 1498–1504.
- Cano, M. P., Gómez-Maqueo, A., Welti-Chanes, J., & García-Cayuela, T. (2018). Characterization of carotenoid and carotenoid esters of astringent persimmon tissues (*Diospyros kaki* Thunb. var. Rojo Brillante). Effects of thermal and high pressure non-thermal processing. *Preprints*, 2018. <https://doi.org/10.20944/preprints201811.0548.v1>.
- Crupi, P., Coletta, A., Milella, R. A., Palmisano, G., Baiano, A., La Notte, E., & Antonacci, D. (2010). Carotenoid and chlorophyll derived compounds in some wine grapes grown in Apulian region. *Journal of Food Science*, 75, S191–S198.
- Csepányi, E., Czompa, A., Haines, D., Lekli, I., Bakondi, E., Balla, G., ... Bak, I. (2015). Cardiovascular effects of low versus high-dose beta-carotene in a rat model. *Pharmacological Research*, 100, 148–156.
- De Ancos, B., Gonzalez, E., & Cano, M. P. (2000). Effect of high-pressure treatment on the carotenoid composition and the radical scavenging activity of persimmon fruit purees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3542–3548.
- Ebert, G., & Gross, J. (1985). Carotenoid changes in the peel of ripening persimmon (*Diospyros kaki*) cv. Triumph. *Phytochemistry*, 24(1), 29–32.

- Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT) (2017). Crops. Available in <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed on May 2, 2019.
- González, E., Vegara, S., Martí, N., Valero, M., & Saura, D. (2015). Physicochemical characterization of pure persimmon juice: Nutritional quality and food acceptability. *Journal of Food Science*, 80(3), C532–C539.
- Gorinstein, S., Zachwieja, Z., Foltá, M., Barton, H., Piotrowicz, J., Zemser, M., ... Martín-Belloso, O. (2001). Comparative contents of dietary fiber, total phenolics, and minerals in persimmons and apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 952–957.
- Harrison, E. H. (2019). Mechanisms of transport and delivery of vitamin A and carotenoids to the retinal pigment epithelium. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2019, 1801046.
- Hosseini, B., Berthon, B. S., Saedisomeolia, A., Starkey, M. R., Collison, A., Wark, P. A. B., & Wood, L. G. (2018). Effects of fruit and vegetable consumption on inflammatory biomarkers and immune cell populations: A systematic literature review and meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 108, 136–155.
- Izuchi, K., Takahashi, H., & Inada, Y. (2009). Preparing a carotenoid polyphenol-enriched extract from the peel of persimmon, *Diospyros kaki* L.f. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(12), 2793–2795.
- Jamilah, B., Mohamed, A., Abbas, K., Abdul Rahman, R., & Karim, R. (2009). A review on the effect of animal diets and presence of selected natural antioxidants on lipid oxidation of meat. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7(2), 76–81.
- Jaswir, I., Novlendi, D., Hasrini, R. F., & Octavianti, F. (2011). Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(33), 7119–7131.
- Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Martí, N., Saura, D., Valero, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2015). Characterization of polyphenols, sugars, and other polar compounds in persimmon juices produced under different technologies and their assessment in terms of compositional variations. *Food Chemistry*, 182, 282–291.
- Jomova, K., & Valko, M. (2013). Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, 102–110.
- Kodagoda, K. H. G. K., & Marapana, R. A. U. J. (2017). Utilization of fruit processing by-products for industrial applications: A review. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 2(6), 24–30.
- Lapornik, B., Prošek, M., & Wondra, A. G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71(2), 214–222.
- Martínez, A., Vegara, S., Martí, N., Valero, M., & Saura, D. (2017). Physicochemical characterization of special persimmon fruit beers using bohemian pilsner malt as a base. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(3), 319–327.
- Martínez-Calvo, J., Badenes, M. L., & Llacer, G. (2012). Descripción de variedades de caqui (*Diospyros kaki* Trunb.) del banco de germoplasma del IVIA. Monografías INIA: Serie Agrícola n° 28. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid.
- Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D. A., Bartual, J., Saura, D., & Martí, N. (2011). Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(10), 1893–1906.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). (2018). <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., ... Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145–171.
- Müller, H. (1997). Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 204(2), 88–94.
- Olives Barba, A. I., Cámara Hurtado, M., Sánchez Mata, M. C., Fernández Ruiz, V., & López Sáenz de Tejada, M. (2006). Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Food Chemistry*, 95(2), 328–336.
- Pérez-Burillo, S., Oliveras, M., Quesada, J., Rufián-Henares, J., & Pastoriza, S. (2018). Relationship between composition and bioactivity of persimmon and kiwifruit. *Food Research International*, 105, 461–472.
- Porter, S. D., Reay, D. S., Bomberg, E., & Higgins, P. (2018). Avoidable food losses and associated production-phase greenhouse gas emissions arising from application of cosmetic standards to fresh fruit and vegetables in Europe and the UK. *Journal of Cleaner Production*, 201, 869–878.
- Rivera, S., & Canela-Garayoa, R. (2012). Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of Chromatography A*, 1224, 1–10.
- Saini, R. K., & Keum, Y.-S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240, 90–103.
- Seifried, R. M., Harrison, E. H., & Seifried, H. E. (2017). Antioxidants in health and disease. In A. M. Coulson, C. J. Boushey, M. G. Ferruzzi, L. M. Delahanty (Eds.) *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease*, 4th Edition, Chapter 16. Elsevier/Academic Press, Oxford, UK.
- Tezcan, F., Gültekin-Ozgülven, M., Diken, T., Özçelik, B., & Erim, F. B. (2009). Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chemistry*, 115(3), 873–877.
- UN General Assembly, Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development, 21 Oct. 2015, <https://www.refworld.org/docid/57b6e3e44.htm>.
- Veberic, R., Jurhar, J., Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F., & Schmitzer, V. (2010). Comparative study of primary and secondary metabolites in 11 cultivars of persimmon fruit (*Diospyros kaki* L.). *Food Chemistry*, 119(2), 477–483.
- Vegara, S., Martí, N., Lorente, J., Coll, L., Streitenberger, S., Valero, M., & Saura, D. (2014). Chemical guide parameters for *Punica granatum* cv. 'Mollar' fruit juices processed at industrial scale. *Food Chemistry*, 147, 203–208.
- Zaghdoudi, K., Framboisier, X., Frochot, C., Vanderesse, R., Barth, D., Kalthoum-Cherif, J., ... Guivarc'h, Y. (2016). Response surface methodology applied to supercritical fluid extraction (SFE) of carotenoids from persimmon (*Diospyros kaki* L.). *Food Chemistry*, 208, 209–219.
- Zaghdoudi, K., Pontvianne, S., Framboisier, X., Achard, M., Kudaibergenova, R., Ayadi-Trabelsi, M., ... Guivarc'h, Y. (2015). Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Food Chemistry*, 184, 131–139.

Article

Carotenoids from Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) Byproducts Exert Photoprotective, Antioxidative and Microbial Anti-Adhesive Effects on HaCaT

Sara Gea-Botella ¹, Bryan Moreno-Chamba ¹, Laura de la Casa ¹, Julio Salazar-Bermeo ¹ , Nuria Martí ¹,
María Concepción Martínez-Madrid ², Manuel Valero ^{1,*} and Domingo Saura ¹

¹ Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández de Elche, 03202 Alicante, Spain; sara_gb@hotmail.es (S.G.-B.); bryan.morenoc@umh.es (B.M.-C.); lauradlad@gmail.com (L.d.l.C.); julio.salazar@goumh.umh.es (J.S.-B.); nmarti@umh.es (N.M.); dsaura@umh.es (D.S.)

² Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente, Universidad Miguel Hernández de Elche, 03312 Alicante, Spain; c.martinez@umh.es

* Correspondence: m.valero@umh.es; Tel.: +34-96-522-2524



Citation: Gea-Botella, S.; Moreno-Chamba, B.; de la Casa, L.; Salazar-Bermeo, J.; Martí, N.; Martínez-Madrid, M.C.; Valero, M.; Saura, D. Carotenoids from Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) Byproducts Exert Photoprotective, Antioxidative and Microbial Anti-Adhesive Effects on HaCaT. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1898. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111898>

Academic Editor: Luisa Coderch

Received: 13 October 2021

Accepted: 4 November 2021

Published: 8 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 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/>).

Abstract: Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruits are a remarkable source of carotenoids, which have shown protective effects against UV radiation in bacteria, fungi, algae, and plants. The aim of this study was to analyze the photoprotection provided by an acetone extract, rich in carotenoids and obtained from byproducts derived from the persimmon juice industry, against UV-induced cell death in the keratinocyte HaCaT cell line. For this purpose, the cytotoxicity and phototoxicity of carotenoid extract, as well as its intracellular reactive oxygen species (ROS) scavenging and anti-adhesive activities towards HaCaT cells, were evaluated. The in vitro permeation test provided information about the permeability of the carotenoid extract. Persimmon extracts, rich in carotenoids (PEC), were absorbed by HaCaT keratinocyte cells, which reduced the UV-induced intracellular ROS production in treated cells. Thus, PEC exerted a photoprotective and regenerative effect on UV-irradiated HaCaT cells, and this protection was UV dose-dependent. No cytotoxic effect was observed in HaCaT cultures at the concentration tested. PEC treatment also stimulated the adhesion capacity of skin microbiome to HaCaT cells, while exhibiting a significant anti-adhesive activity against all tested pathogens. In conclusion, PEC showed potential for use as a functional ingredient in skin-care products.

Keywords: *Diospyros kaki*; UV radiation; photoprotection; reactive oxygen species; antimicrobial activity; skin-care cosmetics

1. Introduction

Epithelial tissues, that conform to the skin on all human bodies, are essential for protecting human organisms from exogenous threats, such as physical, chemical, and biological pollutants [1]. Epidermis, the outermost layer, composed mainly of keratinocytes, is often the first to be affected by environmental factors, such as solar radiation, oxidants, smoke, or infective microorganisms; constant exposure to external factors may alter skin health functions, such as thermoregulation, metabolism, homeostasis, sensing, and light-dependent production of vitamin D, among others [2,3].

Ultraviolet (UV) radiation is an important exogenous factor in the pathogenesis of human skin and can lead to the development of a series of skin disorders, including sunburn (erythema and edema), hyperplasia, carcinogenesis, DNA damage, immunosuppression, and photoaging [4–8]. Scientists categorize UV light into three different subtypes, according to wavelength: UV-A ($\lambda = 320\text{--}400\text{ nm}$) is UV light with the longest wavelength, and the least harmful, UV-B ($\lambda = 290\text{--}320\text{ nm}$), is mostly absorbed (95%) by the ozone in Earth's

atmosphere; UV-C ($\lambda = 100\text{--}290\text{ nm}$) is extremely dangerous and is almost completely absorbed by Earth's atmosphere [9].

The penetration efficacy of UV in human skin depends mainly on structural features and pigmentation. UV-B hardly passes beyond the epidermal layer; however, it does provoke inflammation, associated with local pain, reddening, and hyperthermia, as well as DNA damage; on the other hand, UV-A is involved in photoaging and photocarcinogenesis processes with a high reactive oxygen species (ROS) production [10,11]. The excessive generation of ROS, especially in the epidermis, results in an increase of lipid peroxidation, formation of protein adducts, apoptosis, and severe inflammatory events. Additionally, as the concentration of ROS towards deeper layers of dermal stratum increases, the outermost layers of dermis become vulnerable and more sensitive to outdoor stressors [12].

The weakening of skin shielding after solar/light radiation damage could lead to the eventual predisposition to exogenous threats, such as microbial infections. Human skin is colonized by millions of microbes that compose the skin microbiome; however, photodamage could disturb the commensals/pathogens ratio in the microbiome, leading to skin infections or even systemic diseases. For instance, it has been reported that psoriasis filamentous bacteria in skin can promote the accumulation of proinflammatory TH17 and TH1 cells, with an increase of inflammatory skin disorders [1,13].

Photodamage could also alter the skin homeostasis, with an impact on the differentiation, proliferation, and growth of cutaneous commensals and pathogens on the skin surface [13]. The changes in skin physiology site after UV exposition can cause unwanted changes by lipophilic microorganisms in sebaceous sites and the proliferation of pathogenic microbes, such as *Staphylococcus aureus* or some fungal strains [3]. Thus, an adequate supply of nutrients to the skin is required to guarantee its correct function, including photoprotection and antimicrobial shielding effects for therapeutic or preventive purposes [2]. The exogenous skin application of protective dermatological preparations containing topical sunscreens is commonly recommended [1,14–16].

Carotenoids are organic pigments from the group of isoprenoids that are found naturally in plants and algae, as well as several bacteria and fungi. At least part of the resistance of an Antarctic *Microbacterium* spp. against UV-B radiation relates to photoprotection by its carotenoid pigments [17]. Likewise, carotenoids and other health-promoting compounds, such as chlorophylls and flavonoids, can be elicited by increasing the levels of supplemental UV-B radiation in plants, bacteria, and algae [18–21]. Overall, natural carotenoids have evolved to play key roles in absorbing different wavelengths, according to their structure [12]. As lipophilic antioxidants, their topical application is closely related to skin protection from environmental factors, such as radiation or other external agents. Carotenoids had shown protective effects against UV radiation through their anti-inflammatory activity [1,16]. Lutein is able to protect against UV radiation-mediated skin irritation by suppressing the production of inflammatory mediators in keratinocyte (HaCaT) cells [15]. Similarly, astaxanthin inhibits inflammatory cytokine secretion from epidermal keratinocytes, in response to UV-B radiation [22]. Lycopene has been reported as the antioxidant that is most quickly depleted in skin upon UV irradiation; thus, it might play a protective role [23]. Even more, the presence of carotenoids reduces DNA damage when rat epithelial cells are exposed to UV-A radiation [24].

In addition, provitamin A carotenoids, such as α - and β -carotene and β -cryptoxanthin, are beneficial for skin, through the production of retinoic acid, which intervenes in processes including keratinocyte proliferation, epidermal differentiation and keratinization, reduction of inflammation or oxidation, enhancement of permeability of topical agents, treatment of acne, and other skin conditions [1,3]. Nowadays, the use of natural products in cosmetics for skin care photoprotection is of great interest, due to the benefits that generate these products, great acceptability by users, and low probability of systemic absorption [14]. Skin permeation of biocompounds depends upon the molecule's physiochemical properties, such as lipophilicity, molecular weight, and shape [25]. The functional effect of a carotenoid is determined by its permeation and subcellular localization [26].

Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruits are a remarkable source of carotenoids; moreover, studies have recently reported that the byproducts derived from persimmon juice industrial processing still hold high concentrations of these bioactive pigments [27,28]. The aim of this study was to investigate whether these byproduct extracts, high in carotenoids, showed biological activity in HaCaT cell monolayers exposed to UV-A- and UV-B-induced damage, commensal, and pathogen microorganisms from human skin and for in vitro permeation kinetics.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

The following were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain): 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), dimethyl sulfoxide (DMSO), and β -carotene. Modified Eagle's medium (DMEM, 4.5 g/L glucose), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, and Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) were purchased from Gibco Laboratories (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). Strat-M[®] Membranes were purchased by Millipore Corporation (Darmstadt, Germany). Acetone (Ac), ethanol (EtOH), and methanol (MeOH) were obtained from Panreac Química SLU (Barcelona, Spain). Ultrapure water was obtained from a purified water system Q-Gard[®] 1 from Merck Millipore (Darmstadt, Germany), with a resistivity of 18.0 M Ω ×cm.

2.2. Plant Material and Carotenoid-Rich Acetone Extraction

Persimmon byproduct (pulp, skin, and seeds) was provided by Mitra Sol Technologies S.L. (Elche, Spain), from the waste generated during the industrialization of persimmon juice. The persimmon byproduct was subjected to a solid–liquid extraction with acetone (1:3 *w/v*). The mixture was filtered to obtain liquid extract that was saponified with KOH and decanted with diethyl ether (1:2 *v/v*). Then, the pellet was washed with water to decant the resins generated in the saponification. The solvent was evaporated by a rotary evaporator under vacuum (Series R-210, Büchi, Barcelona, Spain) and lyophilized (Telstar Cryodos-80, Terrassa, Barcelona, Spain) to remove the remaining water. The carotenoid extract (oily-appearance and bright orange color) was kept under nitrogen atmosphere at -80°C , until further use.

2.3. Cellular Assays

2.3.1. Culture of HaCaT Cell Line

HaCaT cell line was purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Cells were cultured in DMEM, supplemented with FBS, 50 U/mL penicillin, and 50 mg/mL streptomycin, in 75 cm² flasks. The culture medium was changed twice a week and was maintained at 37 °C with CO₂ (5% *v/v*).

2.3.2. Cytotoxicity Assay

Cytotoxicity assay was performed, according to [29]. Cells were seeded in 96-well plates, at density of 7×10^3 cells per well, for 24 h. Considering carotenoids solubility in the culture media, cells were treated with different concentrations (10, 20, 50, 80, 110, 150, 180, and 200 $\mu\text{g/mL}$) of persimmon extract rich in carotenoids (PEC) for 48 h. After incubation time, DMEM was removed, MTT (5 mg/mL) was added, and cells were incubated at 37 °C under CO₂ atmosphere (5% *v/v*) for 2 h. The supernatant was discarded and 100 μL of DMSO were added. Cell viability was measured at 570 nm with Spectrostar Omega (BMG Labtech GmbH, Offenburg, Germany).

2.3.3. In Vitro UV Photoprotective Assay

The photoprotective activity of PEC on HaCaT cells, exposed to UV-A and UV-B irradiation, was determined according to [30]. HaCaT cells were seeded in 96-well plates (7×10^3 cells per well) and incubated overnight. The pre-treated group was exposed for

3 h (short pretreatment) or 24 h (long pretreatment) at two different concentrations of PEC (20 or 50 µg/mL of DMEM per well) before UV-A and UV-B irradiation. The post-treated group was exposed with the same concentrations of PEC after UV-A and UV-B irradiation. Incubation conditions were 37 °C under CO₂ atmosphere. For irradiation, culture media was removed, and cells were washed with PBS before exposure and kept in 50 µL of PBS during irradiation. Cells were exposed to different doses of UV-A (5 and 20 J/m²) and UV-B (500 a 1000 J/m²) irradiation through microprocessors Bio-Link® Crosslinker BLX-E312 and BLX-E365 (Biotech SL, Vilber Lourmat, France), sources of UV-A and UV-B radiation, respectively. Photoprotection effect in HaCaT cell viability was determined by MTT assay.

2.3.4. Intracellular ROS Scavenging Activity

DCFH-DA fluorescent probe was used to determine intracellular UV-B-induced ROS generation, in presence of PEC on HaCaT cells, according to [31], with modifications. Briefly, the cells were seeded in 96-well plates and treated with PEC (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, and 75 µg/mL) for 24 h (37 °C under CO₂ atmosphere). HaCaT cells were irradiated with UV-B at 500 J/m² intensity and then washed with PBS. Then, the cells were treated with DCFH-DA probe, diluted in DMEM, and further incubated for 1 h. The medium was discarded, and the cells were washed with PBS; fluorescence was measured immediately using multiplate-reader (Cytation™ 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader, BioTek Instruments, Inc., Bad Friedrichshall, Germany). Trolox-treated cells (CT) and non-PEC-treated cells, containing DMSO (CD), were used as positive and negative controls, respectively. The assays were carried out in triplicate.

2.4. Microbial Assays

2.4.1. Microbiology Culture Media and Reagents

Microbiological culture media used in this study consisted of potato dextrose broth (PDB) and buffered peptone water (BPW) (purchased from Scharlab (Barcelona, Spain)); tryptic soy broth (TSB) and tryptic soy agar (TSA) (from Labkem (Barcelona, Spain)); potato dextrose agar (PDA) (from Condalab (Madrid, Spain)); reinforced clostridial medium (RCM) (from Thermo Scientific (Madrid, Spain)). Antibiotics, such as kanamycin, gentamycin, erythromycin, ketoconazole, and triphenyl tetrazolium-chloride (TTC) (from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain)), were also used on these assays.

2.4.2. Microbial Strains and Inoculum Preparation

Commensal skin bacterial strains *Cutibacterium acnes* (CECT 5684) and *Staphylococcus epidermidis* (CECT 232), as well as skin pathogens, such as *Escherichia coli* (CECT 515), *Staphylococcus aureus* (CECT 59), and *Trichophyton rubrum* (CECT 2794), were obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT, Universitat de València, Valencia, Spain). *Candida albicans* (CLA22) was provided by Dra. Maria Francisca Colom Valiente (Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Miguel Hernández, Campus de Sant Joan D'Alacant, Alicante, Spain).

The inoculum activation of every microorganism was performed according to provider specifications. After incubation time of each microorganism, all microbial suspensions were normalized to a 0.5 McFarland standard (10⁸ colony forming units, CFU/mL) in 1% BPW, using a plate reader at 600 nm to measure optical density (OD) for bacterial count. Freshly serial dilutions were prepared in tubes with 1% BPW for assays.

2.4.3. Antimicrobial Assay

Prior to antimicrobial assays, PEC was dissolved in 70% DMSO. A modified colorimetric broth microdilution method was performed to individually determine the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal or fungicidal concentration (MBC or MFC), and sub-inhibitory concentration (sIC) of PEC against some bacteria and fungi resident on the human skin microbiome [32]. The antimicrobial assays were carried out by triplicate.

Briefly, 100 µL of TSB (bacteria), PDB (fungi), or RCM (*C. acnes*) were added to a 96-well microtiter plate. Then, 100 µL of PEC was added in the first column of plate. Serial two-fold dilutions were made in a concentration range from 60 to 0.117 mg/mL per well, with the final aliquot being discarded. Finally, 100 µL of microbial suspension at 10⁸ CFU/mL were added to each well. Kanamycin (200 µg/mL), gentamycin (20 µg/mL), and erythromycin (8 µg/mL) were used as positive controls for bacteria. Ketoconazole (500 µg/mL) was used as positive control for fungi plates. Untreated microorganisms in their corresponding culture media were used as negative control. To confirm no effects on tested strains, DMSO (17.5%) was also tested with microorganisms at the concentration used. Blanks of culture media and PEC were incubated, as well.

The plates were incubated at 37 °C for 24 h (bacteria) and 25 °C for 3 to 5 days (fungi). *C. acnes* was incubated in anaerobic conditions. After incubation, OD was measured, and percentage of inhibition (%Inh) of the microbial population was calculated using the following equation:

$$\%Inh = \frac{OD_{control} - OD_{experimental}}{OD_{control}} \times 100 \quad (1)$$

where OD_{control} and OD_{experimental} were the optical density, in absorbance units read at 600 nm, for negative control and cells exposed to PEC, respectively.

To confirm inhibition data, 10 µL of aqueous 0.5% TTC solution was added to each well and further incubated for 1 h. The plates were examined to determine color change. The MIC was defined as the minimum concentration of PEC, where there was an appreciable color change, compared to %Inh (>50%). The sIC were PEC concentrations that generated %Inh between 0 to 50%. Optical images of wells containing PEC MIC-treated and untreated live cells were performed using the Cytation 3 microplate reader.

MBC or MFC were determined via the culture drop spreading method. Aliquots of 10 µL from MIC and pre-MIC wells were separately plated on TSA, PDA, or RCM medium surfaces and allowed to dry at room temperature. Plates were incubated according to each microorganism's requirements. MBC or MFC were defined as no microbial growth observed (>99.9% killing).

2.4.4. Inhibitory Microbial Adhesion to HaCaT Cell Monolayers

HaCaT cells were cultivated and grown, according to [33], with minor modifications. Briefly, 1 × 10⁵ cells per well were inoculated in 24-well plates. After monolayer formation, PEC was diluted in antibiotic-free DMEM, to reach MIC/4 (sIC), and added to every well. Then, aliquots of 500 µL of microbial suspension (10³ CFU/mL) were added to each well, reaching a final volume of 1 mL per well. Plates were incubated at 37 °C under humidified atmosphere of CO₂ (5% v/v) for 5 h. After 1, 2, 3, 4, and 5 h of incubation, cells were washed three times with sterile PBS and then trypsinized. Aliquots of 100 µL were plated for microbial counting onto TSA, PDA, or RCM plates and incubated according to each microorganism's requirement. Wells untreated with sIC PEC were negative control, while wells with 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin sulphate were positive control. To ensure sterility of the assay, a blank of wells, without microbial suspension, was assessed. Microbial adhesion curve to HaCaT cell monolayer was plotted based on the final number of adhered bacteria in untreated groups (100% adhered microbial cells) after 5 h of incubation. The assay was performed by triplicate.

2.5. In Vitro Permeation Test

2.5.1. PEC Preparation

Due to the low solubility of carotenoids in polar solvents, 120 µg/µL PEC-DMSO or β-carotene-DMSO solutions were prepared, according to [34], and assessed for in vitro permeation in a Franz diffusion cell model.

2.5.2. Franz Diffusion Cell System

The cutaneous accumulation dynamics of PEC and β -carotene, as positive control, were analyzed in vitro using Franz diffusion cells [35]. Briefly, receptor cells from PermeGear® Inc. (Hellertown, PA, USA) were filled with 5 mL, 1 mM phosphate buffer (pH 7) with 5% DMSO. A 9 mm diameter synthetic Strat-M® membrane (EMD Millipore Corporation, Darmstadt, Germany) was placed on top, fixed with the donor compartment lid (diffusion area: 0.636 cm²), and left to equilibrate for 30 min in contact. The receptor cell temperature and stirring conditions were, respectively, stabilized at ~~32~~ 0.5 °C and 200 rpm, prior to the running of the permeation experiment; 314.3 μ L/cm² PEC-DMSO or β -carotene-DMSO solutions were applied to the donor cell.

Through the sampling arm, 200 μ L aliquots were withdrawn at 0.5, 1.5, 2, 3, 4, 5, and 24 h from the placement of solutions; then, withdrawn aliquots were immediately replaced with fresh receptor medium. The assay was carried out in triplicate.

2.5.3. High Performance Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry (HPLC-PDA-MS/MS) Analysis

Quantification and carotenoid profile of permeated PEC-DMSO solution into receptor cells were determined by HPLC-PDA-MS/MS [27]. The mobile phases and gradient conditions used for HPLC carotenoid analysis are shown in Table S1, while Table S2 summarizes the MS parameter settings for optimized analysis, performed in a Shimadzu LCMS-QP (Kyoto, Japan), equipped with binary pumps (LC-40D X3) and connected, in series, to a photodiode array (PDA) detector (SPD-M30A) and triple quadrupole mass spectrometer (LCMS-8050TM). The UV-visible spectra were obtained between 250 and 700 nm, and the chromatograms were processed at 450 nm; 1 μ L volume of each of the withdrawn aliquots of permeated PEC-DMSO solution was subjected to carotenoid analysis.

Calibration curves for lutein, β -cryptoxanthin, β -carotene, and lycopene with a minimum of five concentration (0.01–0.50 mg/mL) levels were built. Retention times of carotenoid molecular species were determined using standard compounds. UV-visible (λ max) and mass spectra were compared with data available in literature [36–40].

2.6. Statistical Analysis

The statistical analysis of obtained results was performed using GraphPad Prism 8.0.2. software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), with one-way analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's post hoc test to compare the means from several experimental groups against a control group mean to see if there is a significant difference. Tukey's post hoc test was performed for antimicrobial activity comparison.

3. Results

3.1. Cytotoxic Activity of PEC in HaCaT Cells

MTT assay was performed to study the HaCaT cell viability against different concentrations of PEC (Figure 1). Results showed that PEC, at the concentration range between 10 and 180 μ g/mL, showed no toxic effect in exposed cells; as a result, cell viability showed the same behavior as the control group ($\approx$ 100% viability). When HaCaT cells were treated with 200 μ g/mL of PEC, a significant decrease in exposed cells ($p < 0.05$) was observed, compared with the negative control. Given that PEC showed low cytotoxic effects, even at the highest concentration tested; concentrations higher than 200 μ g/mL could also be feasible to apply. However, the solubility properties of carotenoids must be considered.

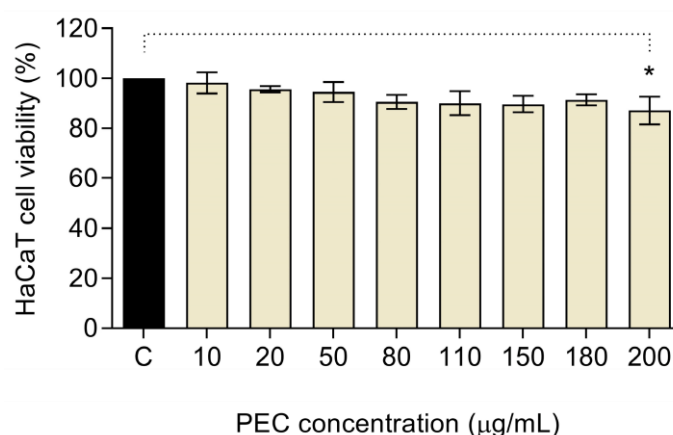


Figure 1. Cytotoxic activities of persimmon byproduct extract (PEC) on human keratinocytes (HaCaT) cell line. PEC treatment at 200 µg/mL provoked a slightly significant reduction on viability (* $p < 0.05$, ns $p > 0.05$, ANOVA, and Dunnett's post hoc test).

3.2. Photoprotective Activity of PEC against UV-A and UV-B Irradiation

UV irradiation intensities were selected in a preliminary study, in which seven different intensities of UV-A (1, 5, 8, 10, 15, 20, and 25 J/m²) and five of UV-B (250, 500, 750, 1000, and 1250 J/m²) were tested. For UV-A irradiation, the intensity of 5 J/m² was chosen for further assays, since it showed over 50% of cell survival, in comparison with non-irradiated control; whereas the intensity of 20 J/m² was also chosen because it showed low cell viability, about 20%. For UV-B irradiation, the intensities of 500 J/m² and 1000 J/m² were chosen for further assays, according to the same criteria. Figure 2 shows the viability of pre- and post-treated HaCaT cells with low (lPEC, 20 µg/mL) and high (hPEC, 50 µg/mL) concentrations of PEC, exposed to different radiation intensities of UV-A (5 and 20 J/m²) or UV-B (500 and 1000 J/m²).

As expected, a UV dose-dependent effect on cell death was observed, being more effective for higher UV intensities. Regardless of the UV radiation subtype used, the effect of PEC concentration on the viability of the irradiated HaCaT cells depended on the time at which the PEC was added. For instance, after long PEC treatment times, the presence of carotenoids in HaCaT cells slightly reduced cell viability, compared to untreated irradiated keratinocytes. On the contrary, the addition of PEC to cells after UV exposure enhanced the viability of the irradiated monolayer cultures of HaCaT keratinocytes. This positive effect was not observed when HaCaT cells were irradiated at 20 J/m² UV-A intensity (Figure 2A).

This result could be due to several reasons, including the variability of both UV-irradiated HaCaT cell cultures and viability counts. Finally, after short PEC treatment times, no significant differences in cell viability were observed between treated and untreated irradiated keratinocytes. Although this described cell response was reproduced at the high intensities of UV radiation, tested in these photoprotective experiments, perhaps significantly lower doses would have made more definite and clear results possible. In any case, the overall results suggest a photoprotective and regenerating effect of PEC treatment in the monolayer cultures of HaCaT keratinocytes subjected to UV irradiation.

3.3. Effect of PEC on UV-B-Induced ROS Production in Treated HaCaT Cells

Intracellular ROS levels can be increased after UV-B exposure [41]. In this sense, HaCaT keratinocytes were treated with 0.1–75 µg/mL PEC concentration range for 24 h and then were irradiated with UV-B (500 J/m²). Intracellular ROS production was determined, in comparison with the Trolox (CT) positive control, while DMSO (CD) served as a negative control. PEC treatment at the concentration range of 0.1–5 µg/mL reduced intracellular ROS levels by a similar percentage to both cell controls (Figure 3). Nevertheless, administration of ≥10 µg/mL PEC concentrations showed a marked decrease in ROS reduction.

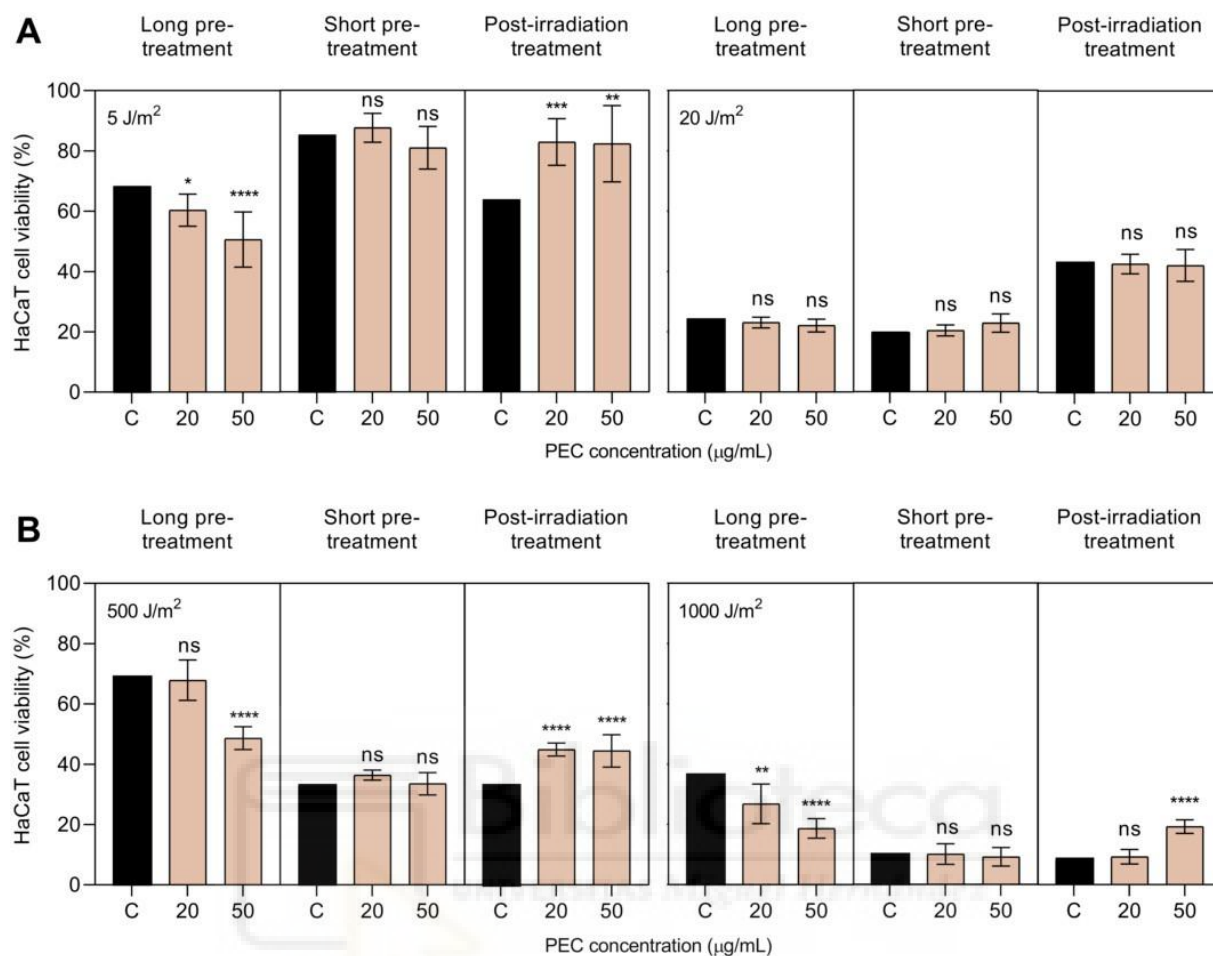


Figure 2. Viability of human keratinocytes (HaCaT) cells after long, short, and post-treatment with persimmon extract rich in carotenoids (PEC) at low (IPEC) and high (hPEC) concentration against (A) UV-A (5 and 20 J/m²) and (B) UV-B (500 and 1000 J/m²) irradiation intensities. PEC treatment at IPEC (20 µg/mL) and hPEC (50 µg/mL) led to a significant increase of HaCaT viability post-irradiation, compared to irradiated but non-treated control (C) (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns $p > 0.05$, ANOVA, and Dunnett's post hoc test). All data were normalized, according to a non-irradiated control (100% viability).

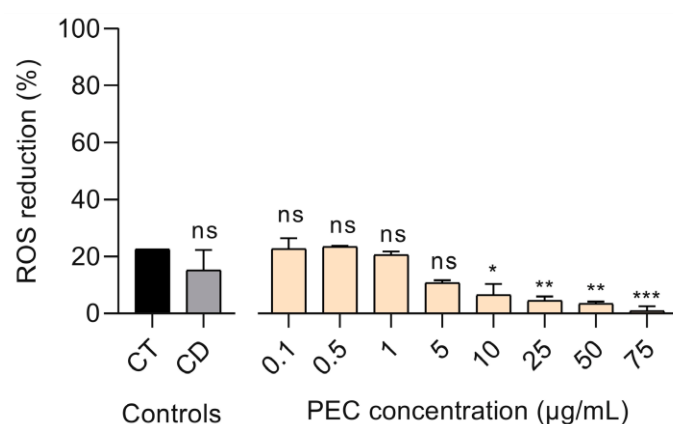


Figure 3. Percentage of reactive oxygen species (ROS) reduction in persimmon extract, rich in carotenoids (PEC)-treated HaCaT cells after UV-B irradiation. PEC treatment from 0.10 to 5.00 µg/mL exhibited a significant reduction in ROS production similarly to Trolox control (CT) (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns $p > 0.05$, ANOVA, and Dunnett's post hoc test). Negative control with DMSO (CD) was used to determine its interference in ROS production. All data were normalized with ROS production in untreated, but irradiated, HaCaT cells.

3.4. Antimicrobial Activity Results

In this study, all tested strains were susceptible to PEC (Figure 4A). Thus, PEC exhibited notable antifungal activity against *C. albicans* and *T. rubrum*, with MIC values of 3.75 and 0.94 mg/mL, respectively, as well as MFC values of 30.00 and 7.50 mg/mL. MIC values for *C. acnes*, *E. coli*, *S. aureus*, and *S. epidermidis* bacterial strains were 15.00, 7.50, 3.75, and 3.75 mg/mL, respectively. MBC value for pathogens *E. coli* and *S. aureus* were 60.00 mg/mL, while bactericidal effect of PEC against *C. acnes* and *S. epidermidis* were not detected at the concentration levels tested.

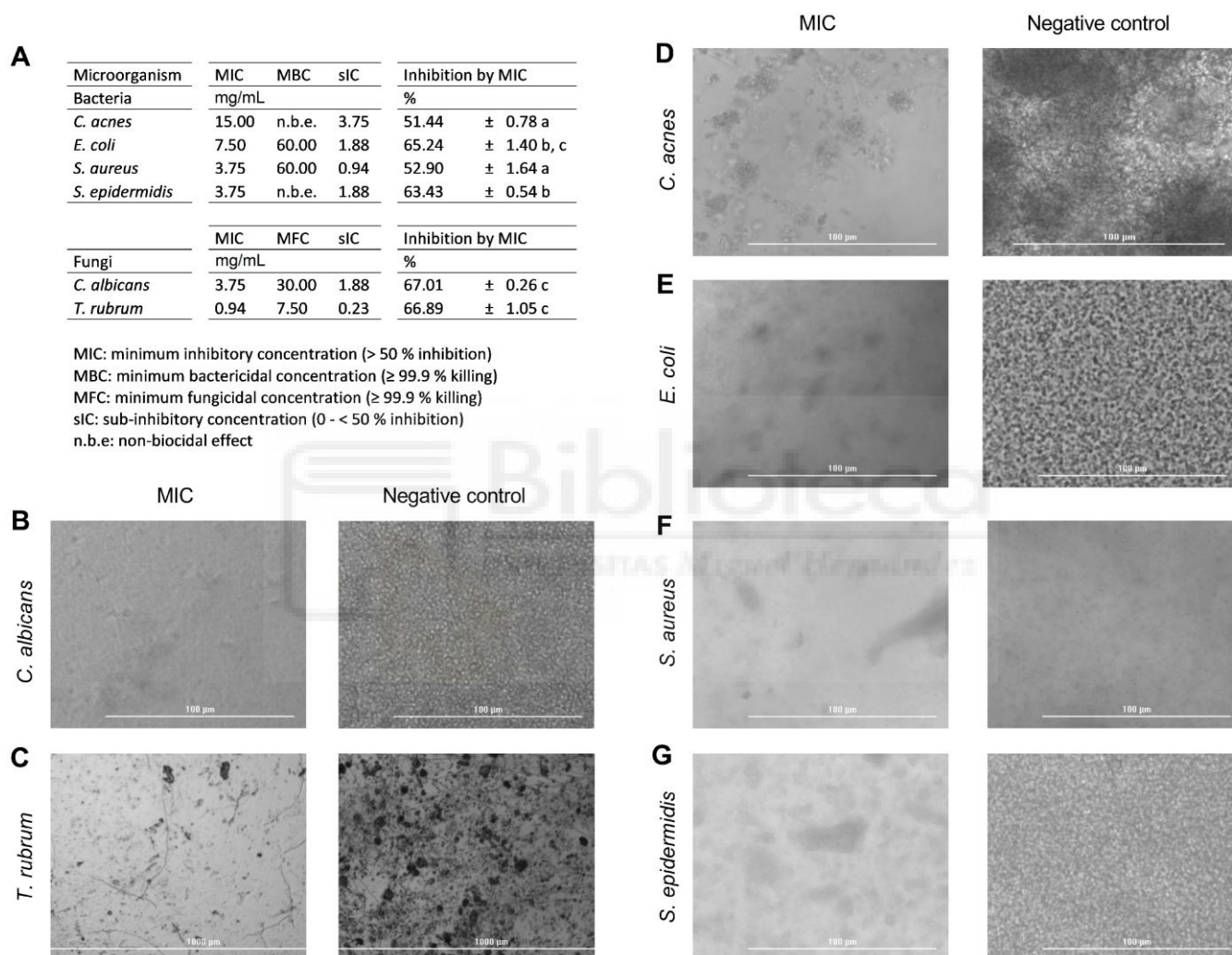


Figure 4. (A) Minimum inhibitory (MIC), biocidal (MBC), and sub-inhibitory (sIC) concentrations of persimmon extract rich in carotenoids (PEC) by microdilution assay. MIC values of PEC led to a significant inhibition of microbial strains in comparison with untreated controls (different letters showed significant differences between tested strains, $p < 0.05$, ANOVA and Tukey's post hoc test). Optical images of wells containing PEC MIC-treated live microorganisms (left) or untreated controls (right): (B) *Candida albicans*, (C) *Trichophyton rubrum*, (D) *Cutibacterium acnes*, (E) *Escherichia coli*, (F) *Staphylococcus aureus*, and (G) *Staphylococcus epidermidis*.

According to the used broth microdilution method to determine MICs, PEC produced higher % inhibition in fungi ($67.01 \pm 0.26\%$ for *C. albicans* and $66.89 \pm 1.05\%$ for *T. rubrum*) than bacteria, apart from *E. coli* strain, which showed no significant differences ($65.24 \pm 1.40\%$) ($p > 0.05$). As expected, the remaining bacteria presented >50% Inh. Images of the MIC effect of PEC on tested microbial populations are shown in Figure 4B–G.

PEC induced a significant reduction of microorganism populations, especially compared to untreated control containing DMSO, where a dense biomass is notable after

incubation period. PEC-treated wells showcased as less dense, with isolated biomasses, than the negative control.

3.5. Anti-Adhesive Effect of PEC on HaCaT Monolayer Cells

The effect of PEC on microbial adhesion to HaCaT monolayer cells was assessed. As seen in Figure 5, treatment with sIC (MIC/4) of PEC led to a significant decrease of *S. aureus* ($p < 0.001$) and *E. coli* ($p < 0.001$) adhesion to HaCaT keratinocytes after 5 h of co-incubation, in comparison with untreated controls, reaching percentages of adhered microorganisms equal to 13.4 ± 2.11 and 20.95 ± 3.43 , respectively (Figure 5C,D). A progressive adhesion reduction of these strains to HaCaT cells could be observed after a short period of co-incubation (just 2 h).

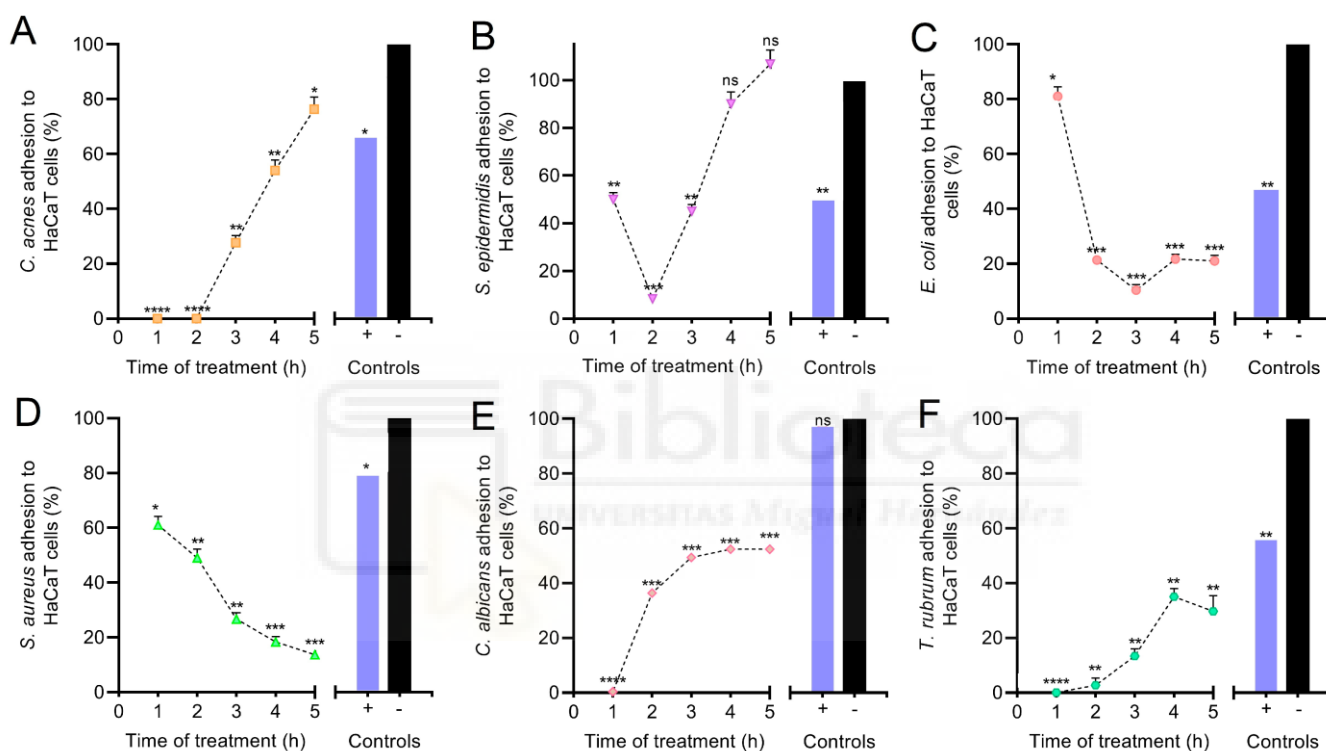


Figure 5. Percentage of microbial adhesion (mean $\pm$ SD) to persimmon extract rich in carotenoids (PEC)-treated HaCaT monolayer cells. PEC treatment at MIC/4 led to a significant decrease of microbial adhesion to HaCaT cells over time, as compared to the negative control (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns $p > 0.05$, ANOVA, and Dunnett's post hoc test). Microorganisms: (A) *Cutibacterium acnes*, (B) *Staphylococcus epidermidis*, (C) *Escherichia coli*, (D) *Staphylococcus aureus*, (E) *Candida albicans*, and (F) *Trichophyton rubrum*.

C. acnes ($p < 0.05$), *S. epidermidis* ($p > 0.05$), *C. albicans* ($p < 0.001$), and *T. rubrum* ($p < 0.01$) increased their adhesion capacity to HaCaT monolayer cells during co-incubation period, in comparison with untreated controls, reaching percentages of adhered microorganisms equal to 76.10 ± 7.86 , 106.67 ± 10.41 , 52.53 ± 1.87 , and 29.73 ± 9.36 , respectively (Figure 5A,B,E,F). In these cases, PEC treatment enhanced microbial adhesion to HaCaT cells after 2–3 h of co-incubation. Results showed PEC (used at sIC) negatively affected the adhesion mechanism of pathogens *E. coli* and *S. aureus* to HaCaT monolayer cells, while stimulated adhesion capacity of the human skin common residents *C. acnes* and *S. epidermidis*. PEC-induced stimulation of microbial adhesion was significantly lower for the dermatophyte fungus *T. rubrum* and the opportunistic pathogenic yeast *C. albicans*. In general, PEC manifested a significant anti-adhesive activity against all tested pathogens (Figure 5C–F), compared to positive control (penicillin and streptomycin solution).

3.6. HPLC-PDA-MS/MS Analysis of Permeated Samples

To evaluate the topical release of PEC in potential transdermal therapeutics, the accumulation dynamics of its carotenoids were studied in Franz diffusion cells. Results were compared to control sample of β -carotene (Figure 6). MS/MS analysis of samples in multiple reaction monitoring (MRM) mode displayed that from the carotenoids found in PEC, (cis)- α -cryptoxanthin, (cis)- β -cryptoxanthin, (cis)- α -carotene, (cis)- β -carotene, (All-trans)- α -carotene, and (All-trans)- β -carotene, exhibited higher flux than the remaining carotenoids, as they were present in the receptor medium (Table S3).

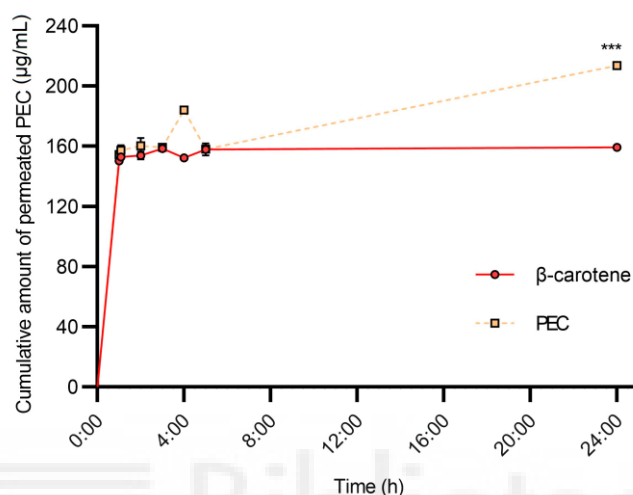


Figure 6. Cumulative amount ($\mu\text{g/mL}$) of permeated persimmon extract rich in carotenoids (PEC) through Franz diffusion cells synthetic skin membranes model. PEC carotenoids permeated significantly more than the control β -carotene after 24 h of exposure (***) $p < 0.001$, ANOVA, and t -test post hoc).

The cumulative amount of diffused PEC carotenoids, at a sampling time of 24 h, was $213.7 \pm 2.0 \mu\text{g/cm}^2$, which was 34% higher than that of β -carotene ($159.3 \mu\text{g/cm}^2$). The flux of PEC carotenoids was similar to β -carotene over the 0.5–5 h period. A constant release pattern was observed in β -carotene over the 5–24 h period, and it is consistent with previous permeation studies [42]. The carotenoid fluxes of PEC and β -carotene were 8.8 and $6.6 (\mu\text{g/cm}^2 \text{ h})$, respectively. PEC carotenoids showed a higher diffusion rate than β -carotene, which could be due to the diverse carotenoid composition of PEC.

4. Discussion

4.1. UV Radiation and ROS Production

European people are exposed to an average solar radiation of 10,000–20,000 J/m^2 per year [43]. The skin acts as an external barrier in the human body against solar radiation and is constantly exposed to UV radiation, causing severe problems, such as photoaging and skin carcinomas [8,44]. Currently, one of the greatest social interests is the use of natural compounds, both in food and dermatological or cosmetic products [45]. There are many studies that focus on the development of photoprotective agents for the skin, with natural compounds that provide high antioxidant activity against exposure to UV-B radiation and ROS, both exogenous and endogenous [29].

The photoprotective experiments demonstrated that PEC, at a concentration of $50 \mu\text{g/mL}$, exerts a regenerative effect on previously UV-B irradiated HaCaT cell monolayers. Increases in HaCaT cell viability could be due to a regulation of apoptotic markers [46], a regulatory effect on intracellular ROS production, and a reduction of DNA damage [29].

According to [47,48], UV radiation mediates its biological effects on biomembranes predominantly via the reaction of ROS on the cell membrane, leading to the deterioration of the membrane lipids, rearrangement of the phospholipid bilayer, and pore formation. Such

alterations may increase membrane permeability, allowing for rapid and massive entry of PEC that would block ROS production and activate a complete system for the repair of peroxidized cell membranes [49]. In contrast, extensive membrane permeabilization by UV radiation could be detrimental to cell viability. For both PEC pretreatment experiments, the carotenoids would be either outside or on cell surface, a small part would have reached the interior of the cells during the long pretreatment, causing little inhibition of oxidative stress and null cellular response. Everything mentioned above suggests that PEC could be an ideal natural ingredient for incorporation in dermatological products, such as after-sun lotion or cream.

Particularly, the effect of PEC on ROS generated by UV-B radiation was investigated in previously irradiated HaCaT cell monolayers. PEC induced a slight, but insignificant, reduction of ROS, at both the 0.1 and 0.5 $\mu\text{g/mL}$ concentrations. At high PEC concentrations (1–75 $\mu\text{g/mL}$), a decrease in ROS reduction was observed, which might be due to interference in the fluorescence measurement of the DCF-DA probe with the carotenoids. This is true because both the DCF-DA probe used for the evaluation of ROS compounds and carotenoids present in the PEC have their highest absorbance at 500 nm. It is important to note that it would have been very interesting to use another measurement probe for the ROS compounds that did not interfere with carotenoids [50].

4.2. Microbiology

Microbial community assembly, stability, and function are driven by host factors, as well as the interactions between these microorganisms. As in the gut, the skin microbiome can act competitively to exclude one another or synergistically for mutual benefits. Atopic antibiotic treatments could also disturb the equilibrium of the microbiome, leading to some serious skin infections [13]. Despite the availability of a variety of natural and synthetic antibiotics, the potential of carotenoids as novel antimicrobials has increased recently. Several reports have recorded the antimicrobial potential of carotenoids from seaweed [51] and fungal extracts [52–54], as well as from tomatoes [55].

In this study, PEC proved to be a promising antimicrobial agent with antibacterial and antifungal activity on tested microorganisms and major impact against fungal strains (*C. albicans* and *T. rubrum*) and gram-positive bacteria tested. The antimicrobial activity of PEC showed that there was no uniform response among microbial strains, in terms of groups, with some strains being more sensible than others. Interestingly, a selective antimicrobial activity was observed, due to the lack of biocidal effects against human skin, common residents *C. acnes* and *S. epidermidis*.

Moreover, during infections, it has been reported that carotenoids could inhibit the microbial lipopolysaccharides that affect the inflammatory response, reducing the levels of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 proteins [51]. Although the direct antimicrobial mechanism of PEC is not known, these results establish it as a potential skin antimicrobial agent, as well as a skin prebiotic, due to its selective impact against skin microbiome. Given *C. acnes* and *S. epidermidis* are common human skin-inhabitants, PEC could control the microbiome avoiding the pathogen proliferation, while allowing the growth of normal skin microorganisms.

The potential prebiotic activity was observed on anti-adhesion assay. The microbial attachment to host cells is one of the early strategies for the successful establishment of infections. This process can be mediated by several components, such as adhesins, pili, or fimbriae, as well as specific exopolysaccharides. PEC prevented microbial adhesion to HaCaT monolayers, selectively. *C. acnes* and *S. epidermidis* were able to attach to monolayers after 5 h of incubation; on the contrary, pathogens presented a decrease in its adhesion capacity, progressively. As *C. acnes* and *S. epidermidis* are frequent colonizers of skin and mucosal surfaces, sIC PEC showed a capacity to prevent future infections, while allowing common inhabitants to persist on monolayers. This showed the potential of PEC as a future ingredient for skin care product formulations; however, further studies should clarify the

exact structures and mechanisms affected by PEC in the microbial cell, leading to disrupted adhesion.

4.3. *In Vitro* Permeation of PEC Carotenoids

HPLC-PDA-MS/MS identification and quantification also revealed information on the availability of the carotenoids in PEC. From the 20 compounds identified (Table S3), β -cryptoxanthin and β -carotene, along with their isomeric variants, showed the highest permeation and, therefore, the cyclohexene ring was found to be a determinant in the overall permeability of carotenoids. From a dermatological point of view, it was found that the carotenoids present in PEC behaved according to Fick's first law on synthetic skin models. The PEC-DMSO and β -carotene-DMSO solutions showed diffusion coefficients (kd) of 2.40 and 0.26, as well as zero and first order kinetics, respectively.

Both the rapid stabilization of carotenoid accumulation and high release rates in the first hours of the carotenoids presented in PEC make these carotenoids suitable for transdermal delivery, since the protective administration mechanisms for these bioactive compounds are required [56]. The PEC carotenoid results are consistent with those obtained for β -carotene and support those obtained on the HaCaT cell line. The PEC carotenoids are able to penetrate and protect cells against ROS, while the un-permeated fraction would reduce UV-induced skin damage on the surface. Nevertheless, further *in vivo* and encapsulation assays are required to assess PEC carotenoids' actual potential.

5. Conclusions

The obtained results suggest that PEC has great potential to be used as a functional ingredient in after-sun lotions or creams. PEC carotenoids were internalized by the HaCaT keratinocyte cells and reduced the UV-induced ROS production in treated cells. In this way, PEC exerted a regenerative effect on the previously UV-irradiated HaCaT cells. As expected, the photoprotective and regenerating effects were UV dose-dependent. No cytotoxic effect was observed after the incubation of PEC with HaCaT keratinocytes at the concentration tested. In addition, PEC treatment stimulated the adhesion capacity of the human skin's common resident microorganisms to HaCaT cells, while displaying a significant anti-adhesive activity against all tested pathogens.

Overall, the data presented here can be considered a starting point for the initiation of the use of PEC as functional ingredient in formulations for photoprotection against solar radiation exposure and its damaging effects on human skin. However, further studies are needed to promote not only the use of PEC in after-sun lotions or creams but also in sunscreens and skin-care cosmetics. Future studies should address, among other issues, the determination of the *in vitro* sun protection factor (SPF) of PEC, the need for synthetic filters in the sunscreen under development, UV-induced DNA damage, and a better understanding of the observed photoprotective and regenerating effects.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics13111898/s1>, Table S1: gradient conditions used for carotenoid analysis, Table S2: MS parameter settings used for carotenoid analysis: LCMS8050TM (Shimadzu), Table S3: annotation and detection conditions for carotenoid analysis.

Author Contributions: Conceptualization, N.M., M.C.M.-M., M.V. and D.S.; data curation, S.G.-B., B.M.-C., L.d.l.C., J.S.-B. and D.S.; formal analysis, S.G.-B., B.M.-C., L.d.l.C. and J.S.-B.; funding acquisition, M.V. and D.S.; investigation, S.G.-B., B.M.-C., L.d.l.C. and J.S.-B.; methodology, S.G.-B., B.M.-C., L.d.l.C. and J.S.-B.; project administration, M.V. and D.S.; resources, N.M. and M.C.M.-M.; supervision, N.M. and M.C.M.-M.; validation, N.M., M.C.M.-M., M.V. and D.S.; visualization, N.M. and M.C.M.-M.; writing—original draft, S.G.-B., B.M.-C., L.d.l.C. and J.S.-B.; writing—review and editing, M.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, through the funded project 'Simbiosis industrial en el aprovechamiento integral del caqui (*Diospyros kaki*); Ejemplo de bioeconomía' (CTM2017-88978-R). Sara Gea-Botella thanks the Agencia Estatal

de Investigación, the funding for ‘Doctores en Empresas “Doctorados Industriales”’ (DI-16-08465), through the R+D+I project entitled ‘Evaluación in vitro e in vivo de un extracto procedente de subproductos de la industrialización del caqui’.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article and supplementary material.

Acknowledgments: The authors wish to thank Mitra Sol Technologies S.L. for the given technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

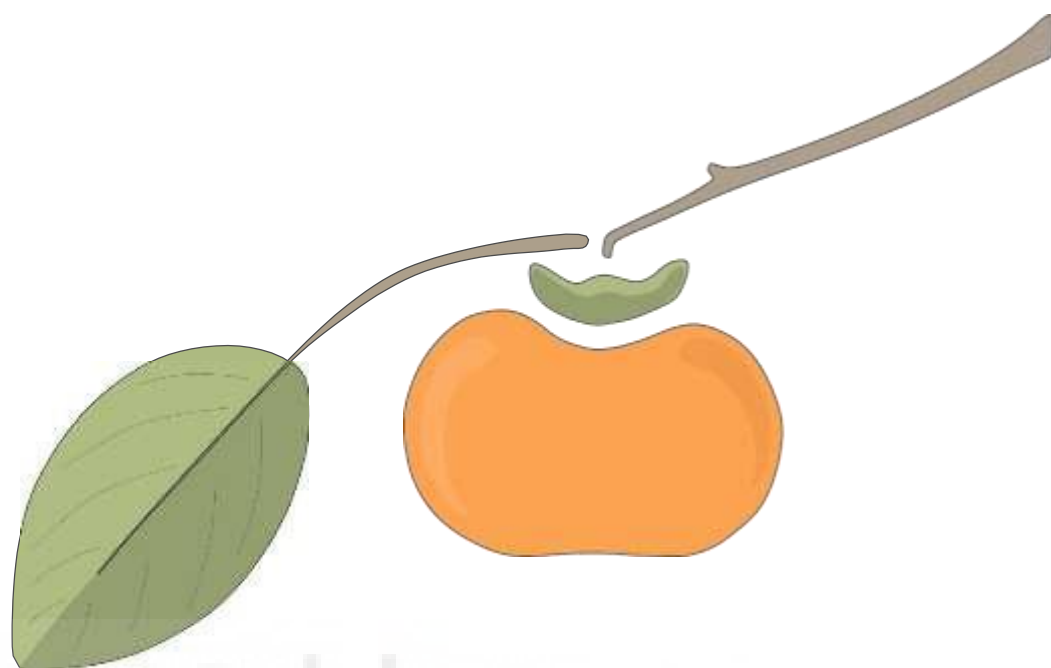
References

- Woodby, B.; Penta, K.; Pecorelli, A.; Lila, M.A.; Valacchi, G. Skin Health from the Inside Out. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2020**, *11*, 235–254. [CrossRef] [PubMed]
- Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M.; Francisco, H. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Arch. Lat. Nutr.* **2004**, *54*, 149–155.
- Zerres, S.; Stahl, W. Carotenoids in human skin. *Biochim. Biophys. Acta Bba–Mol. Cell Biol. Lipids* **2020**, *1865*, 158588. [CrossRef] [PubMed]
- Alam, S.; Pal, A.; Singh, D.; Ansari, K.M. Topical application of Nexrutine inhibits ultraviolet B-induced cutaneous inflammatory responses in SKH-1 hairless mouse. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2017**, *34*, 82–90. [CrossRef] [PubMed]
- Baccarin, T.; Mitjans, M.; Ramos, D.; Lemos-Senna, E.; Vinardell, M.P. Photoprotection by Punica granatum seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2015**, *153*, 127–136. [CrossRef] [PubMed]
- Hatakeyama, M.; Fukunaga, A.; Washio, K.; Taguchi, K.; Oda, Y.; Ogura, K.; Nishigori, C. Anti-Inflammatory Role of Langerhans Cells and Apoptotic Keratinocytes in Ultraviolet-B-Induced Cutaneous Inflammation. *J. Immunol.* **2017**, *199*, 2937–2947. [CrossRef]
- Nichols, J.A.; Katiyar, S.K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch. Derm. Res.* **2009**, *302*, 71–83. [CrossRef]
- Nishigori, C. Cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 208–214. [CrossRef]
- Center, S.S. UV Light. Available online: <http://solar-center.stanford.edu/about/uvlight.html> (accessed on 3 May 2021).
- Psotova, J.; Svobodova, A.; Kolarova, H.; Walterova, D. Photoprotective properties of Prunella vulgaris and rosmarinic acid on human keratinocytes. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2006**, *84*, 167–174. [CrossRef] [PubMed]
- Wu, N.-L.; Fang, J.-Y.; Chen, M.; Wu, C.-J.; Huang, C.-C.; Hung, C.-F. Chrysin Protects Epidermal Keratinocytes from UVA- and UVB-Induced Damage. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 8391–8400. [CrossRef]
- Balić, A.; Vlašić, D.; Mokos, M.; Marinović, B. The Role of the Skin Barrier in Periorificial Dermatitis. *Acta Derm. Croat.* **2019**, *27*, 169–179.
- Byrd, A.L.; Belkaid, Y.; Segre, J.A. The human skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 143–155. [CrossRef] [PubMed]
- Golmohammadzadeh, S.; Imani, F.; Hosseinzadeh, H.; Jaafari, M.R. Preparation, Characterization and Evaluation of Sun Protective and Moisturizing Effects of Nanoliposomes Containing Safranal. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2011**, *14*, 521–533. [PubMed]
- Oh, J.; Kim, J.H.; Park, J.G.; Yi, Y.-S.; Park, K.W.; Rho, H.S.; Lee, M.-S.; Yoo, J.W.; Kang, S.-H.; Hong, Y.D.; et al. Radical Scavenging Activity-Based and AP-1-Targeted Anti-Inflammatory Effects of Lutein in Macrophage-Like and Skin Keratinocytic Cells. *Mediat. Inflamm.* **2013**, *2013*, 787042. [CrossRef]
- Svobodová, A.; Psotová, J.; Walterová, D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed. Pap.* **2003**, *147*, 137–145. [CrossRef]
- Reis-Mansur, M.C.P.P.; Cardoso-Rurr, J.S.; Silva, J.V.M.A.; De Souza, G.R.; Cardoso, V.D.S.; Mansoldo, F.; Pinheiro, Y.; Schultz, J.; Balottin, L.B.L.; Da Silva, A.J.R.; et al. Carotenoids from UV-resistant Antarctic Microbacterium sp. LEMMJ01. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9554. [CrossRef] [PubMed]
- Abney, K.R.; Kopsell, D.; Sams, C.E.; Zivanovic, S.; Kopsell, D.E. UV-B Radiation Impacts Shoot Tissue Pigment Composition in *Allium fistulosum* L. Cultigens. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 513867. [CrossRef]
- Becatti, E.; Petroni, K.; Giuntini, D.; Castagna, A.; Calvenzani, V.; Serra, G.; Mensuali-Sodi, A.; Tonelli, C.; Ranieri, A. Solar UV B Radiation Influences Carotenoid Accumulation of Tomato Fruit through Both Ethylene-Dependent and -Independent Mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10979–10989. [CrossRef]
- Biswas, D.K.; Ma, B.-L.; Xu, H.; Li, Y.; Jiang, G. Lutein-mediated photoprotection of photosynthetic machinery in *Arabidopsis thaliana* exposed to chronic low ultraviolet-B radiation. *J. Plant Physiol.* **2020**, *248*, 153160. [CrossRef]
- Assumpção, C.F.; Assis, R.Q.; Poletto, V.S.H.; Castagna, A.; Ranieri, A.; Neugart, S.; Flôres, S.H.; Rios, A.O. Application of supplemental UV-B radiation in pre-harvest to enhance health-promoting compounds accumulation in green and red lettuce. *J. Food Process. Preserv.* **2019**, *43*, e14213. [CrossRef]

22. Ascenso, A.; Pedrosa, T.; Pinho, S.; Pinho, F.; De Oliveira, J.M.P.F.; Marques, H.; Oliveira, H.; Simões, S.; Santos, C. The Effect of Lycopene Preexposure on UV-B-Irradiated Human Keratinocytes. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 8214631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Santocono, M.; Zurria, M.; Berrettini, M.; Fedeli, D.; Falcioni, G. Influence of astaxanthin, zeaxanthin and lutein on DNA damage and repair in UVA-irradiated cells. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2006**, *85*, 205–215. [[CrossRef](#)]
24. Tominaga, K.; Hongo, N.; Fujishita, M.; Takahashi, Y.; Adachi, Y. Protective effects of astaxanthin on skin deterioration. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2017**, *61*, 33–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Grice, J.E.; Zhang, Q.; Roberts, M.S. Chemical structure—Skin transport relationships. In *Toxicology of the Skin*, 1st ed.; Monteiro-Riviere, N.A., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2010; pp. 55–68.
26. Ghodrati-zadeh, S.; Kanbak, G.; Beyramzadeh, M.; Dikmen, Z.G.; Memarzadeh, S.; Habibian, R. Effect of carotenoid β -cryptoxanthin on cellular and humoral immune response in rabbit. *Veter-Res. Commun.* **2013**, *38*, 59–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Gea-Botella, S.; Agulló, L.; Martí, N.; Martínez-Madrid, M.; Lizama, V.; Martín-Bermudo, F.; Berná, G.; Saura, D.; Valero, M. Carotenoids from persimmon juice processing. *Food Res. Int.* **2021**, *141*, 109882. [[CrossRef](#)]
28. Salazar-Bermeo, J.; Moreno-Chamba, B.; Martínez-Madrid, M.C.; Saura, D.; Valero, M.; Martí, N. Potential of Persimmon Dietary Fiber Obtained from Byproducts as Antioxidant, Prebiotic and Modulating Agent of the Intestinal Epithelial Barrier Function. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1668. [[CrossRef](#)]
29. Rodríguez-Luna, A.; Ávila-Román, J.; Oliveira, H.; Motilva, V.; Talero, E. Fucoxanthin and Rosmarinic Acid Combination Has Anti-Inflammatory Effects through Regulation of NLRP3 Inflammasome in UVB-Exposed HaCaT Keratinocytes. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 451. [[CrossRef](#)]
30. Pacheco, M.T.; Silva, A.C.G.; Nascimento, T.L.; A Diniz, D.G.; Valadares, M.C.; Lima, E.M. Protective effect of sucupira oil nanoemulsion against oxidative stress in UVA-irradiated HaCaT cells. *J. Pharm. Pharm.* **2019**, *71*, 1532–1543. [[CrossRef](#)]
31. Ravi, H.; Kurrey, N.; Manabe, Y.; Sugawara, T.; Baskaran, V. Polymeric chitosan-glycolipid nanocarriers for an effective delivery of marine carotenoid fucoxanthin for induction of apoptosis in human colon cancer cells (Caco-2 cells). *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *91*, 785–795. [[CrossRef](#)]
32. Jiménez-Zamora, A.; Pastoriza, S.; Rufián-Henares, J.Á. Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *LWT Food Sci. Technol.* **2015**, *61*, 12–18. [[CrossRef](#)]
33. Sardi, J.D.C.O.; Polaquini, C.R.; Freires, I.A.; Galvao, L.C.D.C.; Lazarini, J.G.; Torrezan, G.S.; Regasini, L.O.; Rosalen, P.L. Antibacterial activity of diacetylcurcumin against *Staphylococcus aureus* results in decreased biofilm and cellular adhesion. *J. Med. Microbiol.* **2017**, *66*, 816–824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ashtikar, M.; Matthäus, C.; Schmitt, M.; Krafft, C.; Fahr, A.; Popp, J. Non-invasive depth profile imaging of the stratum corneum using confocal Raman microscopy: First insights into the method. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *50*, 601–608. [[CrossRef](#)]
35. Ng, S.-F.; Rouse, J.J.; Sanderson, F.D.; Meidan, V.; Eccleston, G.M. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. *Aaps Pharmscitech* **2010**, *11*, 1432–1441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kopeck, R.; Schweiggert, R.M.; Riedl, K.; Carle, R.; Schwartz, S.J. Comparison of high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/photo-diode array detection for the quantitation of carotenoids, retinyl esters, α -tocopherol and phyloquinone in chylomicron-rich fr. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27*, 1393–1402. [[CrossRef](#)]
37. Mercadante, A.Z.; Rodrigues, D.B.; Petry, F.C.; Mariutti, L. Carotenoid esters in foods—A review and practical directions on analysis and occurrence. *Food Res. Int.* **2017**, *99*, 830–850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Rivera, S.M.; Christou, P.; I Garayoa, R.C. Identification of carotenoids using mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2014**, *33*, 353–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Vélez, S.M.R. Guide for Carotenoid Identification in Biological Samples. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1473–1484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Sawada, Y.; Sato, M.; Okamoto, M.; Masuda, J.; Yamaki, S.; Tamari, M.; Tanokashira, Y.; Kishimoto, S.; Ohmiya, A.; Abe, T.; et al. Metabolome-based discrimination of chrysanthemum cultivars for the efficient generation of flower color variations in mutation breeding. *Metabolomics* **2019**, *15*, 118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Kovacs, D.; Raffa, S.; Flori, E.; Aspite, N.; Briganti, S.; Cardinali, G.; Torrisi, M.R.; Picardo, M. Keratinocyte growth factor down-regulates intracellular ROS production induced by UVB. *J. Derm. Sci.* **2009**, *54*, 106–113. [[CrossRef](#)]
42. Rohmah, M.; Raharjo, S.; Hidayat, C.; Martien, R. Application of Response Surface Methodology for the Optimization of β -Carotene-Loaded Nanostructured Lipid Carrier from Mixtures of Palm Stearin and Palm Olein. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2019**, *97*, 213–223. [[CrossRef](#)]
43. Godar, D.E. UV Doses Worldwide. *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 736–749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Sajo, M.E.J.; Kim, C.-S.; Kim, S.-K.; Shim, K.Y.; Kang, T.-Y.; Lee, K.-J. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Shungite against Ultraviolet B Irradiation-Induced Skin Damage in Hairless Mice. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 7340143. [[CrossRef](#)]
45. Chen, L.; Hu, J.Y.; Wang, S.Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. *J. Am. Acad. Derm.* **2012**, *67*, 1013–1024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Vostálová, J.; Zdaršilová, A.; Svobodová, A. Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Arch. Derm. Res.* **2010**, *302*, 171–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Smith, H.L.; Howland, M.C.; Szmodis, A.W.; Li, Q.; Daemen, L.L.; Parikh, A.; Majewski, J. Early Stages of Oxidative Stress-Induced Membrane Permeabilization: A Neutron Reflectometry Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3631–3638. [\[CrossRef\]](#)
48. Yeo, S.-K.; Liong, M.-T. Effects and applications of sub-lethal ultrasound, electroporation and UV radiations in bioprocessing. *Ann. Microbiol.* **2013**, *63*, 813–824. [\[CrossRef\]](#)
49. Fisher, A.B. Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, *617*, 68–83. [\[CrossRef\]](#)
50. Lohan, S.B.; Vitt, K.; Scholz, P.; Keck, C.; Meinke, M.C. ROS production and glutathione response in keratinocytes after application of β -carotene and VIS/NIR irradiation. *Chem.-Biol. Interact.* **2018**, *280*, 1–7. [\[CrossRef\]](#)
51. Karpiński, T.M.; Adamczak, A. Fucoxanthin—An Antibacterial Carotenoid. *Antioxidants* **2019**, *8*, 239. [\[CrossRef\]](#)
52. Keceli, T.M.; Erginkaya, Z.; Turkkan, E.; Kaya, Ü. Antioxidant and Antibacterial Effects of Carotenoids Extracted from *Rhodotorula glutinis* Strains. *Asian J. Chem.* **2013**, *25*, 42–46. [\[CrossRef\]](#)
53. Manimala, M.R.A.; Murugesan, R. In vitro antioxidant and antimicrobial activity of carotenoid pigment extracted from *Sporobolomyces* sp. isolated from natural source. *J. Appl. Nat. Sci.* **2014**, *6*, 649–653. [\[CrossRef\]](#)
54. Vargas-Sinisterra, A.F.; Ramírez-Castrillón, M. Yeast carotenoids: Production and activity as antimicrobial biomolecule. *Arch. Microbiol.* **2021**, *203*, 873–888. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Hraishawi, R.M.; Abdul-Razak, A.S.; Al-Hayder, M.N.; Al-wafi, H. Investigation the antimicrobial and antioxidant activity of lycopene extraction from *Solanum Lycopersicum*. *Eur. Asian J. Biosci.* **2020**, *14*, 5305–5310.
56. Maretti, E.; Leo, E.; Rustichelli, C.; Truzzi, E.; Siligardi, C.; Iannuccelli, V. In vivo β -carotene skin permeation modulated by Nanostructured Lipid Carriers. *Int. J. Pharm.* **2021**, *597*, 120322. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)





Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández