

Actividad antioxidante de un aceite vegetal enriquecido con la microalga cultivada *Dunaliella salina* (Chlorophyceae)

Antioxidant activity of oil vegetable enriched with the cultured microalgae *Dunaliella salina* (Chlorophyceae)

Miguel Guevara¹, Edgar Zapata-Vívenes², María León³, Mercedes Acosta^{1,3}

¹Instituto Superior de Formación Docente "Salomé Ureña". ISFODOSU-FEM. Santo Domingo, República Dominicana. ²Escuela de Acuicultura y Pesquería, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Bahía de Caráquez, Manabí, Ecuador. ³Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Venezuela.

Correspondencia: Miguel Guevara  E-mail: miguevara2003@gmail.com

Artículo original | Original article

Palabras clave

Aceite
Antioxidante
 β -caroteno
Microalga

RESUMEN | *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) es una microalga que contiene un porcentaje considerable de pigmentos, en especial acumula niveles significativos de β -carotenos; compuestos que poseen alto poder antioxidante. En esta investigación, se evaluó la capacidad antioxidante de un aceite vegetal de soya enriquecido con *D. salina*. La biomasa de una cepa hipercarotenogénica de *D. salina* (previamente seleccionada) fue mezclada y macerada con el aceite vegetal comestible. Seguidamente, el aceite fue filtrado y almacenado a $23\pm 1^\circ\text{C}$ durante 28 días. El contenido de β -caroteno, así como la actividad antioxidante, del aceite enriquecido con la microalga fueron cuantificados durante distintos períodos de almacenamientos (0, 7, 14, 21 y 28 días), en contraste con un aceite testigo y una mezcla con un antioxidante referencial. Los resultados evidenciaron que el aceite comestible tratado con biomasa de *D. salina* mantuvo contenidos de β -caroteno de $2,1 \mu\text{g/L}$ y una actividad antioxidante de 45,6 % con respecto al aceite testigo. Esta investigación demostró el potencial antioxidante del aceite vegetal comestible enriquecido con β -caroteno obtenido de *D. salina*, sugiriendo su uso como alternativa para mejorar la vida útil de aceites vegetales.

Keywords

Oil
Antioxidant
 β -carotene
Microalgae

ABSTRACT | *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) is a microalgae that have a considerable percentage of pigments, especially it accumulates significant levels of β -carotenes; compounds that possesses high antioxidant control. In this investigation, the antioxidant capacity of a vegetal oil of soya enriched with *D. saline* was evaluate. The biomass of a hypercarotenogenic of *D. salina* (selected previously); it was mixed and macerated with the eatable vegetable oil. Subsequently, the oil was filtered and stored to $23\pm 1^\circ\text{C}$ during 28 days. The content of β -carotene, as well as the antioxidant activity, of the oil enriched with the microalgae were quantified during diverse storage periods (0, 7, 14, 21 y 28 days), in contrast with a control oil and mixture with a referential antioxidant. The results evidence that the eatable oil treaty with biomass of *D. salina* maintain contents of β -carotene of $2,1 \mu\text{g/L}$ and an antioxidant activity of 45,6% in contrast to the control oil. This investigation demonstrated the antioxidant potential of eatable vegetable oil enriched with *D. salina*, suggesting the use as alternative to improve the useful life of vegetal oils.

INTRODUCCIÓN

Dunaliella salina (Chlorophyceae) es una microalga que carece de una pared celular, lo que le permite efectuar rápidos cambios de volumen en respuesta a cambios externos de la presión osmótica (Ben-Amotz, 1987). Esta especie presenta formas variables y su tamaño oscila entre 12-16 μm de largo y de 25-28 μm de ancho (Ben-Amotz y Avron, 1983; Borowitzka y Borowitzka, 1988). *D. salina* contiene entre 50 a 60% de proteínas y un porcentaje considerable de pigmentos como clorofila, carotenoides y xantofilas, los cuales por su actividad pro-vitamínica tienen aplicación tanto en la industria alimentaria como farmacéutica (Hernández *et al.*, 1999).

Numerosos estudios han demostrado que *D. salina* acumula altas concentraciones de β -caroteno como respuesta a la limitación de nutrientes y exposición de luz UV (Ben-Amotz *et al.*, 1982; Ben-Amotz y Avron, 1983), estrés salino (Borowitzka *et al.*, 1990) y alta irradiancia (Ben-Amotz y Avron, 1989; Xu *et al.*, 2018). La capacidad carotenogénica de diferentes cepas del género *Dunaliella*, aisladas en las costas venezolanas, ha sido demostrada por Guevara *et al.* (2005) y Romero *et al.* (2008). La acumulación de β -carotenos en esta microalga ha sido sugerido como un posible mecanismo de protección celular (Sánchez *et al.*, 2006). Adicionalmente, Yépez y Morales (1998) estudiaron el comportamiento de *D. viridis* en función de la concentración de nutrientes a distintas salinidades, y Vásquez *et al.* (2007) evaluaron el crecimiento y los cambios en la composición bioquímica en diferentes cepas de *Dunaliella*.

Los aceites vegetales comestibles están constituidos por compuestos lipídicos obtenidos a partir de semillas u otras partes de las plantas, los cuales son destinados al consumo humano y/o animal (Zoué *et al.*, 2012). La incorporación de sustancias antioxidantes en tales aceites presenta un valor agregado, lo cual permite retardar algunas reacciones de autoxidación de sus componentes (ácidos: oleico, palmitoleico, linoleico y linolénico), evitando la rancidez del producto. Usualmente, en los aceites comestibles se emplean sustancias sintéticas de alto poder antioxidante como el terbutil hidroquinona (TBHQ) y terbutil hidroxianisol (BHA); sin embargo, se sospecha que pueden ser peligrosos para la salud (Ree *et al.*, 2001).

Los carotenoides han sido utilizados principalmente en la industria de los alimentos como colorantes, además que incorporan aromas, evitan la degradación de los alimentos (Marasco y Schmidt, 2003) e inhibición de daños oxidativos (Maldonado *et al.*, 2007). Se conoce que existen alternativas de uso de carotenoides aislados de algunas microalgas (por ejemplo *D. viridis* y *Haematococcus* sp.) en aceites vegetales (Moulton y Burford, 1990; Kang y Sim, 2008). De acuerdo a esta información, en este trabajo se evaluó la capacidad antioxidante, a distintos períodos de almacenamientos, de un aceite vegetal comestible enriquecido con una cepa hipercarotogénica cultivada de *D. salina*.

METODOLOGÍA

Organismos y condiciones de cultivo

D. salina (cepa Perú) fue cultivada durante 14 días a $23\pm 1^\circ\text{C}$ en agua de mar filtrada (200 UPS; filtros Whatman GF/C), esterilizada en autoclave ($120^\circ\text{C}/15\text{ min}/15\text{ psi}$) y enriquecida con medio f/2 (Guillard, 1975) con una concentración de nitrato 0,5 mM. Los cultivos (por triplicado) recibieron aireación constante a $200\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y fueron sometidos a una irradiancia de 15 000 lux con un fotoperíodo de 12:12 (Romero *et al.*, 2008). Esta cepa fue seleccionada a partir de un ensayo experimental previo donde se contrastaron siete diferentes cepas: cepa Coche (BGAUDO-21); cepa Coquimbo (BGAUDO-13); cepa Conc 007 (BGAUDO-48); cepa Perú (BGAUDO-62); cepa BGAUDO 19/30; cepa UTEX 2538 y cepa UTEX LB 1644. Todas estas cepas se encuentran depositadas en el Banco de Germoplasma de algas de la Universidad de Oriente del Instituto Oceanográfico de Venezuela. La cepa Perú, con una $K=0,53\text{ Div día}^{-1}$, $TD=1,88$ días y densidad máxima de $0,76 \times 10^6\text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$, fue seleccionada por presentar los mayores niveles de carotenoides totales ($8,93\pm 0,48\ \mu\text{g L}^{-1}$) con respecto a las cepas evaluadas.

Preparación del aceite

Muestras de 100 mL (por triplicado) de los cultivos de *D. salina* (cepa Perú) se filtraron al vacío en equipo Millipore, usando filtros de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro y $1,2\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro. La biomasa de microalgas retenida fue triturada junto con 50 mL de aceite vegetal comestible (aceite de soya) durante 15 minutos. Seguidamente, este extracto fue filtrado y almacenado en frascos ámbar a $23\pm 1^\circ\text{C}$ durante 28 días. El contenido de β -caroteno y actividad antioxidante presente en el aceite vegetal mezclado con *D. salina* fueron evaluados a intervalos de 7 días.

Contenido de β caroteno

El aceite vegetal con o sin *D. salina* fue mezclado, de manera separada, con 25 mL de n-hexano (100%) durante 5 min. Posteriormente, se midió la absorbancia a $\lambda=446$ nm en un espectrofotómetro Jenway, modelo 6104. El contenido de β -caroteno se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\beta - \text{caroteno } (\mu\text{g/L de extracto}) = \frac{[(V \times 383 \times (A_{\text{m}} - A_{\text{b}}))]}{100 \times P_{\text{m}}}$$

donde: V es el volumen de hexano (en mL); 383 es el coeficiente de extinción molar del β -caroteno; A_{m} es la absorbancia de la muestra; A_{b} es la absorbancia del blanco y P_{m} es la masa (en mg) de la muestra (Dauqan *et al.* 2011).

Actividad antioxidante

Para evaluar la actividad antioxidante del aceite vegetal fue empleado el método de la oxidación linoleico- β -caroteno (Miller, 1971). Este método se basa en la capacidad de diversos extractos de disminuir la decoloración oxidativa del β -caroteno en una emulsión ácida de β -caroteno/ácido linoleico. El ácido linoleico se oxida fácilmente en presencia de agua oxigenada y, los radicales generados atacan al β -caroteno, provocando su oxidación con la correspondiente pérdida de absorbancia a $\lambda=470$ nm.

Un mililitro de una solución de β -caroteno en cloroformo (100 m/v) fue colocado en un matraz de 100 mL de capacidad; seguidamente, se evaporó el cloroformo con una corriente de nitrógeno y se añadió 20 mL de una solución madre antioxidante (constituida por 20 mg de ácido linoleico, 200 μ L de Tween 80, y 50 mL de agua desionizada saturada con oxígeno) y 800 μ L del aceite vegetal a evaluar: (1) aceite solo (testigo), (2) aceite enriquecido con carotenoides de *D. salina* y (3) aceite con butilato de hidroxitolueno (como antioxidante referencial). Como blanco se usó la solución madre antioxidante. Se le midió la absorbancia a $\lambda=470$ nm previa agitación como tiempo cero contra la solución blanco. Seguidamente, se incubó a 50°C por 2 horas, haciendo lecturas de las absorbancias cada 15 minutos. La actividad antioxidante fue calculada como el porcentaje de inhibición, mediante la cinética de disminución de las absorbancias, mediante la siguiente ecuación: %AA = $(\frac{R_{\text{blanco}} - R_{\text{muestra}}}{R_{\text{blanco}}}) \times 100$; donde: R_{blanco} y R_{muestra} son las tasas de blanqueo del β -caroteno en el blanco y en las muestras, es decir la pendiente (m).

Análisis estadísticos

Los datos del contenido de β -caroteno y la actividad antioxidante en el aceite vegetal enriquecido con carotenoides de la cepa de *D. salina* seleccionada se analizaron a través de un análisis de varianza dos factores (tiempo de almacenamiento y aceite tratado) (Sokal y Rohlf, 2012).

RESULTADOS

β -caroteno

El aceite vegetal (testigo) utilizado como solvente de extracción presentó promedios iniciales de 2,0 mg/L de β -caroteno. La adición de *D. salina* aumentó el contenido de este pigmento a 4,46 mg/L, evidenciando la potencialidad del aceite como extractante de β -caroteno desde la microalga. El contenido de β -caroteno mostró diferencias significativas ($F_s=231,7$; $p < 0,05$) entre los diferentes tipos de aceites (aceite vegetal solo y del aceite vegetal enriquecido), incluso en los tiempos de almacenamiento ($F_s=25,85$; $p < 0,05$). Se observó una ligera tendencia a la disminución en el contenido de β -caroteno en el trascurso del almacenamiento para ambos tratamientos (Figura 1).

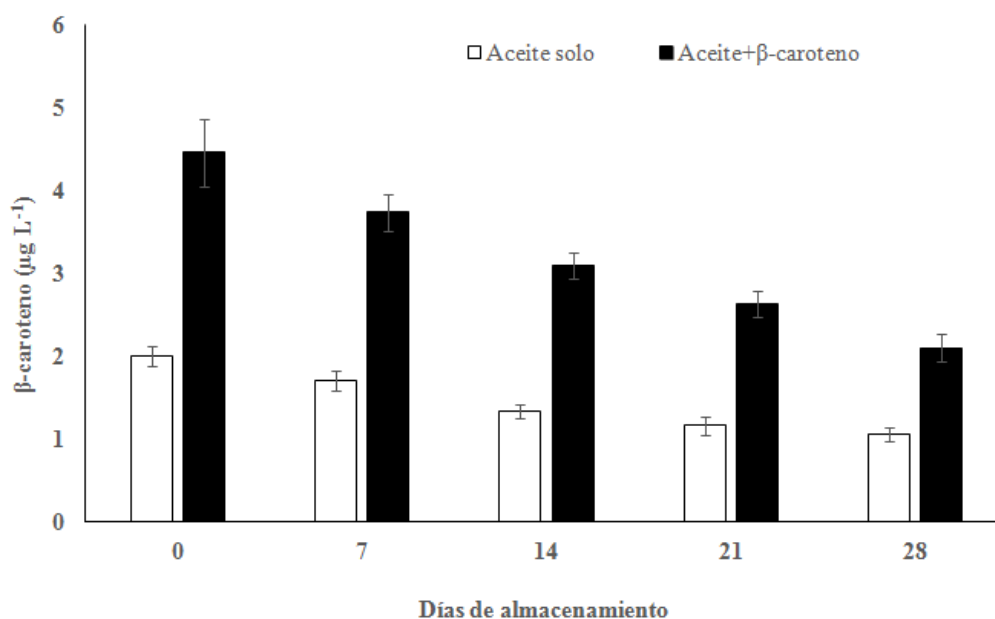


Figura 1. Contenido de β-caroteno en el aceite vegetal comestible y en el aceite enriquecido con *Dunaliella salina* durante los diferentes días de almacenamiento.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante entre los diferentes tipos aceites analizados y los días de almacenamiento presentó diferencias significativas ($F_s = 546,91$; $p < 0,05$) (Fig. 2). Se observó que, durante los 28 días de almacenamiento, el aceite comestible enriquecido con *D. salina* exhibió un mayor protección antioxidante con respecto al aceite testigo; aunque no supera la actividad antioxidante mostrada por el aceite comestible tratado con BTH (antioxidante referencial), observándose una reducción en su actividad antioxidante a partir del día 14. Hasta el día 28, el aceite enriquecido con β-caroteno mantuvo una actividad antioxidante del 45% con respecto al aceite testigo.

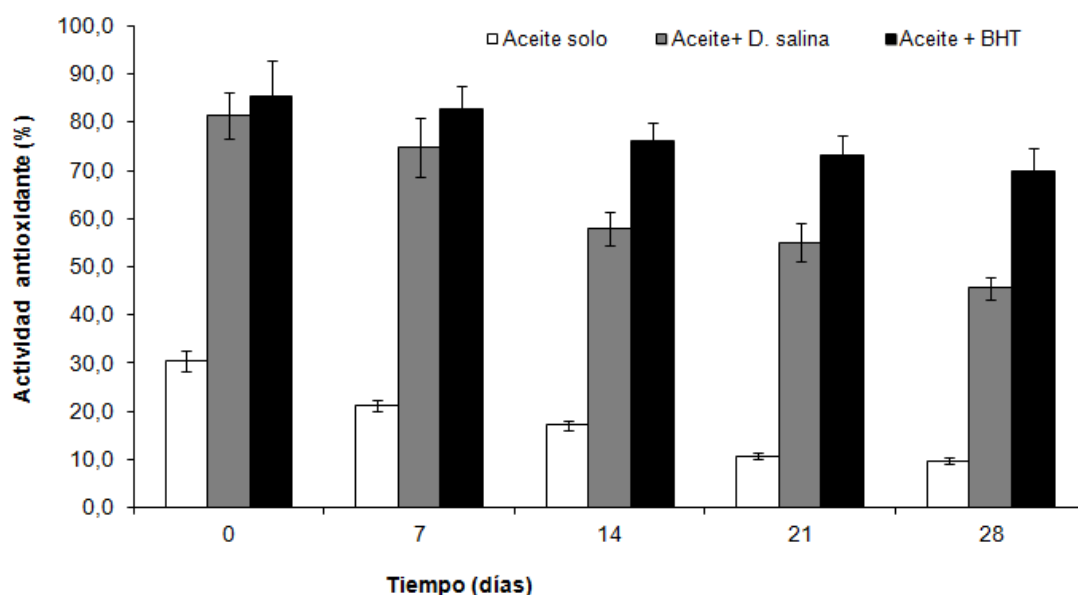


Figura 2. Actividad antioxidante de los diferentes tipos de aceites (solo, aceite enriquecido con *D. salina* y aceite con butilato de hidroxitolueno (BHT) durante los diferentes días de almacenamiento.

DISCUSIÓN

El uso de aceite vegetal comestible como solvente de extracción de β -caroteno de *D. salina* resultó ser efectivo, dado que este pigmento constituyó el 50% de los carotenoides totales. Resultados similares han sido referidos por Moulton y Burford (1990), quienes al tratar la biomasa de *D. viridis* con aceite vegetal lograron extraer hasta un 70% de β -caroteno. De igual forma, Kang y Sim (2008) indicaron que el uso del aceite vegetal como solvente es mejor para extraer carotenoides, obteniendo niveles entre 87-94% de astaxantina a partir de *Haematococcus*, utilizando diferentes tipos de aceites vegetales (oliva, soya, maíz y semillas de uva).

Investigaciones más recientes han puesto de manifiesto que los carotenoides de las microalgas pueden enriquecer los aceites, permitiendo mejorar su calidad nutricional. Adicionalmente, fue observado un incremento en la coloración del aceite vegetal, el cual se tornó de amarillo pálido hasta naranja suave, lo cual se debió a la presencia de los carotenoides de *D. salina*. Similarmente, Limón *et al.* (2014) encontraron que la inclusión de extractos de la microalga *Scenedesmus almeriensis* es una buena estrategia para mejorar la calidad del aceite oliva al incrementar su contenido de carotenoides e intensificar su color.

La mayor estabilidad y actividad antioxidante del aceite vegetal enriquecido con *D. salina*, durante su periodo de almacenamiento, pudo deberse mayoritariamente a la incorporación del β -caroteno. Al respecto, Stahl y Sies (1995), Aparicio *et al.* (1999) y Limón *et al.* (2014) indicaron que los carotenoides funcionan como compuestos antioxidantes, siendo los responsables de la estabilidad en el aceite de oliva. De igual forma, Rao *et al.* (2007) demostraron un aumento de la actividad antioxidante de aceite vegetal enriquecido con astaxantina extraído de *Haematococcus pluvialis*.

El uso de este aceite enriquecido con β -caroteno de *D. salina* podría ser utilizado como ingrediente en dietas para organismos cultivados, dado que se ha demostrado que muchos animales acuáticos depositan los carotenoides, obtenidos principalmente de foto-autótrofos (microalgas), en sus gónadas, caparazones, músculos e integumentos (De Carvalho y Caramujo, 2017), siendo éstos responsables del incremento de la supervivencia de sus larvas (Tsushima *et al.*, 1997).

Con esta investigación se corrobora que el enriquecimiento de los aceites vegetales con microalgas hipercarotenogénicas de *D. salina* aumenta su estabilidad durante el almacenamiento, proponiéndose como una estrategia para asegurar el consumo de estos compuestos. Además, los carotenoides, específicamente β -caroteno de *D. salina* se absorbe mucho más rápido por el organismo que muchas frutas, vegetales y suplementos (Granado *et al.*, 2009). Hasta la fecha existen escasos reportes sobre la comercialización de aceites vegetales enriquecidos con carotenoides de microalgas, por lo que la optimización de este tipo de productos sería de mucha importancia para el tratamiento de enfermedades causadas por deficiencias de antioxidantes.

CONCLUSIONES

El aceite vegetal enriquecido con *D. salina* mantuvo su actividad antioxidante casi en 45% durante los 28 días de almacenamiento. El uso de extractos obtenidos de *D. salina*, ricos en β -carotenos, puede ser una excelente alternativa para mejorar la vida útil de los aceites vegetales comestibles.

CONFLICTO DE INTERESES

No se declara conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Aparicio R., Roda L., Albi M., Gutiérrez F. (1999). Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4150-4155.

- Ben-Amotz A., Katz A., Avron M. (1982). Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β -carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 25: 175-178.
- Ben-Amotz A., Avron M. (1983). On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant algae *Dunaliella bardawil*. *Journal of Plant Physiology*, 72: 593-597.
- Ben-Amotz A. (1987). Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* Ben-Amotz and Avron (Volvocales, Chlorophyta). *Journal of Plant Physiology*, 131: 479-487.
- Ben-Amotz A., Avron M. (1989). The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. En: *Algal and Cyanobacterial biotechnology*. Creswell, R.; Rees, T. y Shah, N. (eds). Logman scientific and technical press, Londres. Págs. 90-113.
- Borowitzka M., Borowitzka L. (1988). *Dunaliella*. En: *Microalgal biotechnology*. Borowitzka, M., Borowitzka, L. (eds). Cambridge University Press, Cambridge. Págs. 27-58.
- Borowitzka M., Borowitzka L., Kessly D. (1990) Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*, 2: 111-119.
- Dauqan E., Abdullah H., Abdullah A., Muhamad H., Gapor A. (2011). Vitamine E and β -carotene composition in four different vegetable oils. *American Journal of Applied Sciences*, 8(5): 407-412.
- De Carvalho C., Caramujo M. (2017). Carotenoids in aquatic ecosystems and aquaculture: A Colorful business with implications for human health. *Frontiers in Marine Science*, 4:93. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00093>
- Guevara M., Lodeiros C., Gómez O., Lemus N., Núñez P., Romero L., Vásquez A., Rosales N. (2005). Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella sp.* (Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 53: 331-337.
- Guillard R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: *Culture of marine invertebrate animals*. Smith, W. y Chanley, M. (eds). Plenum Press, New York. Págs. 29-60.
- Granado F., Herrero C., Ación G., Molina E., Fernández J., Pérez B. (2009). *In vitro* bioaccessibility of lutein and zeaxanthin from the microalgae *Scenedesmus almeriensis*. *Food Chemistry*, 114: 747-752.
- Hernández L., Quintanilla M., Morris H., Fernández M. (1999). Contenido de algunas vitaminas en cultivos de microalga *Chlorella sp.* *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 13: 9-13.
- Kang C., Sim S. (2008). Direct extraction of astaxanthin from *Haematococcus* culture using vegetable oils. *Biotechnology Letters*, 30: 441-444.
- Limón P., Malheiro R., Casal S., Ación G., Fernández J., Rodríguez N., Cruz R., Bermejo R., Pereira J. (2014). Improvement of stability and carotenoids fraction of virgin olive oils by addition of microalgae *Scenedesmus almeriensis* extracts. *Food Chemistry*, 175: 203-211.
- Maldonado I., Scamparini A., Rodríguez D. (2007). Selection and characterization of carotenoid producing yeasts from Campinas region, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 65-70.
- Marasco E., Schimdt, C. (2003). Towards the biotechnological production of aroma and flavour compounds in engineered microorganisms. *Applied Biotechnology*, 1(3): 145-157.
- Miller H. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidant. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 45: 91-98.
- Moulton T., Buford M. (1990). The mass culture of *Dunaliella viridis* (Volvocales, chlorophyta) for oxygenated carotenoids: laboratory and pilot plant studies. *Hidrobiologia*, 204: 401-408.

- Ree M., Fujiwara H., Thompson D. (2001). Comparative metabolism, covalent binding and toxicity of BHT congeners in rat liver slices. *Chemico-Biological Interactions*, 138: 155-170.
- Rao, A. R., Sarada, R., Ravishankar G. A. (2007). Stabilization of astaxanthin in edible oils and its use as an antioxidant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(6), 957–965.
- Romero L., Guevara M., D`Armas H., Lodeiros C. (2008). Cuantificación de carotenoides totales y β -caroteno en dos cepas de *Dunaliella salina* (Chlorophyta, Volvocales) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 47(1): 67–76.
- Sánchez L., Freile Y., Rivera R., Robledo D., Narvaéz J. (2006). Regulation of two photosynthetic pigment-related genes during stress-induced pigment formation in the green alga, *Dunaliella salina*. *Biotechnology Letters*, 28: 787-791.
- Stahl W., Sies H. (2003). Antioxidant activity of carotenoid. *Molecular Aspects of Medicine*, 24: 345-351.
- Sokal R., Rohlf F. (2012). *Biometry*, 4th edn. W.H. Free-man and Co., New York.
- Tsushima M., Kawakami T., Mine M., Matsuno T. (1997). The role of carotenoids in the development of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Invertebrate Reproduction Development*, 32: 149–153. DOI: <https://doi.org/10.1080/07924259.1997.9672616>
- Vásquez A., Guevara M., Salazar G., Arredondo B., Cipriani R., Lemus N., Lodeiros C. (2007). Crecimiento y composición bioquímica de cuatro cepas de *Dunaliella* para ser utilizadas en acuicultura. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 41: 181-194.
- Xu Y., Ibrahim I., Wosu C., Ben-Amotz A., Harvey P. (2018). Potential of new isolates of *Dunaliella salina* for natural β -carotene production. *Biology*, 7:1-18.
- Yépez M., Morales E. (1998). Efecto de la concentración de nitrato y cloruro de sodio sobre la densidad celular y contenido de pigmentos de *Dunaliella viridis*. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 32(1): 1-12.
- Zoué L., Bédikou M., Gonnety J., Faulet B., Niamké S. (2012). Two novel non-conventional seed oil extracts with antioxidant and antimicrobial activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical*, 11(3): 469-475.

Recibido: 18-07-2019.

Aprobado: 19-08-2019.

Versión final: 14-10-2019.

