

# Luteína y $\beta$ -caroteno como principales antioxidantes acumulados en la microalga *Dunaliella salina*

Cindy Mayorga<sup>1</sup>, Enrique Murillo<sup>2</sup> y Leopoldo Manso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Tecnológica de Panamá, <sup>2</sup>Universidad de Panamá  
cindy.mayorga@utp.ac.pa, emurillo29@hotmail.com, leopoldo.manso@utp.ac.pa

**Resumen:** *Objetivo:* En este estudio se llevó a cabo la identificación y cuantificación de los carotenoides acumulados por la microalga *Dunaliella salina* en un cultivador de tipo "raceway" en condiciones de laboratorio.

*Materiales y Métodos:* La biomasa fue obtenida primariamente con sulfato de aluminio como floculante, centrifugada y secada. Los carotenoides se identificaron mediante la técnica de HPLC en la biomasa húmeda y seca.

*Resultados:* Se encontró que los carotenoides principalmente acumulados por *D. salina* en las condiciones de laboratorio usadas fueron la luteína y el  $\beta$ -caroteno, carotenoides conocidos por su actividad antioxidante. En las muestras secas se mantienen los mismos carotenoides, pero con ligeras pérdidas con respecto a las muestras húmedas.

*Conclusiones:* La presencia de estos carotenoides permite el uso de la biomasa algal en suplementos alimenticios encapsulados beneficiosos a la salud.

**Palabras claves:** microalga, *Dunaliella salina*, carotenoides, suplementos alimenticios,  $\beta$ -caroteno, luteína.

**Title:** Lutein and  $\beta$ -carotene as the main antioxidants accumulated in the microalgae *Dunaliella salina*.

**Abstract:** *Objective:* In this study we identified and quantified the carotenoids accumulated by the microalgae *Dunaliella salina* in a raceway system in indoor conditions.

*Materials & Methods:* The biomass was obtained primarily using aluminium sulphate, centrifuged and dried. The carotenoids were identified by the HPLC method in wet and dry biomass.

*Results:* We found that the main carotenoids accumulated by *D. salina* in indoor conditions were lutein and  $\beta$ -carotene, carotenoids well-known by their antioxidant activity. The dry samples kept almost the same amount of carotenoids as in wet samples, with only a small loss.

*Conclusions:* The presence of these carotenoids allows the possible use of their algae biomass in healthy food supplements.

**Key words:** microalgae, *Dunaliella salina*, carotenoids, food supplements,  $\beta$ -carotene, lutein.

Tipo de artículo: original

Fecha de recepción: 2 de agosto de 2016

Fecha de aceptación: 27 de mayo de 2017

## 1. Introducción

Las microalgas son organismos microscópicos fotosintéticos que crecen en ambientes de agua salada o dulce. Su mecanismo fotosintético es similar a las plantas terrestres, pero debido a su estructura celular simple y entorno acuoso donde tienen un acceso eficiente al agua, CO<sub>2</sub> y otros nutrientes, son generalmente más eficientes en convertir la luz solar en biomasa [1].

La primera evidencia científica de la existencia de las microalgas se remonta a 1838, cuando el científico francés Félix Dunal constata la presencia de un alga flagelada pequeña en los pantanos salados de las costas mediterráneas francesas; posteriormente, el botánico rumano Emanoil Teodoresco describió el hábitat de un nuevo género de alga unicelular halofílica *Dunaliella* en 1905 y nombrada por éste, en honor a Dunal [2].

Las microalgas pueden ser utilizadas para la elaboración de un rango amplio de metabolitos valiosos como proteínas, lípidos, carbohidratos, carotenoides o vitaminas para la salud, alimentos, cosméticos y producción de energía [3]. Estos compuestos y sus productos derivados han sido utilizados para un número de aplicaciones específicas como: suplementos nutricionales, aditivos alimentarios, piensos, cosméticos y biocombustibles [4].

El potencial de las microalgas como nuevas fuentes de valiosos productos químicos y otros productos, recientemente ha recuperado gran interés [5]. En las microalgas, los pigmentos son considerados como los productos de mayor potencial de éxito comercial. Los tres mayores grupos de pigmentos que se encuentran en las microalgas son las clorofilas (verde), los carotenoides (rojo, anaranjado y amarillo) y las ficobilinas (rojo y azul) [6].

## 2. Microalga *Dunaliella salina*

*Dunaliella salina* (figura 1) es una microalga verde encontrada principalmente en ambientes de agua salada y que es conocida por su actividad antioxidante protegiendo contra los radicales libres; debido a su habilidad de acumular carotenoides como el  $\beta$ -caroteno, luteína y zeaxantina, es utilizada en la industria de alimentos para la elaboración de suplementos alimenticios [7].



Figura 1. Observación microscópica de la cepa de *Dunaliella salina* aislada en Panamá.

Cuando las células de *Dunaliella salina* se estresan, comienzan a producir carotenoides protectores en las células [8], especialmente  $\beta$ -caroteno, cambiando el color de sus células de verde a anaranjado o rojo debido a que se encuentran en condiciones extremas como salinidad alta, radiación solar alta y bajos niveles de nitrógeno [9]. Hoy en día se sabe que *Dunaliella salina* es la mejor fuente comercial de  $\beta$ -caroteno natural, entre todos los organismos en el mundo [10].

El  $\beta$ -caroteno ayuda a disminuir los efectos dañinos de los radicales libres, los cuales se asocian a varias formas de cáncer. La luteína y la zeaxantina se relacionan a la disminución del riesgo de enfermedades crónicas como cataratas, la degeneración macular, la arteriosclerosis y también en la prevención del cáncer [11].

El objetivo de esta investigación es identificar y cuantificar mediante la técnica de HPLC, los carotenoides acumulados por la biomasa de una cepa panameña de *Dunaliella salina* cultivada a nivel de laboratorio en un cultivador tipo "raceway".

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Condiciones de cultivo

Se utilizó una cepa de *Dunaliella salina* aislada en la Cooperativa Salinera Marín Campos (figura 2) en Aguadulce, Provincia de Coclé, Panamá y mantenida en los laboratorios del Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales de la Universidad Tecnológica de Panamá (CEPIA).

Se llevó a cabo un cultivo semi-continuo en condiciones de laboratorio de *D. salina* en un cultivador de tipo "raceway" (figura 3) de 0.43 m<sup>2</sup> que contaba con una paleta giratoria a motor y un prototipo para la inyección de CO<sub>2</sub>. Para la iluminación, se colocaron sobre el cultivador lámparas fluorescentes blancas y focos de luces tipo LED azules y rojas aportando una densidad de flujo fotones PAR total de 84.49  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Para el control de pH se utilizó un sistema ON-OFF con registro automático cada 10 s utilizando un potenciómetro conectado a un controlador Arduino Uno. Como actuador se utilizó una bomba peristáltica adaptada a un caudal de 15 mL/min de KOH 1M para el ajuste de pH en un rango de 8.00-9.00. Se cultivó para un volumen de 45 litros con el medio de cultivo de Borowitzka [12] a una salinidad del 12-13%. El cultivo semicontinuo se llevó a cabo durante 15 días.



Figura 2. *Dunaliella salina* en desagüe de salinera.



Figura 3. Cultivo de *Dunaliella salina* en cultivador "raceway".

El uso de luces fluorescentes, luces rojas y azules permiten un espectro de luz más completo y una mejor absorción por parte de los pigmentos fotosintéticos.

El medio de cultivo de Borowitzka contiene todos los nutrientes requeridos para el crecimiento de *D. salina*. Los niveles de pH en un rango de 8.00-9.00 y salinidad por arriba del 12-13% se establecieron por ser las condiciones selectivas para el crecimiento de *Dunaliella salina*.

#### 3.2 Obtención de biomasa

La biomasa del alga se cosechó a razón de un volumen de 20 L cada tres días en los días 9, 12 y 15 que corresponden a los días con mayor acumulación de biomasa. La concentración primaria se realizó por floculación con 0.5 g de sulfato de aluminio por cada litro, obteniendo una biomasa concentrada húmeda. Posteriormente, la biomasa se centrifugó a 2500 rpm durante 3 minutos para su obtención en pasta y finalmente, colocada en refrigeración a 10 °C durante 3 días para obtener la biomasa seca (figura 4).

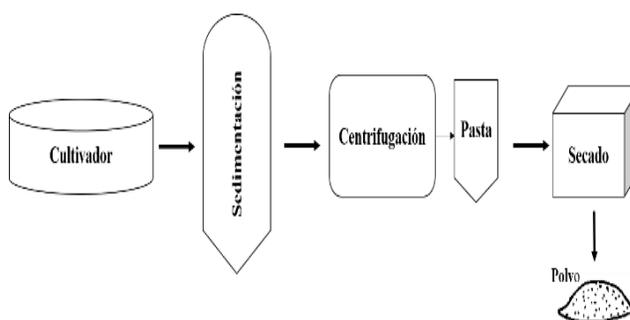


Figura 4. Diagrama de flujo para la obtención de biomasa.

Para cada 20 L cosechados en los días 9, 12 y 15, se obtuvo 1000 mL de biomasa húmeda aproximadamente en cada una de las cosechas. Posteriormente, una vez la biomasa húmeda se centrifugó y secó, se obtuvieron 10.0 g aproximadamente de biomasa en polvo al final del proceso.

### 3.3 Identificación y cuantificación de carotenoides por HPLC

La determinación de carotenoides se llevó a cabo con la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para identificar y cuantificar los carotenoides acumulados por la microalga en las condiciones bajo techo utilizadas; ya que, la composición de los carotenoides de forma individual es importante para conocer cuáles se encuentran principalmente y en qué cantidades.

Se realizaron tres repeticiones para la biomasa húmeda (figura 5) y la biomasa seca (figura 6).

#### 3.3.1 Extracción y remoción de agua y solventes

Se colocaron 3 muestras de 5 mL de biomasa húmeda en morteros distintos. Para la biomasa seca se pesaron 3 muestras de 0.5000 g colocándolas en morteros distintos y se añadieron 10 mL de agua destilada a cada muestra para rehidratar, dejándola en reposo durante 30 mins. Con la ayuda de un pilón se unificó la suspensión acuosa de la biomasa con 50 mL de acetona para la extracción de pigmentos. Se retiró la parte sobrenadante y se repitió varias veces la adición de acetona hasta que la solución sobrenadante fuera incolora.

Luego, junto a la solución de pigmentos se añadieron 100 mL de éter en hexano 1:1 y 100 mL de agua en un embudo separador para separar los pigmentos del agua y la acetona. Finalmente, la solución de pigmentos se transfirió a un balón y los solventes se eliminaron por evaporación a presión reducida [13.]



Figura 5. Biomasa de *Dunaliella salina* húmeda.



Figura 6. Biomasa de *Dunaliella salina* seca.

#### 3.3.2 Saponificación

La solución de pigmentos obtenida anteriormente, se añadió a un tubo de ensayo con 10 mL de NaOH al 5% en metanol. La mezcla se agitó y se envolvió el tubo de ensayo con papel aluminio para evitar la degradación de los carotenoides por la luz, colocándolo en un lugar oscuro. Se permitió la reacción de saponificación en reposo durante 2 horas.

Por último, a la solución en el tubo se le añadieron una mezcla 50:50 v/v de 100 mL de éter y agua en un embudo separador. Se observó una separación en 2 fases: una solución amarilla con los carotenoides en la parte superior y una solución verde con la clorofila en la parte inferior (figura 7). Se decantó la parte inferior y se guardó la solución de carotenoides en un tubo para su análisis [14].

#### 3.3.3 Análisis de carotenoides

Se midieron los carotenoides totales de la solución a 450 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Luego, se analizaron las muestras con alícuotas de 20  $\mu$ L de carotenoides en el equipo de HPLC Hewlett Packard Series 1050 utilizando los solventes metil-tert-butil-éter y metanol de grado HPLC en una proporción 75:25 v/v.

La identificación de los carotenoides se realizó con los picos cromatográficos que se analizaron comparando los tiempos de retención con los estándares. El cromatógrafo conectado a una computadora presentó un cromatograma y valores de porcentaje de área bajo la curva para su cuantificación individual a través del software Agilent 1050. El tiempo de análisis de las muestras fue de aproximadamente 40 mins [13].

El cálculo de los carotenoides totales (CT) en las muestras húmedas y secadas en frío se llevó a cabo con la siguiente ecuación:

$$CT \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \text{ m.s.} \right) = \frac{4 \times V \times A \times FD}{P} \quad (1)$$

donde: V: volumen total, A: absorbancia, FD: factor de dilución y P: peso inicial.

Posteriormente, se llevó a cabo la cuantificación de los carotenoides de manera específica.



Figura 7. Obtención de carotenoides.

El cálculo de los carotenoides específicos (CE) está dado por la siguiente ecuación:

$$CE \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \text{ m.s.} \right) = \frac{CT \times \% ABC}{100} \quad (2)$$

donde: CT: carotenoides totales y ABC: área bajo la curva.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Carotenoides totales y composición de carotenoides

La concentración de carotenoides totales fue calculada en  $\mu\text{g/g}$  m.s. Para las muestras húmedas se obtuvo un promedio de 3,468.52  $\mu\text{g/g}$  m.s. y para las muestras secas se obtuvo en promedio 2,928.69  $\mu\text{g/g}$  m.s. Estos datos permiten el cálculo de los carotenoides específicos.

La identificación de los carotenoides para las muestras húmedas y secas se muestran en el cromatograma de la figura 8 y 9 respectivamente. Los cromatogramas muestran 13 picos con los carotenoides e isómeros identificados con los patrones disponibles.

El análisis de las muestras en la biomasa húmeda y seca se realizó para comparar si el proceso de secado en frío mantenía la misma composición de carotenoides.

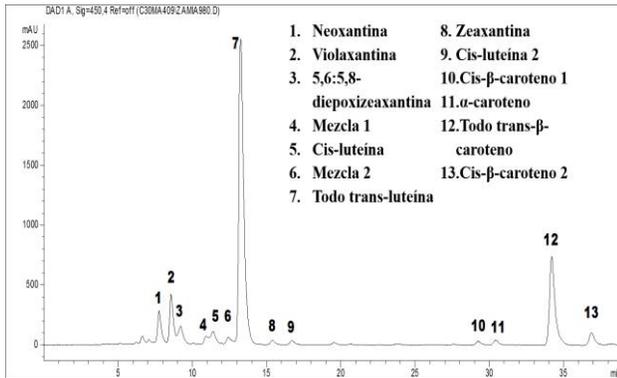


Figura 8. Cromatograma de HPLC de carotenoides extraídos en muestras húmedas.

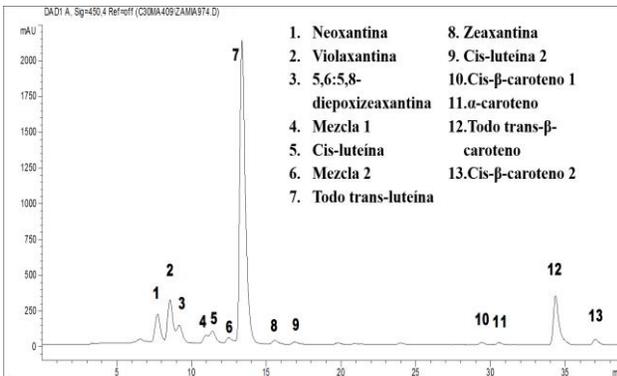


Figura 9: Cromatograma de HPLC de carotenoides extraídos en muestras secas.

Tanto para las muestras húmedas como para las secadas en frío se encontraron los mismos carotenoides, por lo que el proceso de secado permite mantener la composición de los carotenoides en la biomasa seca. La tabla 1 presenta la cuantificación promedio de los carotenoides en las muestras húmedas y secas.

La luteína y el β-caroteno fueron encontrados en más cantidad en esta microalga. Las mezclas 1 y 2 son una mezcla de carotenoides sin identificar debido a que sus características espectrales y datos de tiempo de retención no correspondían con los estándares disponibles.

Se encontró que el carotenoide más acumulado fue la luteína con 1,920.18  $\mu\text{g/g}$  m.s. en muestras húmedas y 1,806.10  $\mu\text{g/g}$  m.s. en muestras secadas en frío, seguido del β-caroteno con 615.29  $\mu\text{g/g}$  m.s. en muestras húmedas y 295.15  $\mu\text{g/g}$  m.s. en muestras secadas en frío.

Estos resultados corresponden con lo reportado por Kleinegris et al. [15] para un cultivo de *Dunaliella salina* sin estrés, mostrando que en el perfil de carotenoides se produce una mayor acumulación de la luteína seguido del β-caroteno; así también de los carotenoides violaxantina y neoxantina.

Tabla 1. Cuantificación de carotenoides específicos en muestras húmedas y secas

Carotenoides Específicos	Muestras Húmedas ( $\mu\text{g/g}$ m.s.)	Muestras Secas ( $\mu\text{g/g}$ m.s.)
Neoxantina	157.03	163.35
Violaxantina	229.48	247.47
5,6:5,8 Diepoxizeaxantina	110.15	112.78
Mezcla 1	34.44	37.78
Cis-luteína 1	101.92	80.50
Mezcla 2	43.24	38.92
Todo trans-luteína	1,920.18	1,806.10
Zeaxantina	24.36	21.38
Cis-luteína 2	27.11	13.13
Cis-β-caroteno 1	24.84	12.97
α-caroteno	32.09	11.05
Todo-trans-β-caroteno	615.29	295.15
Cis-β-caroteno 2	86.01	33.12

Se observó que los valores de los carotenoides en las muestras húmedas y las secadas en frío son similares. Además, se puede evidenciar que hay ligeras diferencias en los carotenos (cis-β-caroteno, α-caroteno y todo trans-β-caroteno) en las muestras húmedas con respecto a las muestras secadas en frío,

debido a que los carotenos son más sensibles e inestables que las xantofilas (neoxantina, violaxantina, cis-luteína, todo trans-luteína y zeaxantina). A pesar que la biomasa seca fue procesada en frío, hay ligeras pérdidas de los carotenos.

### 3. Conclusiones

En un cultivo masivo de *Dunaliella salina*, en las condiciones bajo techo utilizadas, se acumula principalmente luteína y  $\beta$ -caroteno, así también otros carotenoides en menor concentración como la zeaxantina, neoxantina, violaxantina y  $\alpha$ -caroteno.

El proceso de secado ayuda a mantener la misma composición de carotenoides en la biomasa seca sin sufrir grandes pérdidas con respecto a la biomasa húmeda.

Estos carotenoides que son conocidos por su capacidad antioxidante y anticancerígena, permiten la elaboración de suplementos alimenticios beneficiosos a la salud.

La principal limitante fue no poder llevar a cabo más repeticiones para la cuantificación de carotenoides y hacer un análisis estadístico para evaluar las muestras húmedas y secas.

En estudios futuros, se realizarán cultivos a cielo abierto de esta cepa de *D. salina* con aporte de la luz solar para lograr una mayor acumulación de carotenoides, principalmente del  $\beta$ -caroteno y comparar la acumulación de carotenoides en condiciones de laboratorio y de cielo abierto.

### Agradecimiento

Se agradece al Ingeniero Jorge Serrano por su apoyo en los sistemas de control para llevar a cabo el cultivo de la microalga. Al Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales por facilitar sus instalaciones para el desarrollo de esta investigación.

### Referencias

- [1] A. Carlsson, J. Beilen, R. Moller and D. Clayton, Micro and Macro-algae: utility for industrial applications. UK: EPOBIO, pp. 1-68, 2007. [http://www.biofuelstp.eu/downloads/epobio\\_aquatic\\_report.pdf](http://www.biofuelstp.eu/downloads/epobio_aquatic_report.pdf)
- [2] A. Oren. "A hundred years of Dunaliella research: 1905–2005", Saline Systems, vol. 1(2), pp. 1-14, Jul. 2005.
- [3] I. Priyadarshani and B. Rath B. "Commercial and industrial applications of micro algae", Journal Algal Biomass, vol. 4, pp. 89-100. 2012.
- [4] R. Shields, K. Flynn, B. Lovitt, C. Greenwell, I. Ratcliffe, P. Facey and R. Jarvis, "A Technology Review and Roadmap for Microalgal Biotechnology in Wales", Centre for Sustainable Aquaculture Research, Swansea University, United Kingdom, pp. 2-49, 2010.
- [5] M. Borowitzka, "High-value products from microalgae-their development and commercialization", Journal of Applied Phycology, vol. 25(3), pp. 743-756, 2013.
- [6] M. Koller, A. Muhr and G. Brauneegg, "Microalgae as versatile cellular factories for valued products", Algal Research, vol. 6, pp. 52-63, 2014.
- [7] S. Mokady, A. Abramovici and U. Cogau, "The safety evaluation of Dunaliella bardawil as a potential food supplement", Food Chemistry Toxicology, vol. 27, pp. 221–226, 1989.
- [8] D. Kleinegris, M. van Es, M. Janssen, W. Brandenburg and R. Wijffels, "Carotenoid fluorescence in Dunaliella salina", Journal of Applied Phycology, vol. 22, pp. 645-649, 2010.
- [9] T. Abu Rezaq, S. Al-Hooti, D. Jacob, M. Al-Shamali, A. Ahmed and N. Ahmed, "Induction and extraction of  $\beta$ -carotene from the locally isolated Dunaliella salina", Journal Algal Biomass, vol. 1(4), pp. 58-83, 2010.
- [10] A. Hosseini Tafreshi and M. Shariati, "Dunaliella biotechnology: methods and applications", Journal of Applied Microbiology, vol. 107(1), pp. 4-35, 2009.
- [11] E. Jin, B. Feth and A. Melis, "A mutant of the green alga Dunaliella salina constitutively accumulates zeaxanthin under al growth conditions" Biotechnology Bioengineering, vol. 81, pp.115-124, 2003.
- [12] M. Borowitzka, "The mass culture of Dunaliella salina", FAO Regional seafarming development and demonstration project, 1990. <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB728E/AB728E00.htm#TOC>
- [13] G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander, Carotenoids Handbook, 2nd ed., Berlin, Germany: Birkhauser, 1995.
- [14] L. Nollet, Food Analysis by HPLC, 2nd ed., New York, USA: Marcel Dekker, 2000.
- [15] D. Kleinegris, M. Janssen, W. Brandenburg and R. Wijffels, "The Selectivity of Milking of Dunaliella salina", Marine Biotechnology, vol. 12, pp.14-23, 2010.