

CUANTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES TOTALES  
Y  $\beta$ -CAROTENO EN DOS CEPAS DE *DUNALIELLA SALINA*  
(CHLOROPHYTA, VOLVOCALES)  
AISLADAS DE LAGUNAS HIPERSALINAS DE VENEZUELA.

LOLYMAR ROMERO<sup>1</sup>, MIGUEL GUEVARA<sup>2</sup>, HAYDELBA D'ARMAS<sup>3</sup> & CÉSAR LODEIROS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Post-Grado en Ciencias Marinas, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.  
lolyrome@gmail.com

<sup>2</sup>Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

<sup>3</sup>Escuela de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

RESUMEN: *Dunaliella salina* es una microalga que se caracteriza por soportar condiciones de cultivo extremas, ya que es capaz de producir ciertos compuestos orgánicos, como los carotenoides, que le confiere la capacidad de fotoprotección. Las salinas de Araya y Coche representan zonas geográficas con potencial de explotación para el cultivo de esta microalga, por brindar factores estresantes, como altas intensidades de luz y salinidad, entre otros; que son capaces de inducir la producción de carotenoides. Para el presente estudio se utilizaron como biomasa de partida, cultivos unialgales de *D. salina*, cepa Araya y cepa Coche, con densidades celulares conocidas, cultivadas bajo condiciones controladas de laboratorio (26°C, fotoperiodo 12:12, iluminación de 10000 lux y aireación constante de 200 ml.min<sup>-1</sup>) y una salinidad de 200 UPS. Para la selección del mejor sistema de extracción de carotenoides totales se utilizaron tres mezclas de solventes (acetona/agua, acetona/metanol y tetrahidrofurano/etanol), en tres proporciones distintas (50/50, 70/30 y 90/10) y se evaluaron basándose en el contenido de carotenoides totales que éstas lograron extraer, resultando acetona/metanol 90/10 el mejor sistema de solventes, para ambas cepas. La separación e identificación de los carotenoides totales y  $\beta$ -caroteno se realizó mediante cromatografía de capa fina, CCF, y cromatografía de columna, CC, lográndose agrupar las fracciones según los factores de reparto de cada eluato y comparación de los  $R_f$  con los de un patrón comercial de  $\beta$ -caroteno. El posterior análisis de las fracciones provenientes de la separación por CC, mediante HPLC permitió cuantificar el contenido de  $\beta$ -caroteno presente en las mezclas de carotenoides totales extraídos de cada cepa, resultando *D. salina*, cepa Coche, la mayor productora de  $\beta$ -caroteno (54,3%, con relación al contenido de carotenoides totales).

Palabras clave:  $\beta$ -caroteno, carotenoides totales, CCF, CC, HPLC.

ABSTRACT: *Dunaliella salina* is a microalga which, due to its ability to produce photoprotective organic compounds such as carotenoids, is able to withstand extreme conditions. The salt beds of Araya and Coche, due to stress factors such as high salinity and light intensity and other factors that induce carotenoid production, are potentially exploitable for the cultivation of this microalga. For this study, unialgal populations of both Coche and Araya strains of *D. salina* of known cell density, cultivated under controlled laboratory conditions (26°C, photoperiod 12:12, illumination of 10,000 lux, constant aeration of 200 ml.min<sup>-1</sup>, and a salinity of 200 UPS) were used as the starter biomass. Three solvent mixtures (acetone/water, acetone/methanol, and tetrahydrofurane/ethanol) in three proportions (50:50, 70:30, and 90:10) were used to select the best system of total carotenoid extraction, acetone/methanol 90:10 resulting the most high-yielding solvent system for both strains. Separation and identification of total carotenoids and  $\beta$ -carotene was done using thin layer chromatography (TLC) and column chromatography (CC), grouping the samples according to each eluate, and comparing them to the  $R_f$  of commercial  $\beta$ -carotene. The subsequent analysis of the fractions from the CC separation allowed for quantification of the  $\beta$ -carotene present in the total carotenoid content of each strain, Coche resulting the most high-yielding (54.3%).

Key words:  $\beta$ -carotene, total carotenoids, TLC, CC HPLC.

## INTRODUCCIÓN

El  $\beta^2$ -caroteno ( $C_{40}H_{56}$ ) es un carotenoide, soluble en solventes no polares (éter de petróleo, cloroformo, acetona, y benceno) e insoluble en agua. Por sus largos sistemas de dobles enlaces conjugados, el  $\beta$ -caroteno es extremadamente reactivo y, consecuentemente, inestable en presencia de agentes físicos (luz, oxígeno y calor) y químicos (ácidos y álcalis), pudiendo experimentar fotoisomerización *cis-trans* y oxidación (MENDOZA *et al.* 1996). El  $\beta$ -caroteno es el precursor de la vitamina A e interviene en muchos procesos vitales: promueve la resistencia de los organismos a los procesos degenerativos asociados con el envejecimiento, disminuye el riesgo de padecer enfermedades de la piel y cardiovasculares, entre otros (Mathews-ROTH 1985; LATSCHA 1990; HEMAISWARYA & DOBLE 2006; RAJA *et al.* 2007).

Hasta ahora, la mayor fuente natural de  $\beta$ -caroteno se ha reportado en la microalga *Dunaliella salina*, la cual posee la habilidad de acumular grandes cantidades de dicho tetraterpeno (10 al 14% de su masa seca) cuando se somete a condiciones de cultivo estresantes (MASSYUK 1973; BEN-AMOTZ & AVRON 1982), seguida por *D. parva* y *D. tertiolecta*, con 9% de su masa seca y *D. viridis*, con 0,07% de  $\beta$ -caroteno y carotenoides mixtos (MOULTON *et al.* 1987; MOULTON & BURFORD 1990). La acumulación de  $\beta$ -caroteno por *D. salina* está fisiológicamente relacionada con la alta intensidad de luz, la deficiencia de nutrientes y otras condiciones estresantes de cultivo, como las bajas y/o altas temperaturas y elevadas salinidades, entre otros (BEN-AMOTZ 1987; BOROWITZKA *et al.* 1990; MOULTON & BURFORD 1990).

Los carotenoides totales, y en especial el  $\beta$ -caroteno, han sido obtenidos, a partir de *D. salina*, por varios autores, utilizando solventes orgánicos para su extracción, y métodos espectrofotométricos y cromatográficos para su cuantificación. Al respecto, DOMÍNGUEZ (1999) reporta que para microalgas marinas de pared lábil se pueden realizar extracciones de pigmentos con acetona/metanol (2:1). De igual forma, FÁBREGAS *et al.* (1998), recomiendan la utilización del mismo sistema de solventes, solo que en otras proporciones (1:2) para la extracción de pigmentos como la clorofila *a*, astaxantina,  $\beta$ -caroteno y luteína. Otros autores, han utilizado con mucho éxito acetona/agua, 90/10 (CIFUENTES *et al.* 1996; 2001), etanol (GÓMEZ *et al.* 1992) y tetrahidrofurano/etanol 15% (BOROWITZKA *et al.* 1990).

La mayoría de los trabajos desarrollados en Venezuela, relacionados con la extracción y cuantificación de carotenoides y  $\beta$ -caroteno, se han realizado, en su mayoría, con cepas no autóctonas de *Dunaliella salina*, donde la determinación de éstos, solo se ha llevado a cabo por métodos espectrofotométricos (MORALES 1995; LEAL 1996; GUEVARA *et al.* 2005; DUBOIS 2006). El objetivo de la presente investigación fue cuantificar el contenido de carotenoides totales y  $\beta$ -caroteno por métodos espectrofotométricos y Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia, (HPLC), respectivamente, de dos cepas nativas de *D. salina*, con la finalidad de analizar la potencialidad de estas cepas como organismos productores de  $\beta$ -caroteno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de la presente investigación se utilizaron dos cepas de *Dunaliella salina* (cepa Araya, LAEP-44 y cepa Coche, LAEP-21, aisladas de las Salinas de Araya, 10°37' Lat. N; 63°7' Long. W y Coche, 10°47' Lat. N; 63°59' Long. W, Venezuela, respectivamente), las cuales forman parte de la colección de cultivos permanentes del Laboratorio de Acuicultura, del Instituto Oceanográfico de Venezuela, de la Universidad de Oriente.

Ambas cepas fueron cultivadas en agua de mar (200 UPS) filtrada a través de filtros GF/C, esterilizada en autoclave (120°C/15min/15psi) y enriquecida con medio Algal con una concentración de 0,5 mM de nitrato (FÁBREGAS *et al.* 1984). Los cultivos (500 ml, por triplicado) con aireación constante de 200 ml.min<sup>-1</sup>, se iniciaron con 8x10<sup>3</sup> cel.ml<sup>-1</sup> y se sometieron a condiciones controladas de laboratorio (26°C, fotoperiodo 12:12 e iluminación de 10000 lux) durante 20 días.

La evaluación de la densidad celular y la masa seca de los cultivos, se realizó a través del conteo en una cámara de Neubauer y por gravimetría, respectivamente.

Para las extracciones de los carotenoides totales de las dos cepas de *D. salina*, se probaron tres mezclas de solventes: acetona/agua, acetona/metanol y tetrahidrofurano/etanol, en tres proporciones cada una, 50/50, 70/30 y 90/10 V/V, dado a que en estos sistemas de extracción (mezclas y proporciones) se han obtenido los mayores rendimientos de carotenoides (JIMÉNEZ & NIEL 1990; BOROWITZKA *et al.* 1990; RODRÍGUEZ 1999; BOROWITZKA 2005).

La biomasa (procedente de la filtración de 5 ml de cultivo, por triplicado), cosechada al final del ensayo (20 días), se sometió a extracción durante 24 h a 4°C, con 5 ml de cada una de las proporciones de las mezclas de solventes, y posteriormente se les midió la absorbancia a 480 nm, debido a que, en análisis previos, el  $\beta$ -caroteno ( $\beta$ -caroteno estándar, isómero *todo trans*), en todos los sistemas de extracción ensayados, mostró los máximos de absorción a esta longitud de onda.

La cuantificación del contenido de carotenoides totales, en cada uno de los sistemas de extracción, se realizó por espectrofotometría según STRICKLAND & PARSONS (1972) y los resultados obtenidos se contrastaron a través de un análisis de varianza de dos factores (factor 1: mezclas de solventes y factor 2: proporciones) de acuerdo a SOKAL & ROLF (1991).

El sistema de extracción que proporcionó la mayor cantidad de carotenoides totales, de acuerdo al análisis de varianza aplicado, se seleccionó para realizar las sucesivas extracciones de estos pigmentos, los cuales se fraccionaron a través de cromatografía de capa fina, CCF, sobre sílica gel, para escoger el orden de elución de los solventes a utilizar posteriormente en su separación por cromatografía de columna, CC. Los sistemas de solventes empleados en la CCF fueron: acetona/hexano 70/30, acetona/hexano 2/98, acetona/éter de petróleo 5/95 y éter de petróleo. La separación de las distintas fracciones del extracto de carotenoides totales se realizó en una columna empacada con sílica gel 60, 0,063-0,200 mm. La recolección de los eluatos se realizó cada 5 ml o cuando se presentó una banda muy definida.

#### Identificación y Cuantificación de $\beta$ -caroteno

La identificación y cuantificación del  $\beta$ -caroteno se realizó mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia, HPLC, a una longitud de onda de 440 nm, haciendo uso de un patrón comercial (Sigma St Louis, Mo, USA.) que permitió calcular el factor de respuesta y el tiempo de retención, identificar el pico correspondiente a dicho caroteno en los cromatogramas de las fracciones separadas y calcular su concentración en ng/ml (Fig.1). Esta concentración, al dividirse por la densidad celular correspondiente a 1 ml y multiplicarse por 1000, quedó expresada en picogramo.célula<sup>-1</sup> (pg.cel<sup>-1</sup>) (VIDUSSI *et al.* 1996). Se utilizó un HPLC analítico marca HP, serie 1050 con un detector UV-Visible, equipado con una columna de acero inoxidable de 10 cm x 4,6 mm de diámetro interno,

empacada con C8 MOS Hypersil (5  $\mu$ m de tamaño de partícula). Los pigmentos se eluyeron sucesivamente con acetona:metanol (50:50) durante 1 min; metanol por 18 min y acetona:metanol (75:25) por 1 min a un flujo de 1 ml.min<sup>-1</sup>. El volumen de inyección fue de 20  $\mu$ l.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Crecimiento de las cepas de *Dunaliella salina*:

Los valores de densidad celular y masa seca de los cultivos de *Dunaliella salina*, al final del ensayo (fase estacionaria), se muestran en la Tabla 1.

#### Extracción y cuantificación de carotenoides totales

El contenido de carotenoides totales por célula, extraídos de las cepas Araya y Coche, se muestra en la Tabla 2. Se observó que los mayores contenidos de carotenoides totales se lograron extraer con la mezcla acetona/metanol, en proporción de 90/10, excepto en la mezcla tetrahidrofurano/etanol, donde la extracción se obtuvo con la proporción 70/30. A medida que se disminuyó la proporción del solvente más polar en las mezclas acetona/agua y acetona/metanol se obtuvo mayores contenidos de carotenoides totales. Entre las cepas analizadas, Coche se perfila como la más productora de carotenoides, debido a que mostró en acetona/metanol (90/10) un contenido de carotenoides totales 12% mayor que el obtenido en la cepa Araya.

#### Selección del mejor sistema de extracción

Las concentraciones de carotenoides totales obtenidos en las dos cepas de *D. salina* en los diferentes sistemas de extracción (mezclas y proporciones) mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), siendo acetona/metanol 90/10 el sistema que logró extraer la mayor cantidad de estos pigmentos. Lo anterior puede deberse a que en este sistema de solventes los dipolos entre el oxígeno y el carbono del grupo cetónico y otro entre el oxígeno y el carbono del grupo alcohol pueden interactuar por atracción electrostática, con los dipolos transitorios que se forman a lo largo de la estructura de los carotenoides, cuya nube electrónica está deslocalizada por toda la estructura, interactuando con los carbonos que actúan como centros positivos presentes en las moléculas de acetona y metanol. Adicionalmente, está el hecho de que entre las moléculas de los distintos carotenoides polares y no polares existen fuerzas de Van der Waals que, en cierta forma, influyen en la extracción de los carotenoides no solubles en los solventes polares.

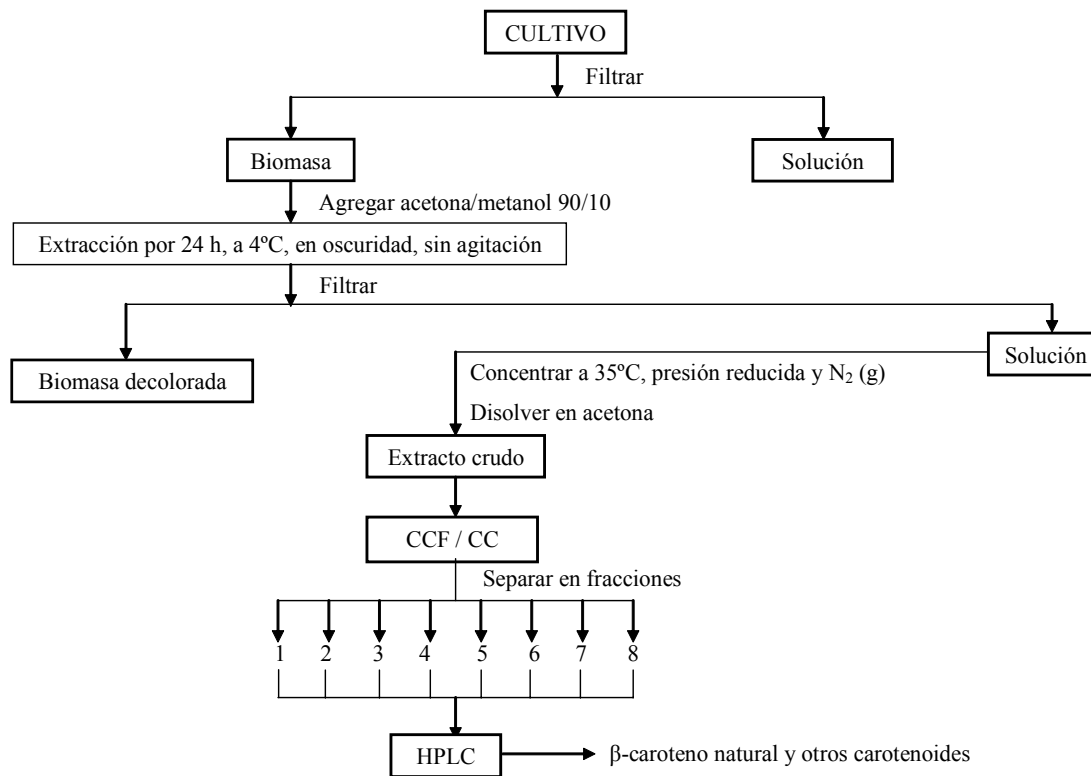


Fig. 1. Protocolo de extracción, separación y cuantificación de  $\beta$ -caroteno de *D. salina*, cepas Araya y Coche.

En la mezcla acetona/agua también se forman dipolos entre el oxígeno y carbono de grupo cetónico, pero éste se ve influenciado por la presencia del agua, que en cierta manera, por su condición de solvente muy polar y posibilidad de formar puentes de hidrógeno, neutraliza el dipolo creado en la acetona. La estructura del tetrahidrofurano puede estar influyendo en la eficiencia de este solvente para cumplir la función de extracción, ya que éste es un compuesto con una estructura cíclica, donde existe mayor impedimento estérico a la hora de las posibles

interacciones electrostáticas que se pueden presentar con las estructuras de los carotenoides, además de que el dipolo que forman los electrones desapareados del oxígeno se reparte entre sus dos carbonos vecinos.

Los contenidos de carotenoides totales obtenidos en esta investigación en acetona/metanol, 90/10 (Araya: 21,5  $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ ; Coche: 24,8  $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ ) son superiores a los citados por MARÍN *et al.* (1998), quienes obtuvieron 0,8-1,6  $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$  en cepas originarias de las salinas de Araya (Venezuela). Sin embargo, se ha demostrado que al realizar cultivos de *D. salina* en condiciones ambientales extremas pueden lograrse concentraciones superiores de carotenoides, como se reseña en AGUILAR *et al.* (2004) y GUEVARA *et al.* (2005), quienes al utilizar salinidades superiores 200 UPS reportaron valores de carotenoides totales de 124  $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$  en *D. salina* (cepa Perú) y 106  $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$  en *D. salina* (cepa Coche), respectivamente.

La mezcla acetona/metanol (90/10), con similar polaridad a la mezcla acetona/agua (90/10) ha sido

TABLA 1. Densidad celular ( $\text{cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y masa seca ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de cultivo) de las cepas Araya y Coche de *Dunaliella salina* al final del ensayo (fase estacionaria).

Cepas	Densidad celular (promedio $\pm$ DS)	Masa seca (promedio $\pm$ DS)
Araya	150 000 $\pm$ 2500	0,4 $\pm$ 0,08
Coche	185 000 $\pm$ 1500	0,5 $\pm$ 0,04

TABLA 2. Concentración promedio de carotenoides totales por célula ( $\text{pg.cel}^{-1} \pm \text{DS}$ ) extraídos de *D. salina*, cepas Araya y Coche.

Mezclas	Proporciones	Cepas	
		Araya	Coche
Acetona/Agua	50/50	0,5 $\pm$ 0,05	0,9 $\pm$ 0,14
	70/30	11,6 $\pm$ 0,46	17,7 $\pm$ 0,17
	90/10	18,9 $\pm$ 0,81	20,3 $\pm$ 0,22
Acetona/Metanol	50/50	17,0 $\pm$ 0,42	23,6 $\pm$ 0,18
	70/30	20,0 $\pm$ 0,67	24,0 $\pm$ 0,67
	90/10	21,5 $\pm$ 0,30	24,8 $\pm$ 0,21
Tetrahidrofirano/Etanol	50/50	7,5 $\pm$ 0,22	8,5 $\pm$ 0,24
	70/30	12,9 $\pm$ 0,41	19,3 $\pm$ 0,36
	90/10	6,7 $\pm$ 0,68	13,4 $\pm$ 0,19

referida como un sistema eficiente de extracción de carotenoides. Así, por ejemplo, CIFUENTES *et al.* (1996) y GÓMEZ *et al.* (2003) al utilizar esta mezcla de solvente reportaron en cepas de *D. salina* procedente de las costas chilenas, valores de carotenoides de 110,9 – 124,0  $\text{pg.cel}^{-1}$  y 26,9  $\text{pg.cel}^{-1}$ , respectivamente. Por otra parte, la mezcla acetona/metanol (2/1 y 1/2) también ha brindado excelentes resultados en la extracción de los pigmentos clorofila *a*, astaxantina,  $\beta$ -caroteno y luteína (FÁBREGAS *et al.* 1998; DOMÍNGUEZ, 1999).

Separación de los carotenoides por cromatografía de capa fina, CCF y cromatografía de columna, CC.

Durante el desarrollo de la CC del extracto de carotenoides totales extraídos de *D. salina*, cepa Araya, se obtuvieron 38 eluatos, cuyo monitoreo, mediante CCF, permitió agruparlos en 8 fracciones (Tabla 3). Se recuperó el 49,8% del material cromatografiado. Al aplicar CC al extracto de carotenoides totales extraídos de *D. salina*, cepa Coche, se obtuvieron 45 eluatos, cuyo monitoreo, mediante CCF, permitió agruparlos en 8 fracciones (Tabla 3). Se recuperó el 43,0% del material cromatografiado.

Con base a lo anterior y por la inestabilidad que presentan los carotenoides y en especial el  $\beta$ -caroteno, el primer solvente de elución empleado en la columna cromatográfica fue el éter de petróleo. Al utilizar inicialmente

el solvente menos polar se garantizó que entre los primeros eluatos de la columna se encontrara el  $\beta$ -caroteno, disminuyendo su tiempo de exposición ante los agentes fisicoquímicos que pueden modificar o degradar su estructura. La composición de la mezcla de elución fue variada, modificando a su vez, las polaridades de las mezclas, para lograr separar los carotenoides más polares, como es el caso de las xantofilas, y otros pigmentos que se encontraban presentes en los extractos de cada cepa.

#### Separación y cuantificación de $\beta$ -caroteno por HPLC

Para el análisis de los cromatogramas obtenidos en cada una de las ocho (8) fracciones de los extractos de *D. salina*, cepa Araya y cepa Coche, se realizaron tres corridas de un patrón de  $\beta$ -caroteno ultrapuro para HPLC, a partir del cual se obtuvo el tiempo de retención estándar ( $t = 16,831$  min, Fig. 2A). Fueron realizadas 21 corridas en total, de las cuales tres correspondieron al análisis del patrón de  $\beta$ -caroteno, dos de los extractos crudos de *D. salina*, cepa Araya (Fig. 2B) y cepa Coche (Fig. 2C) y 16 correspondientes a las fracciones separadas por CC. Para ambas cepas, el mayor contenido de  $\beta$ -caroteno (Tabla 4) se encontró en la fracción 3 (Coche: 46,22%; Araya: 16,51%).

Los contenidos de  $\beta$ -caroteno obtenidos en este trabajo con la cepa Coche (54,3%) superan los obtenidos por GÓMEZ *et al.* (1999), quienes al cultivar en el medio Provasoli (McLACHLAN 1973) las cepas chilenas CONC-001 y CONC-007 de *D. salina* y *D. bardawil*, obtuvieron concentraciones de 41,2; 16,8 y 46,2%, respectivamente. Estas diferencias en el contenido de  $\beta$ -caroteno pueden deberse a la salinidad utilizada (125 UPS), la cual es menos estresante que la usada en la presente investigación.

El incremento de la salinidad en los cultivos de *D. salina*, conjuntamente con el aumento de la iluminación, promueven una mayor acumulación de  $\beta$ -caroteno. Así por ejemplo, LOEBLICH (1982) determinó que el  $\beta$ -caroteno representó el 94% del total de los carotenoides totales extraídos de *D. salina*, UTEX 1644, al cultivarla a 21500 lux y a 250 UPS.

Las diferencias en el contenido de carotenoides y  $\beta$ -caroteno entre las cepas Araya y Coche de *D. salina* probablemente han sido generadas evolutivamente por las condiciones ambientales estresantes presentes en las zonas de origen. En este sentido, CIFUENTES *et al.* (1992) informaron que las condiciones ambientales de un hábitat

TABLA 3. Resultados de la cromatografía de columna del extracto crudo de carotenoides totales producidos por *D. salina*, cepas Araya y Coche.

Cepas	Fracción	Eluato	Rf	Solventes	Masa (mg) de las fracciones $\pm 0,01$
Araya	1	1-2	0,96 0,57	Eter de petróleo	1,6
	2	3-6	0,56	Eter de petróleo	3,7
	3	7	0,22 0,52	Eter de petróleo	1,0
	4	8-23	0,64	Eter de petróleo/acetona 95/5-90/10	2,9
	5	24-27	0,55	Eter de petróleo/acetona 90/10	0,5
	6	28	0 0,57 0,90	Eter de petróleo/acetona 90/10	1,0
	7	29-31	0 0,57	Eter de petróleo/acetona 90/10	1,1
	8	32-38	0,63	Hexano/acetona 70/30-50/50	1,0
Coche	1	1-3	0,29	Eter de petróleo	0,1
	2	4	0,62 0,74 0,98	Eter de petróleo	1,2
	3	5	0 0,29 0,63	Eter de petróleo	4,7
	4	6-7	0 0,62	Eter de petróleo/acetona 95/5	3,6
	5	8-17	0,62	Eter de petróleo/acetona 95/5 Eter de petróleo/acetona 90/10	8,0
	6	18-28	0 0,63 0,99	Eter de petróleo/acetona 90/10	1,8
	7	29-32	0 0,99	Hexano/acetona 70/30	0,4
	8	34-45	0	Hexano/acetona 50/50	0,4

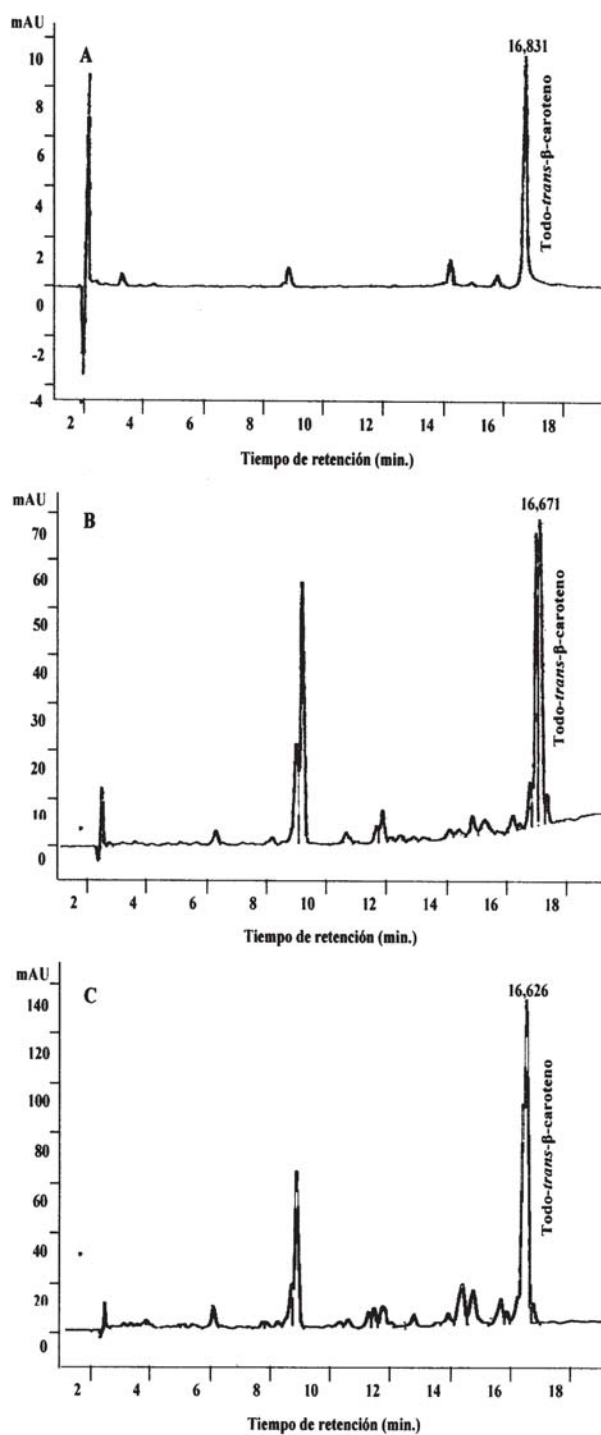


Fig. 2. Cromatogramas por HPLC del patrón de  $\beta$ -caroteno (A), los extractos crudos de carotenoides totales de las cepas Coche (B) y Araya (C) de *Dunaliella salina*.

TABLA 4. Concentración (pg.cel<sup>-1</sup> y porcentaje) de  $\beta$ -caroteno extraído de *D. salina*, cepa Araya y cepa Coche, determinado por HPLC.

Cepas	Carotenoides totales (pg.cel <sup>-1</sup> )	$\beta$ -caroteno (pg.cel <sup>-1</sup> )	$\beta$ -caroteno*	% total $\beta$ -caroteno
Araya	21,5	F1: 0,1404	0,653	39,7
		F2: 1,9353	8,997	
		F3: 3,5522	16,513	
		F4: 2,8153	13,088	
		F5: 0,0901	0,419	
		F6: 0,0031	0,014	
		F7: 0,0002	0,001	
		F8: 0,0001	0,002	
Coche	24,8	F1: 0,2057	0,829	54,3
		F2: 1,4200	5,724	
		F3: 11,4648	46,216	
		F4: 0,2739	1,104	
		F5: 0,1024	0,413	
		F6: 0,0061	0,025	
		F7: 0,0005	0,002	
		F8: 0,0002	0,001	

determinado pueden, en parte, ser las responsables del desarrollo de la carotenogénesis en una cepa particular de *D. salina*. Esta hipótesis se encuentra soportada con nuestros resultados, ya que la cepa Coche fue obtenida del interior de un bloque de sal, mientras que la cepa Araya se aisló de muestras de agua con concentraciones salinas superiores a 30% de NaCl. El resto de las condiciones ambientales (iluminación y temperatura) fueron similares.

Otro factor que pudiera estar involucrado en las diferencias de la producción de carotenoides totales y  $\beta$ -caroteno por parte de las cepas Coche y Araya sería la presencia de diferencias genéticas intraespecíficas, tal y como ha sido reportado en otras cepas de *D. salina* por GONZÁLEZ *et al.* (1999) y GÓMEZ & GONZÁLEZ (2001). Por lo que sería interesante realizar estudios adicionales donde se utilicen métodos moleculares basados en el ADN, para confirmar esta hipótesis.

### CONCLUSIONES

El sistema de solventes que logró extraer mayor cantidad de carotenoides de las cepas Araya y Coche de

*D. salina*, fue acetona/metanol 90/10. *D. salina*, cepa Coche, es capaz de producir mayor cantidad de carotenoides totales que la cepa Araya. El  $\beta$ -caroteno natural producido por las cepas Araya y Coche, al aplicarle CC y CCF, se encuentra en mayor proporción en los eluatos obtenidos con el solvente éter de petróleo. Mediante HPLC se logró separar y cuantificar el  $\beta$ -caroteno presente en la mezcla de carotenoides totales producidos por *D. salina*, cepa Araya y Coche, resultando esta última mayor productora de este pigmento, con una concentración de 54,3%, con relación al contenido de carotenoides totales, lo cual la sugiere como una fuente potencial de  $\beta$ -caroteno natural.

#### AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, proyecto CI.-2-030603-1282/06.

#### REFERENCIAS

- AGUILAR, C., M. GONZÁLEZ, A. CIFUENTES & M. SILVA. 2004. Growth and accumulation of total carotenoids in two strains of *Dunaliella salina* Teod. (Chlorophyceae) from the northern and central coast of Peru. *J. Chil. Chem. Soc.* 49 (1): 69-74.
- BEN-AMOTZ, A. 1987. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* (Volvocales, Chlorophyta). *J. Plant Physiol.* 131: 467-478.
- \_\_\_\_\_, & M. AVRON. 1982. Accumulation of  $\beta$ -carotene in halotolerant algae: Purification and characterization of  $\beta$ -caroteno-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 18: 529-537.
- BOROWITZKA, M. 2005. Carotenoid production using microorganism. In *Single cell oils* (Eds. Z. Cohen & C. Ratledge). Illinois, USA. 124-127.
- \_\_\_\_\_, L. BOROWITZKA & D. KESSLY. 1990. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *J. Appl. Phycol.* 2: 111-119.
- CIFUENTES, A., M. GONZÁLEZ, I. INOSTROZA & A. AGUILERA. 2001. Reappraisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae): growth and pigment content cross a salinity gradient. *J. Phycol.* 37: 334-344.
- \_\_\_\_\_, M. GONZÁLEZ, M. CONEJEROS, V. DELLAROSSA & O. PARRA. 1992. Growth and carotenogenesis in eight strains of *Dunaliella salina* Teodoresco from Chile. *J. Appl. Phycol.* 4: 111-118.
- \_\_\_\_\_, M. GONZÁLEZ, O. PARRA & M. ZÚÑIGA. 1996. Cultivo de Cepas de *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) en diferentes medios bajo condiciones de laboratorio. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 69: 105-112.
- DOMÍNGUEZ, A. 1999. *Obtención de pigmentos a partir de microalgas*. Trab. Grad. Doctorado Facultad de Microbiología y Parasitología. Universidad de Santiago de Compostela, España, 182 pp.
- DUBOIS, E. 2006. *Cultivo de dos cepas de Dunaliella salina (Teodoresco, 1905) provenientes de la costa nor-oriental de Venezuela bajo régimen semicontinuo*. Trab. Grad. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 37 pp.
- FÁBREGAS J., J. ABALDE, C. HERRERO, B. CABEZAS & M. VEIGA. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrients concentrations. *Aquaculture* 42: 207-215.
- \_\_\_\_\_, A. DOMÍNGUEZ, D. GARCÍA, T. LAMELA & A. OTERO. 1998. Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Letters.* 20: 623-626.
- GÓMEZ, J., Z. RAMAZANOV, A. FONTES & G. GARCÍA. 1992. Photosynthetic characteristics of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae, Dunaliellales) in relation to  $\beta$ -caroteno content. *J. Appl. Phycol.* 4: 11-15.
- GÓMEZ, P., A. BARRIGA, A. CIFUENTES & M. GONZÁLEZ. 2003. Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007), and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) Chlorophyta. *Biol. Res.* 36: 185-192.
- \_\_\_\_\_, & M. GONZÁLEZ. 2001. Genetic polymorphism in eight Chilean strains of the carotenogenic

- microalga *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyta). *Biol. Res.* 34: 23-30.
- GÓMEZ, P., M. GONZÁLEZ & J. BECERRA. 1999. Quantity and quality of beta-carotene produced by two strains of *Dunaliella salina* (Teodoresco 1905) from the north of Chile. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 44(4): 463-468.
- GONZÁLEZ, M., P. GÓMEZ & R. MONTOYA. 1999. Comparison of PCR-RFLP analysis of the ITS region with morphological criteria of various strains of *Dunaliella*. *J. Appl. Phycol.* 10: 573-580.
- GUEVARA, M., C. LODEIROS, O. GÓMEZ, N. LEMUS, N. NÚÑEZ, L. ROMERO, A. VÁSQUEZ & N. ROSALES. 2005. Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella* sp. (Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 53: 331-337.
- HEMAISWARAYA, S. & N. DOBLE. 2006. Synergism of natural products in cancer treatment. *Phytother. Res.* 20: 239-240.
- JIMÉNEZ, C. & X. NIEL. 1990. Influence of temperature and nitrogen concentration on photosynthesis of *Dunaliella viridis* Teodoresco. *J. Appl. Phycol.* 2: 309-317.
- LATSCHA, T. 1990. *Carotenoids in animal nutrition: their nature and significance in animal Feeds*. Roche Publication N° 2175. Basel, Switzerland, 110 pp.
- LEAL, E. 1996. *Efecto de algunos factores ambientales sobre la capacidad carotenogénica de una cepa de Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyceae, Dunaliellales). Trab. Grad. Dept. de Biología. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 230 pp.
- LOEBLICH, L. 1982. Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 62: 493-508.
- MARÍN, N., F. MORALES, C. LODEIROS & E. TAMIGNEAUX. 1998. Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. *J. Appl. Phycol.* 10: 405-411.
- MASSYUK, N. 1973. *Morphology, taxonomy, ecology and geographic distribution of the Genus Dunaliella Teod. and prospects for its potencial utilization*. Naukova Dumka, Kiev. URSS. 244 pp.
- MATHEWS-ROTH, M. 1985. Carotenoids and cancer prevention experimental and epidemiological studies. *Pure Appl. Chem.* 57: 717-722.
- MClachlan, J. 1973. Growth media marine. In *Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements*. (Ed. J. Stein). , Cambridge University Press London, U.K. 25-51.
- MENDOZA, H., M. JIMÉNEZ, G. GARCÍA & Z. RAMAZANOV. 1996. Low temperature induced  $\beta$ -carotene and fatty acid synthesis, and ultrastructural reorganization of the chloroplast in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Europ. J. Phycol.* 31: 329-331.
- MORALES, F. 1995. *Efectos de algunos parámetros ambientales sobre las especies alofiticas de microalgas del género Dunaliella (Dunal) Teodoresco, 1905 (Chlorophyta, Volvocales) presentes en la Salinas de Araya, Estado Sucre, Venezuela*. Trab. Grad. Dept. de Biología. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 66 pp.
- MOULTON, T., L. BOROWIZKA & D. VINCENT. 1987. The mass culture of *Dunaliella salina* for  $\beta$ -carotene: From pilot plant to production plant. *Hydrobiology.* 151/152: 99-105.
- \_\_\_\_\_. & M. BURFORD. 1990. The mass culture of *Dunaliella viridis* (Volvocales, Chlorophyta) for oxygenated carotenoids: laboratory and pilot plant studies. *Hydrobiol.* 204/205: 401-408.
- RAJA, R., S. HEMA, D. BALASUBRAMANYAN & R. RENGASAMY. 2007. PCR-Identification of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) and its growth characteristics. *Microbiol. Res.* 162: 168-176.
- RODRÍGUEZ, D. 1999. Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Arch. Latin. Nutric.* 49 (3): 38-51.
- SOKAL, R. & F. ROLF. 1991. *Biometry*. 2nd Ed. W. H. Freeman (Ed.), San Francisco, USA. 859 pp.

STRICKLAND, J. & T. PARSONS. 1972. A practical handbook of sea waters analysis. *Bull. Fish Res. Bd. Canada*. 167: 1-310.

VIDUSSI, F., H. CLAUSTRÉ, J. BUSTILLOS, C. CAILLIAU & J. MARTY. 1996. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton. Separation of chlorophyll *a* from divinyl chlorophyll *a* and zeaxanthin from lutein. *J. Plankton. Res.* 18(2): 237-282.

RECIBIDO: Octubre 2007

ACEPTADO: Mayo 2008