ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ A PREPARATULUI ETANOLIC ÎN BAZA BIOMASEI DE *PORPHYRIDIUM CRUENTUM*

Daniela SADOVNIC, Liliana CEPOI, Ludmila RUDI, Ana VALUŢA, Tatiana CHIRIAC, Svetlana CODREANU, Vera MISCU, Angela COJOCARI
Institutul de Microbiologie şi Biotehnologie, Academia de Ştiinţe a Moldovei, rudilugmila@gmail.com

Abstract. There wasstudied the impact ofantioxidant complex from microalga Porphyridium cruentum biomass on the antioxidant activityof vegetable oilsand their oxidation process. The antioxidant complex was obtained by extracting in 96% ethylalcohol. Antioxidant assay using the radical1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil (DPPH) revealed an increase of the antioxidant activity of oils supplemented with microalgal antioxidant complex. There was determineda decrease (up to 40% for olive oil) in fatty acid oxidation for vegetable oils with microalgal antioxidant extract.

Cuvinte chele: complex antioxidant, Porphyridium cruentum, activitate antioxidantă, ulei vegetal, protecţie antioxidantă

Introducere

În studiul surselor naturale de antioxidanţi, microalgele au ocupat un loc stabil datorită componentelor antioxidante determinat. Microalgele sunt recunoscute surse comerciale de antioxidanţi carotenoizi *(Haematococcus pluvialis, Dunaliella salina)*care sunt aplicaţi în calitate de aditivi în industria alimentară şi farmaceutică [10].

La momentul actual sunt deja informaţii despre utilizarea practică a produselor din microalge. Astfel, antioxidanţii obţinuţi din biomasa algei *Porphyridium cruentum* au fost testaţi în calitate de componente antioxidante în procesarea alimentelor. Aprecierea activităţii antioxidante a extractelor etanolice din biomasa de *Porphyridium cruentum* prin aplicarea modelului β-caroten-linoleat a demonstrat superioritatea lor faţă de antioxidanţii sintetici BHA (hidroxianizol butilat) şi BHT (hidroxitoluen butilat) [8].

Extractele de pigmenţi clorofilieni şi carotenoizi din biomasa microalgei *Chlorella vulgaris* şi de astaxantină din biomasa algei *Haematococcus pluvialis* au fost utilizaţi în calitate de antioxidant în stabilizarea emulsiilor hidro-uleioase. Rezultatele obţinute au determinat posibilitatea aplicării concentraţiilor mici de pigmenţi oranj-roşii în calitate de antioxidant al maionezelor care au potenţialul de a prevenit oxidarea primară şi secundară a produsului [3]. Studii recente au determinat existenţa unor flavanoizi în biomasa microalgelor şi cianobacteriilor [5, 7]. Studiul a 32 de microalge şi cianobacterii a demonstrat impactul conţinutului componentelor fenolice asupra activităţii antioxidante a biomasei [6].

În acest studiu a fost determinat impactul complexului antioxidant, obţinut din biomasa microalgei *Porphyridium cruentum* asupra activităţii antioxidante a uleiurilor vegetale şi asupra procesului de oxidare a lor.

Material şi metode

Microalga *Porphyridium cruentum* a fost cultivată pe mediul mineral VP2 cu durata ciclului de cultivare de 10 zile [9].

Complexul antioxidant din biomasa de *Porphyridium cruentum* AA-Pcr a fost obţinut prin extragere în etanol de 96%. Raportul dintre biomasă şi solvent în procesul de extragere a fost stabilit în cadrul cercetărilor anterioare şi este susţinut de mai mulţi autori, constituind 10 mg biomasă la 1,0 ml soluţie extractantă [2, 7]. Durata de extragere a fost de 12 ore, la temperatura camerei de 18-20^{0}C în condiţii de agitaţie permanentă pe agitator orbital. Extractele au fost separate de biomasă prin centrifugare şi filtrare.

În studiu au fost incluse patru tipuri de uleiuri care se deosebesc după componenţa acizilor graşi şi respectiv după capacitatea de autooxidare şi de incorporare a produsului antioxidant: ulei de in, produs la fabrica „Diveevo", Moscova, Rusia, seria de producere 180912; uleiul de olive IBERICA, produs de Olive Line S.L., Madrid, Spania, seria L:7885; ulei de porumb, produs Unilever, Hamburg, Germania, seria L 315400916; ulei de floarea soarelui, produs la AO „Floarea soarelui", Bălţi, Moldova, seria 29.05.2014/1.

Pentru incorporarea complexului antioxidant *AA-Pcr* în uleiurile vegetale, la 9 ml ulei s-au adăugat 3 ml extract etanolic. Pentru a spori incorporarea antioxidanţilor, amestecul obţinut a fost emulsionat puternic. Separarea uleiului de restul etanolic s-a produs timp de 24 ore la temperatura camerei. Reziduul a fost înlăturat prin decantare.

Activitatea antioxidantă a fost determinată prin metoda reducerii radicalului DPPH (1,1 difenil-2-picril hydrazil) [1]. Pentru determinarea activităţii antioxidante a uleiurilor a fost preparată soluţia în acetonă de 0,6 mM DPPH. Amestecul reagent a fost obţinut din 0,1 ml soluţie ulei în acetonă şi 3,0 ml soluţie DPPH. După 5 min de incubare la temperatura camerei a fost măsurată absorbanţa la 517 nm. Valorile testului antioxidant au fost prezentate în % Inhibiţie DPPH.

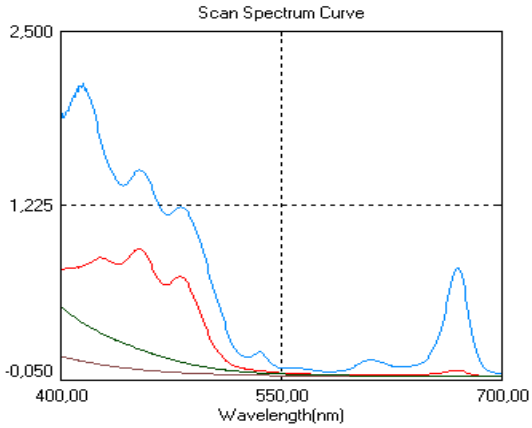
Nivelul de oxidare a uleiurilor a fost stabilit prin testul determinării produselor de reacţie ale acidului tiobarbituric (TBARS) [4]. Valoarea gradului de oxidare al uleiurilor a fost determinată prin conţinutul malondialdehidei (MDA). La probele de ulei (1 ml) s-au adăugat 1 ml acid tiobarbituric 0,67% şi 1 ml acid tricloracetic 15%, după care probele au fost supuse incubării pentru 1 oră la 95^{o}C. După răcirea pe gheaţă 5 min probele au fost centrifugate 15 min la 3000g. Concentraţia complexului malondialdehidei cu acidul tiobarbituric a fost măsurată la 535 nm.

Toate rezultatele prezentate în acest studiu au fost prelucrate statistic cu aprecierea valorilor medii şi a abaterilor standarde în comparaţie cu valorile coeficientului de variere stabilit pentru fiecare metodă în parte. Au fost considerate semnificative diferenţele între valorile obţinute, pentru care $p<0,05$.

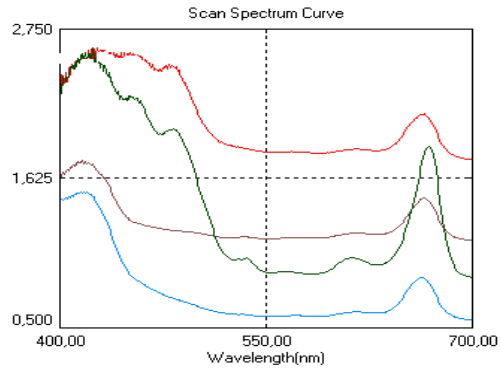
Rezultate şi discuţii

În scopul monitorizării procesului de incorporare a complexului antioxidant microalgal în uleiuri au fost înregistrate spectrele în domeniul vizibil al uleiurilor până la şi după 24 ore de la incorporare. Nivelul de solubilizare a componentelor preparatului antioxidant depinde de conţinutul acizilor graşi polienici şi de raportul lor în componenţa uleiului utilizat.

Spectrele suprapuse după nivelul maximal al absorbanţelor formează şirul constituit din ulei de porumb, ulei de floarea soarelui, ulei de in şi ulei de olive (Figura 4.17), în rezultatul încorporării preparatului antioxidant ***AA-Pcr*** în baza biomasei de *Porphyridium cruentum*, şirul uleiurilor format după principiul creşterii absorbanţei s-a modificat: ulei de porumb, ulei de floarea soarelui, ulei de olive şi ulei de in (Figura 1).



Spectrele uleiurilor vegetale native: 1 – ulei de porumb; 2 – ulei de floarea soarelui; 3 – ulei de in; 4 – ulei de olive



Spectrele uleiurilor vegetale după incorporarea preparatului *AA-Pcr*: 1 – ulei de porumb; 2 – ulei de floarea soarelui; 3 – ulei de olive; 4 –ulei de in

Figura 1. **Spectrele uleiurilor vegetale native şi suplimentate cu complex antioxidant AA-Pcr**

Uleiurile vegetale comercializate pe piaţă sunt foarte variate nu numai după materia primă vegetală şi modul de extragere, dar şi după conţinutul acizilor graşi polienici (Tabelul 1). Conţinutul acizilor graşi ω6 – acidul linolic şi ω3 – acidul

linolenic, precum şi raportul lor determină utilitatea alimentară şi sanogenă a uleiurilor. Acidul oleic, prezent în diferite cantităţi în uleiuri este considerat unul din factorii de protecţie antioxidantă a componentelor liposolubile din ulei.

Tabelul 1.

Conţinutul acizilor graşi în uleiurile selectate [11]

Tipul de ulei	Acizi graşi nesaturaţi, % din suma acizilor graşi				Acizi graşi saturaţi % suma AG	
	C18:3ω 3	C18:2ω 6	ω 3+ω 6	C18:1ω 9	18:0	16:0
Seminţe de in	58	14	72	19	4	5
Floarea soarelui	-	75	75	13	12	-
Porumb	-	59	59	24	17	-
Olive	-	8	8	75	16	-

Cele mai mari valori ale absorbanţei au fost înregistrate pentru uleiurile de in şi olive, care se deosebesc după conţinutul acizilor graşi. Pentru uleiul de in este specific conţinutul mare de acid linolenic (C18:3ω3), iar pentru uleiul de olive cel al acidului oleic (C18:1ω9).

Raportul cantitativ al aciziolor graşi din uleiuri determină şi activitatea lor antioxidantă (figura 2). Activitatea antioxidantă a uleiurilor native de porumb şi floarea soarelui este de 8-10 % inhibiţie DPPH, iar activitatea antioxidantă a uleiurilor native de in şi olive este mai mare cu valorile testului DPPH de 13-14 % inhibiţie. Pentru uleiurile vegetale suplimentate cu complexul antioxidant AA-Pcr, activitatea antioxidantă are valori majorate (figura 2). Valorile testului antioxidant au crescut cu 24-38%. Astfel a fost demonstrată încorporarea complexului antioxidant în structura uleiurilor.

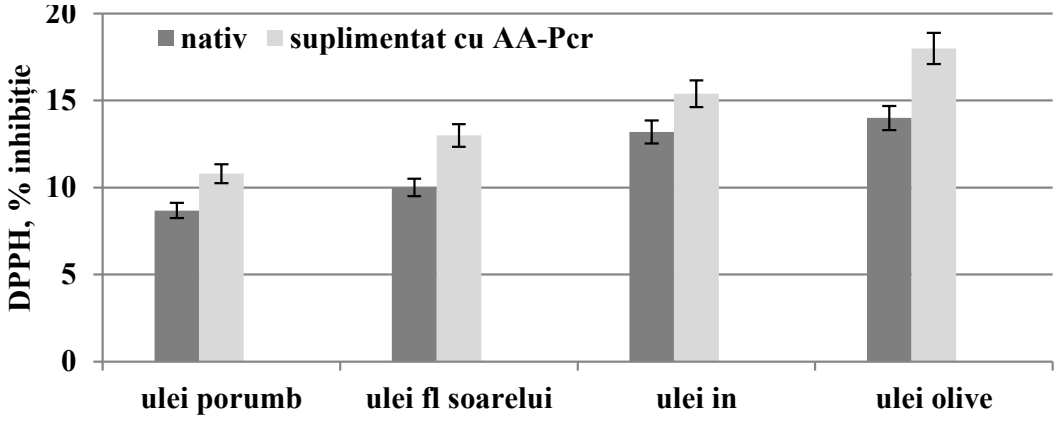


Figura 2. **Activitatea antioxidantă (% Inhibiţie DPPH) a uleiurilor vegetale native şi suplimentate cu complexul antioxidant AA-Pcr**

Pentru a determina implicarea antioxidanţilor din preparatul antioxidant obţinut pe baza biomasei de *Porphyridium cruentum* în protecţia oxidativă a uleiurilor a fost efectuat testul TBARS.

Rezultatele determinării produselor de reacţie ale acidului tiobarbituric sunt prezentate în Figura 3.

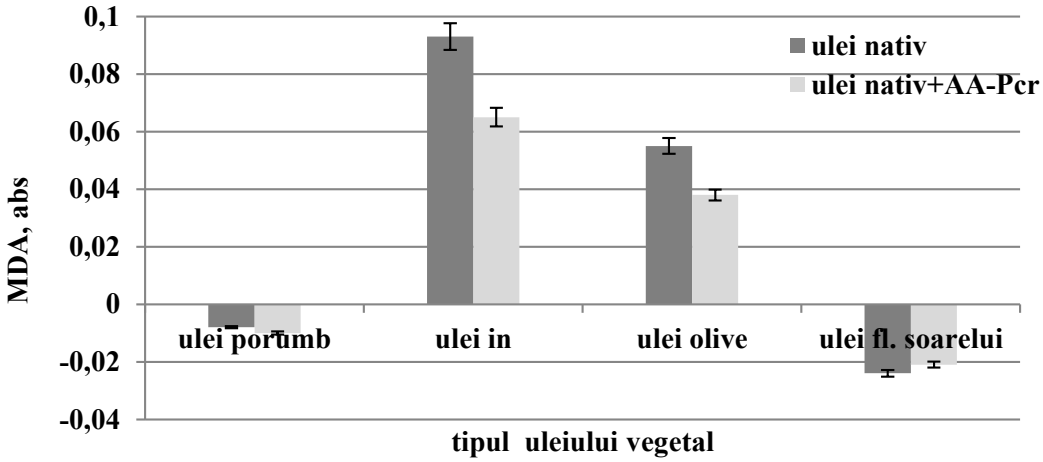


Figura 3. **Testul determinării produselor de reacţie ale acidului tiobarbituric (MDA, abs) în uleiurile vegetale native şi cu adaos de antioxidant AA-Pcr**

Pentru uleiurile de porumb şi floarea soarelui, valorile negative ale testului TBARS, care nu sunt semnificative, indică sigur prezenţa a antioxidanţilor puternici, care stabilizează structura acidului linolic. Pentru uleiurile de in a fost stabilită cea mai mare valoare a testului TBARS, un rezultat veridic, confirmat prin conţinutul sporit al acidului linoleic. Complexul antioxidant microalgal, încorporat în uleiurile de in şi olive a redus valoarea testului cu 40%.

Prin urmare, complexul antioxidant în baza biomasei de *Porphyridium cruentum* sporeşte activitatea antioxidantă a unor uleiuri vegetale şi reduce oxidarea lor.

Bibliografie

1. Brand-Williams W. et al. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie. In: Food Science and Technology, 1995, v. 28, p. 25-30.
2. Cepoi L., Rudi L., Miscu V., Cojocari A., Chiriac T., Sadovnic D. Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* by various methods. In: The Annals of Oradea University, Biology Fascicle", 2009, Tom XVI/2, p. 43-48.

3. Gouveia L., Raymundo A., Batista AP., Sousa I., Empis E. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions.Eur Food Res Technol, 2006, 222: 362–367.
4. Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK**.** Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta, 1999, 207**,**604–611.
5. Klejdus B, Lojková L, Plaza M, Snóblová M, Stěrbová D. Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid ex-traction followed by fast chromatography with tandem mass spec-trometry. J Chromatogr, 2010, A 1217:7956 – 7965.
6. Koen Goiris, Koenraad Muylaert, Ilse Fraeye, Imogen Foubert, Jos De Brabanter, Luc De Cooman. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. J Appl Phycol, 2012, 24:1477–1486.
7. Li H.B. et al. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. In. Food Chem, 2007, vol. 102, p.771–776.
8. Rodriguez-Garcia I., Guil-Guerrero J.L. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. In: Food Chemistry, 2008, vol. 108, p. 1023–1026.
9. Rudic, V. ş.a. Ficobiotehnologie –cercetări fundamentale şi realizări practice. Chişinău: Elena VI, 2007, 362 p.
10. Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E , Isambert A. Commercial applications of microalgae. J Biosci Bioeng. 2006, 101:87–96.
11. Strayer D. et al. Food fats and oils. In: Washington, 2006, http://www.iseo.org/foodfats.htm