



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE MICROALGAS
AISLADAS DE SISTEMAS LACUSTRES DE ÁREAS PROTEGIDAS Y
CONSERVADAS DEL ECUADOR**

Autora

María Rafaela Holguín Rosero

**Año
2019**



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE MICROALGAS
AISLADAS DE SISTEMAS LACUSTRES DE ÁREAS PROTEGIDAS Y
CONSERVADAS DEL ECUADOR

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología.

Profesor Guía
MSc. María Cristina Guamán Burneo

Autora
María Rafaela Holguín Rosero

Año
2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Evaluación del potencial antioxidante de microalgas aisladas de sistemas lacustres de Áreas Protegidas y Conservadas del Ecuador, a través de reuniones periódicas con la estudiante María Rafaela Holguín Rosero, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

María Cristina Guamán Burneo
Máster en Microbiología Industrial
CI: 1103950513

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber haber revisado este trabajo, Evaluación del potencial antioxidante de microalgas aisladas de sistemas lacustres de Áreas Protegidas y Conservadas del Ecuador, de la estudiante María Rafaela Holguín Rosero, en el semestre 201920, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

José Miguel Álvarez Suarez
Doctor en Alimentación y Salud
C.I: 1756653372

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

María Rafaela Holguín Rosero

CI: 1721357315

AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos a Cristina Guamán por ser mi guía y ejemplo como investigadora y como persona. Agradezco a Alejandra Cruz y Nory González por la confianza y el apoyo que me brindaron para llevar a cabo este trabajo.

A Genoveva Granda por su orientación y por transmitirme sus conocimientos.

A mi amigo José Ignacio por ser alegría para mí en esta etapa

DEDICATORIA

En primer lugar a Dios, por la fortaleza.
A mis padres Fabián, Ivett y mi hermana
Monse por su apoyo incondicional y
motivación en el trayecto de mi carrera.
A mi familia y amigos que siempre
confiaron en mí.

RESUMEN

Los antioxidantes son compuestos beneficiosos para la salud al prevenir los efectos negativos de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) sobre las funciones fisiológicas normales. De manera natural se encuentran en frutas, verduras y alimentos de consumo cotidiano. Recientemente, ha surgido un interés en la búsqueda de antioxidantes en otras fuentes de origen natural. Es por esto que, en los últimos años las microalgas han captado la atención ya que son capaces de sintetizar compuestos bioactivos gracias a las estrategias bioquímicas y moleculares que han desarrollado para sobrevivir en condiciones de estrés. Debido al escaso conocimiento sobre microalgas en el Ecuador, se ha venido investigando la biodiversidad y las aplicaciones biotecnológicas que confieren este grupo de microorganismos para la ciencia. A partir de aislados microalgales de varias Áreas Protegidas y Conservadas del Ecuador, se realizó en la presente investigación una evaluación de 129 aislados de microalgas de la Colección de Ficología-UDLA, de las que se seleccionaron 19 cepas o Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) diferentes a partir de la identificación molecular. Se evaluó el perfil químico a partir de extractos metanólicos a través del estudio del contenido total de fenoles, flavonoides, taninos, antocianinas y clorofila *a*. Del mismo modo, se evaluó la capacidad de captación del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y el poder reductor mediante el ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Para la determinación del contenido de vitamina C y los carotenoides beta-caroteno y luteína se empleó el método de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC). Los resultados de la correlación entre el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante atribuyen a estos compuestos la actividad antioxidante de las microalgas. De los 19 aislados, *Chlorella vulgaris* presentó la mayor concentración de flavonoides; *Acutodesmus obliquus* de taninos; *Parachlorella kessleri* destaca por su contenido de antocianinas y la cepa que presentó mayor concentración de clorofila *a* fue *Stichococcus* sp. A partir de los ensayos espectrofotométricos, se determinó que *Scenedesmaceae* sp. es una cepa prometedora al contener el mayor

contenido polifenólico y capacidad reductora por lo que se sugiere complementar los ensayos de HPLC. De manera general, todas las cepas analizadas presentan igual o mayor concentración de carotenoides en comparación a frutos, destacándose *Scenedesmus vacuolatus* y *Chlorella vulgaris*. Finalmente, se determinó que *Chlorella sorokiniana* contiene la mayor concentración de vitamina C.

ABSTRACT

Antioxidants are beneficial for human health since they prevent the negative effects of reactive oxygen species on normal physiological functions. They are naturally found in fruits and vegetables. Recently, there has been an interest in the search for antioxidants in other sources of natural origin. Thus, in recent years, microalgae have attracted attention because they are capable of synthesizing bioactive compounds thanks to the biochemical and molecular strategies they have developed to survive in stressful conditions. Due to the limited knowledge about microalgae in Ecuador, the biodiversity and biotechnological applications that confer this group of microorganisms for science have been investigated. From the microalgal isolates of several Protected Areas and conserved from Ecuador, an evaluation of 129 microalgal isolates was carried out in the present investigation, from which 19 strains or different Operational Taxonomic Units (OTUs) were selected from the molecular identification. The chemical profile was evaluated from methanol extracts through the study of the total content of phenols, flavonoids, tannins, anthocyanins and chlorophyll *a*. Likewise, the uptake capacity of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and the reducing power was evaluated by the FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assay. To determine the content of vitamin C and carotenoids (beta-carotene and lutein), the method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used. The results of the correlation between total phenolic content and antioxidant capacity attribute to these compounds the antioxidant activity of microalgae. Of the 19 isolates, *Chlorella vulgaris* had the highest concentration of flavonoids; *Acutodesmus obliquus* of tannins; *Parachlorella kessleri* stands out for its content of anthocyanins and the strain with the highest concentration of chlorophyll *a* was *Stichococcus* sp. from the spectrophotometric assay, it was determined that *Scenedesmaceae* sp. is a promising strain since it contains the highest polyphenolic content and reducing capacity, which is why it is suggested to complement the HPLC assays. In general, all the strains analyzed have the same or higher concentration of carotenoids compared to fruits, standing out

Scenedesmus vacuolatus and *Chlorella vulgaris*. Finally, it was determined that *Chlorella sorokiniana* contains the highest concentration of vitamin C

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción.....	3
1.1. Introducción	3
1.2. Planteamiento del problema.....	8
1.3. Objetivo general y objetivos específicos	9
1.4. Justificación de la investigación	10
2. Capítulo II. Marco Teórico.....	11
2.1. Compuesto Bioactivo.....	11
2.2. Estrés oxidativo	13
2.3. Antioxidantes	14
2.4. Composición química	15
2.4.1. Pigmentos.....	15
2.4.2. Polifenoles	19
2.4.3. Vitamina C	22
2.4.4. Identificación y Clasificación de Microalgas.....	23
3. Capítulo III. Procedimientos	24
3.1. Sitios de muestreo	24
3.1. Materiales y métodos para la obtención de los datos.....	26
3.1.1. Reactivación de aislados	26
3.1.2. Purificación y escalamiento de aislados	27
3.1.3. Identificación molecular de microalgas	27
3.1.4. Estudio de compuestos bioquímicos	30
3.1.5. Determinación de la capacidad de captación de radicales libres mediante el ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	35
3.1.6. Determinación de la capacidad reductora mediante el ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	36
3.1.7. Análisis Estadístico.....	37

4. Capítulo IV. Resultados y discusión.....	37
4.1. Identificación molecular y cepas seleccionadas	37
4.2. Ensayos espectrofotométricos	38
4.2.1. Polifenoles	38
4.2.2. Correlación entre actividad antioxidante y el contenido fenólico...	42
4.2.3. Flavonoides	49
4.2.4. Taninos.....	51
4.2.5. Antocianinas	54
4.2.6. Clorofila a.....	55
4.3. Ensayos mediante HPLC	61
4.3.1. Carotenoides	61
4.3.2. Vitamina C	66
5. Conclusiones y Recomendaciones.....	70
5.1. Conclusiones	70
5.2. Recomendaciones.....	70
REFERENCIAS.....	67
ANEXOS.....	77

1. Capítulo I. Introducción

1.1. Introducción

Las microalgas son un grupo diverso de organismos unicelulares que comprenden protistas eucariotas, cianobacterias procariotas y algas verde-azuladas que han ido evolucionando desde hace 3 000 millones de años, adaptándose a diferentes hábitats como base de la cadena trófica y producen la mitad del oxígeno atmosférico en la tierra (Barsanti & Gualtieri, 2006). Crecen en una amplia gama de hábitats incluyendo ambientes salinos y de agua dulce, aguas residuales y suelos (Yan, Fan, & Xu, 2013). Son fundamentalmente autótrofas y fotosintéticas, generando compuestos de carbono complejos. Sin embargo, algunas microalgas se han convertido heterótrofas absorbiendo moléculas orgánicas complejas por organotrofia o heterotrofia (Bellinger & Sigee, 2010).

A pesar de su gran biodiversidad, ésta no ha sido totalmente explorada ya que de las más de 50 000 especies identificadas, tanto en océanos como en cuerpos de agua dulce, sólo 30 000 han sido estudiadas (Rizwan, Mujtaba, Memon, Lee, & Rashid, 2018). Las microalgas ya han sido utilizadas por los seres humanos durante miles de años como un suplemento nutricional debido al alto contenido proteico de su biomasa, por sus carbohidratos, fibras y enzimas. Además, son capaces de sintetizar vitaminas (A, B1, B2, B6 y C) y ser fuentes naturales de minerales como el yodo, hierro, niacina, potasio, calcio y magnesio. En la actualidad se encuentran entre las principales fuentes de alimento en países asiáticos especialmente China, Corea y Japón. La acuicultura y la industria de nutracéuticos también han aprovechado estas características (Sathasivam, Radhakrishnan, Hashem, & Abd_Allah, 2017).

A través de la historia, la atención al cultivo de microalgas se centró al comienzo para el estudio de problemas prácticos de la fotosíntesis y los

productos de su metabolismo (Prescott, 1978). Posteriormente, después de observar su potencial, determinados géneros de microalgas fueron utilizados para el ensayo y detección de vitaminas y sustancias capaces de regular múltiples procesos biológicos (proliferación celular, metástasis, apoptosis en células cancerosas) y han sido probadas en cultivo de tejidos (Suh et al., 2017; Talero et al., 2015). Inclusive algunas de las investigaciones sobre cáncer han involucrado estudios de fisiología y reproducción de células microalgales (Suh et al., 2017). Sin embargo, durante la última década la tecnología basada en microalgas ha ido evolucionando para la producción renovable de productos más refinados y de mayor valor como isótopos estables, ácidos grasos poliinsaturados (omegas 3 y 6), carotenoides, ficobiliproteínas, polisacáridos y ficotoxinas. Los beneficios de los fitoquímicos extraídos a partir de microalgas que se han reportado, de manera general, incluyen una mejora del sistema inmunológico, funcionan también como pre y probióticos, reducen las infecciones virales, la aparición del cáncer, los niveles de azúcar en sangre además de poblaciones bacterianas y, por otro lado, aumentan la concentración de hemoglobina (Levine & Joel, 2000).

Además de estos biocompuestos con aplicaciones farmacológicas, varios estudios se han centrado en la producción de biocombustibles de tercera generación y el tratamiento de aguas residuales utilizando consorcios de microalgas (Del Campo et al., 2000; Khanra et al., 2018). También, a partir de los biopolímeros ácido poliláctico (PLA) y bio-polietileno producidos por estos microorganismos se fabrican agentes espesantes y floculantes útiles para el tratamiento de aguas residuales o acondicionamiento de suelos y como estabilizadores de piensos ("oilgae," n.d.). A partir de los carbohidratos de especies del filo Rhodophyta o algas rojas se produce carragenos para la preparación de medios de cultivo, como sustituto de la pectina, gelatina o almidón en la industria alimentaria y como estabilizadores de emulsiones en la cosmetológica (Hahn, Kelly, Muffier, Tippkötter, & Ulber, 2011; Usov, 2011). Por otra parte, el alginato producido por las mismas microalgas, está siendo

utilizado en la ingeniería de tejidos o como material de encapsulación (Hahn et al., 2011). Otro ejemplo de productos refinados a partir de microalgas es la producción de ácido docosahexaenoico (DHA), el cual se emplea en fórmulas infantiles y alimentos en general (Barclay & Apt, 2013).

En la actualidad, los pigmentos son empleados como nutracéuticos antioxidantes y constituyen los productos más comercializados a partir de microalgas. Esto se debe a que el sector alimentario se ha visto en la necesidad de encontrar alternativas naturales de antioxidantes para reemplazar a los sintéticos (Cirulis, Scott, & Ross, 2013). Estudios han demostrado que las microalgas presentan altas capacidades antioxidantes, no únicamente por el contenido de carotenoides sino que también se les atribuye a los compuestos fenólicos presentes (Goiris et al., 2012a).

Los géneros que se cultivan mayormente a gran escala son: *Arthrospira*, comercialmente conocida como *Spirulina*, debido a que se ha reportado que produce esteroides como el clionasterol, el cual se utiliza en tratamientos de prevención de enfermedades cardiovasculares, así como también pigmentos con capacidades antioxidantes para proteger contra el estrés oxidativo. Particularmente, *Spirulina platensis* y *Spirulina máxima* se emplean como suplemento para mejorar el sistema inmunológico, como prebiótico, para el tratamiento de artritis, anemia, diabetes y cáncer (Rizwan et al., 2018). Ha sido explotado como suplemento nutricional debido a que entre el 50-70% de su peso seco constituye de proteínas, supe además con la mayoría de aminoácidos esenciales y no esenciales, posee un alto contenido de beta-caroteno y es la única fuente vegetal de la vitamina B12 (Mohan, Misra, Srivastav, & Umapathy, 2014). En Ecuador se solía producir a nivel industrial y comercializar *Spirulina platensis* en polvo y comprimidos con fines nutracéuticos (“Andes Spirulina,” 2016). La industria alimentaria ha aprovechado el alto rendimiento de producción de ficocianinas de estas

cianobacterias (14% de su peso seco) para emplearlas como colorante azul (Gangl et al., 2015).

Por otro lado, el género *Chlorella* se emplea para la producción de suplementos alimenticios por presentar un alto contenido proteico (hasta el 58% de su peso seco). En el sector de la salud se utilizan extractos de *Chlorella* como el beta-glucano, el cual actúa como estimulador del sistema inmune, reduciendo radicales libres y lípidos en sangre. A la clorofila extraída de estos microorganismos se le han atribuido beneficios a la salud como estimulante del sistema inmune y detoxificante de la sangre e hígado (Kulkarni & Nikolov, 2018). Se comercializan productos a partir de *Chlorella* para aumentar los niveles de hemoglobina y bajar los de azúcar y colesterol. También otros que actúan como factores de crecimiento de bacterias ácido lácticas en el cuerpo (Rizwan et al., 2018).

El género marino *Dunaliella* representa otra microalga de interés comercial la cual se cultiva a nivel industrial y es considerada la materia prima por excelencia para la producción sostenible de beta-caroteno, un precursor de vitamina A, ya que representa aproximadamente el 13% de su peso seco (Rammuni, Ariyadasa, Nimarshana, & Attalage, 2019). Estos compuestos juegan un papel importante en el control de las especies reactivas del oxígeno y contribuyen de manera significativa a la capacidad antioxidante de las microalgas. Se los emplea como aditivos en alimentos y piensos, en cosméticos como tinte color naranja y en la manufactura de suplementos de vitamina C (Goiris et al., 2012).

Finalmente, *Haematococcus* tiene una importancia en la industria gracias a la producción de astaxantina (hasta 7% de su peso seco). Este pigmento es considerado como el antioxidante más poderoso de la naturaleza por lo que se

utiliza como suplemento alimentario y en tratamientos médicos para captar eficientemente los radicales libres del cuerpo humano para desintoxicarlo y prevenir inflamaciones crónicas, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Rammuni et al., 2019).

En cuanto a las cianobacterias, éstas se caracterizan por ser fuente de una amplia gama de metabolitos secundarios bioactivos y tóxicos denominadas cianotoxinas. Estas moléculas se dividen de acuerdo con su función biológica y pueden ser: hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas y toxinas con potencial irritante. Son de importancia en la industria ya que actúan como compuestos alelopáticos; diferentes productos son comercializados como herbicidas, insecticidas y alguicidas. Biocompuestos del género *Nostoc* (p.ej. nostociclámida, nostocina A y nostocarbolina) son ampliamente utilizados para tratar los florecimientos nocivos de algas (Rajneesh, Singh, Pathak, & Sinha, 2017).

En el Ecuador se han realizado algunos estudios sobre la biodiversidad de los principales géneros de microalgas y cianobacterias provenientes de sistemas lacustres de áreas protegidas de los Andes y Amazonía y son presentadas en un catálogo que permite su identificación morfológica (Guamán-Burneo & González Romero, 2016). En estudios taxonómicos de flora de diatomeas, un grupo de microalgas, en la reserva faunística Cuyabeno se han encontrado nuevas especies de estos microorganismos (Miller, Kannan, & Colinvaux, 1984).

En cuanto a identificaciones de género y especies utilizando herramientas moleculares, se han publicado estudios del género *Chlorella*, colectadas de la región andina del país para el estudio de sus propiedades antioxidantes con aplicaciones industriales (Tirado et al., 2017). De igual manera, estudios se han

enfocado principalmente en la biorremediación de aguas residuales y tratamiento del estiércol de ganado, gracias a la capacidad de estos microorganismos para eliminar el nitrógeno y el fósforo (Pachacama et al., 2016).

1.2. Planteamiento del problema

El surgimiento de nuevas enfermedades y el desarrollo de resistencias contra los fármacos comúnmente utilizados han impulsado a la prospección de nuevos biocompuestos. En los últimos 70 años alrededor de 28 000 compuestos activos han sido aislados a partir de organismos acuáticos, principalmente esponjas y ascidias, debido a los potentes compuestos naturales con potencial farmacéutico que poseen como terpenos, esteroides, alcaloides, policétidos, entre otros (Martínez Andrade, Lauritano, Romano, & Ianora, 2018). No obstante, de entre los quince mil metabolitos marinos conocidos, aproximadamente treinta están siendo probados en fases. Entre los obstáculos que presenta el desarrollo de estos fármacos se encuentra la dificultad de cultivar los organismos productores y de purificar dichos compuestos (De la Calle, 2007).

Existen varios reportes de la actividad antioxidante de los pigmentos a partir de extractos lipofílicos e hidrofílicos de los géneros *Botryococcus*, *Phaeodactylum*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Nostoc*, *Spirulina* y *Haematococcus*. Sin embargo, existe escasa información sobre la presencia de los compuestos fenólicos en estos microorganismos, indicando protocolos para su determinación solamente en plantas, más no en microalgas (Goiris et al., 2015).

El consumo de antioxidantes ha ganado importancia debido a su rol en la prevención de enfermedades causadas por el estrés oxidativo. Los estudios epidemiológicos han demostrado que existe una asociación positiva significativa entre la ingesta de frutas y verduras con sus respectivos fitoquímicos con poder

antioxidante y la tasa reducida de mortalidad por enfermedades cardíacas, cánceres comunes y otras enfermedades degenerativas, así como el envejecimiento (Kaur & Harish, 2000). Sin embargo, estudios han atribuido posible toxicidad y carcinogenicidad a los antioxidantes químicos que se emplean generalmente en la industria alimenticia como el hidroxilo tolueno butilado (HTB), hidroxianisolbutilado (HAB), terbutil hidroquinona (TBHQ), y galato de propilo (Shahidi, 2016). Es por esto que, la búsqueda de estos fitoquímicos naturales se ha vuelto crucial dentro de la industria. Las microalgas en este contexto han sido consideradas como candidatos promisorios para la producción de diferentes compuestos fenólicos y antioxidantes (Morowvat & Ghasemi, 2016).

Como se ha visto, la diversidad de las microalgas con potencial biotecnológico resulta sorprendente en varios niveles; sin embargo existe un acuerdo general de que muchas no han sido descritas aún (Andersen, 2013). Por ende, este estudio busca identificar molecularmente nuevas cepas de microalgas provenientes de sistemas lacustres del Ecuador con potencial para producir antioxidantes naturales con potencial uso en la industria farmacéutica.

1.3. Objetivo general y objetivos específicos

General

Caracterizar las propiedades químicas y antioxidantes de microalgas seleccionadas de la Colección de Ficología – UDLA (CFE-UDLA) aisladas de sistemas lacustres de Áreas Protegidas y conservadas del Ecuador.

Específicos

- Identificar los aislados de microalgas mediante herramientas moleculares.
- Determinar los compuestos bioactivos: fenoles totales, flavonoides, beta-carotenos, luteína, vitamina C, clorofila *a*, taninos y antocianinas

presentes en las microalgas aisladas de los sistemas lacustres de Áreas Protegidas y Conservadas del Ecuador.

- Determinar la capacidad antioxidante de las microalgas aisladas de los sistemas lacustres de Áreas Protegidas y Conservadas del Ecuador.

1.4. Justificación de la investigación

El Ecuador, especialmente la subregión andina, debido a sus características biogeográficas permite una gran diversidad de ecosistemas, mismos que albergan una amplia riqueza biológica y genética (Estrella, Manosalvas, Mariaca, & Ribadeneira, 2005). La amplia variedad de climas, suelos, vegetación y fauna silvestre, a pesar de su extensión territorial relativamente pequeña, ofrecen una diversificación de sustratos para el crecimiento de diferentes especies de microalgas. No obstante, la biodiversidad de estos microorganismos ha sido escasamente estudiada en nuestro país. Como consecuencia, las potenciales propiedades que cada cepa puede presentar y favorecer a la industria biotecnológica, alimentaria, farmacéutica, nutracéutica y cosmética, aún son desconocidas por la ciencia (Guamán-Burneo & González Romero, 2016). Por esta razón, este estudio representa una evaluación de los posibles usos potenciales para la industria farmacéutica a partir de un recurso genético aún inexplorado en el Ecuador.

Las microalgas deben ser estudiadas con mayor profundidad debido a la habilidad que poseen de habitar ambientes extremos gracias a los mecanismos de defensa que han ido desarrollando a lo largo de alrededor 3 000 millones de años. Estas condiciones han favorecido la producción de metabolitos secundarios, los cuales han sido evaluados por sus actividades farmacológicas y nutracéuticas tales como alelopáticas, antiinflamatorias, anticancerígenas, antidiabéticas, antiangiogénicas, antipalúdicas, antioxidantes, además de propiedades antibacterianas y antivirales (Levine & Joel, 2000). Estos microorganismos producen además varias clases de flavonoides como

isoflavonas, flavanonas, flavonoles y dihidrocalconas, comprobando así que, si bien son organismos evolutivamente más primitivos que las plantas terrestres, son capaces de producir polifenoles relativamente más complejos (Kováčik, Klejdus, & Bačkor, 2010). Además, los carotenoides naturales como los extraídos a partir de microalgas son ricos en isómeros biológicamente activos y presentan una mayor estabilidad en comparación a los carotenoides sintéticos (Mäki-Arvela, Hachemi, & Murzin, 2014). Es por esto que, científicos e investigadores han enfocado sus estudios en las microalgas ya que representan una alternativa viable debido a la facilidad de su colecta, aislamiento, cultivo, cosecha y extracción de dichos metabolitos de interés de origen natural (Levine & Joel, 2000; L. Liu, Pohnert, & Wei, 2016).

De igual manera, prevalece la necesidad de mantener y actualizar la Colección de Ficología del Ecuador, así como también complementar la identificación de estos microorganismos a nivel molecular. La conservación de estas especies en colecciones de cultivos y stocks genéticos es importante debido a que las comunidades naturales de importancia ficológica son vulnerables y las consecuencias de su posible extinción debido a la contaminación y al cambio climático, pueden alterar significativamente los ecosistemas acuáticos (Norton, Melkonian, & Andersen, 1996). En el Ecuador, es oportuno complementar los estudios previamente realizados por Guamán-Burneo & González Romero (2016), identificando los aislados no sólo a nivel morfológico sino molecular, permitiendo evidenciar la relación filogenética entre las especies, su biodiversidad y finalmente su potencial biotecnológico.

2. Capítulo II. Marco Teórico

2.1. Compuesto Bioactivo

El término compuesto bioactivo se refiere a una sustancia o compuesto presente en alimentos que puede ser o no esencial (ej. vitaminas) y que presenta algún efecto biológico en la salud humana más allá de los efectos nutricionales (Segura Campos, 2019). Normalmente, ocurren en cantidades pequeñas, no obstante tienen la capacidad de presentar efectos potentes tanto positivos como negativos. Sin embargo, el término “efecto bioactivo” suele estar asociado al efecto positivo de la actividad (Gupta, Tuohy, & O’Donovan, Anthonia Mohtashim, 2015).

Además de su importante contribución a la capacidad antioxidante a través de mecanismos como el secuestro de radicales libres, inhibición de la producción de peróxido de hidrógeno y la activación de mecanismos endógenos de defensa y la quelación de metales, otros mecanismos pueden ser los responsables de su efecto protector. Pueden ser clasificados en tres principales grupos: compuestos fenólicos (ej. flavonoides, quercetina), terpenoides (ej. carotenoides, esteroides) y compuestos sulfurados (Apetrei, 2016).

Las microalgas son capaces de sintetizar varios compuestos bioactivos con alto valor agregado mientras se encuentren bajo condiciones óptimas y controladas de cultivo. Por esto es relativamente simple mantener la composición química y estructural de dichos compuestos a lo largo de los varios periodos de cosecha (De Jesus Raposo, De Morais, & De Morais, 2015). Ejemplos de éstos son ácidos grasos, esteroides, carotenoides, polisacáridos, vitaminas, ficobiliproteínas, clorofilas, lectinas, aminoácidos de tipo micosporino, compuestos halogenados, policétidos, toxinas, ácido algínico y carragenina que pueden ser aprovechados por diferentes industrias como la farmacéutica, cosmetológica y en la alimentaria como aditivos o ingredientes (Sathasivam et al., 2017). Esto debido a la versatilidad que presentan, ya que tienen propiedades antioxidantes, antivirales, antibacterianos, anti fúngicos, antiinflamatorios, antitumorales y animalarios. Inclusive, se estima que

diversidad de metabolitos secundarios y basales producidos por algas es hasta diez veces mayor a comparación con las plantas (Fu et al., 2017).

En la actualidad, son las proteínas unicelulares de las microalgas el producto más importante utilizado como biocompuesto activo en alimentos y para propósitos nutraceuticos en general (Sathasivam et al., 2017). Sin embargo, especies químicas como los pigmentos, ácidos grasos, ficoeritrina, fucoxantina y beta-glucanos se están consolidando en el mercado de compuestos bioactivos con diferentes aplicaciones a través de un enfoque de biorrefinería (Jacob-Lopes et al., 2019).

2.2. Estrés oxidativo

El metabolismo celular bajo condiciones fisiológicas normales produce especies reactivas del oxígeno (ERO), las cuales son equilibradas por el sistema antioxidante de defensa. Sin embargo, cuando existe una excesiva cantidad de ERO esta homeostasis se pierde y resulta en estrés oxidativo. Los principales daños provocados por estos compuestos constituyen las bases moleculares de diferentes enfermedades y son; la peroxidación lipídica, el daño oxidativo al ADN, a los fosfolípidos de las membranas y proteínas (Ballard, Roberto, & Junior, 2019).

Los radicales libres son producidos por factores endógenos tales como la respiración natural y factores exógenos como el metabolismo de materiales extraños al cuerpo, el tabaco y la radiación UV (S.-K. Kim, 2015). Las ERO, un tipo de radical libre, son moléculas o fragmentos moleculares con uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos. Esta condición es la que le confiere un nivel de reactividad, inclusive mayor que el oxígeno molecular, que también les permite existir de manera independiente por cortos períodos de tiempo (Londoño, 2012). Se producen en varias formas de oxígeno activado: anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, oxígeno singlete y el

radical del óxido nítrico. Estas moléculas son capaces de provocar daño oxidativo de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos incluyendo el ADN, e inducir inflamación o lesionar órganos (S.-K. Kim, 2015). Tanto el estrés oxidativo como la actividad de las ERO se encuentran asociadas con varias enfermedades degenerativas, cáncer, mal funcionamiento cardiovascular, envejecimiento, cataratas, reumatismo y enfermedades auto inmunes además del envejecimiento (Kaur & Harish, 2000).

Su mecanismo de acción consiste en capturar los electrones que necesitan para estabilizarse a partir de las moléculas más cercanas. Esto conduce a una reacción en cadena debido a que la molécula que ha sido atacada; es decir, que ha perdido un electrón, se convierte en un radical libre. Una vez iniciado este proceso, la peroxidación lipídica inicia, desintegrandando la membrana celular u oxidando otros componentes celulares provocando la disrupción celular (Kaur & Harish, 2000).

2.3. Antioxidantes

Los antioxidantes son macromoléculas biológicas con capacidad de proteger organismos o sus compuestos celulares contra agentes oxidantes (Morowvat & Ghasemi, 2016). Pueden inhibir o retardar pero no prevenir completamente la oxidación. Existen dos categorías básicas de antioxidantes; sintéticos y naturales los cuales exhiben tres principales mecanismos para la protección antioxidante de las macromoléculas a través de: 1) de ruptura de la cadena de radicales libres 2) quelante de iones metálicos 3) captador del oxígeno singlete (Okezie I & Cuppett, 1997).

Los antioxidantes también pueden actuar activando genes para la regulación de enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa y la peroxidasa lipídica (De Jesus Raposo et al., 2015). Estas defensas de tipo enzimático son

cruciales debido a que son las encargadas de mitigar la toxicidad de los radicales libres cuando el suministro de moléculas antioxidantes se agota (Ahmad, 2012).

Las microalgas al ser organismos que están constantemente expuestos a condiciones de estrés, han desarrollado sistemas eficientes de protección contra las especies reactivas del oxígeno y radicales libres (Gouveia, Batista, Sousa, Raymundo, & Bandarra, 2008). Es por esto que la biomasa microalgal es considerada un sistema antioxidante multicomponente el cual resulta mucho más efectivo debido a las interacciones entre estos compuestos antioxidantes (Sathasivam et al., 2017)

2.4. Composición química

2.4.1. Pigmentos

Los pigmentos son moléculas orgánicas con dobles enlaces conjugados (enlaces simples y dobles alternados regularmente) que contienen un grupo químico denominado cromóforo, capaz de absorber luz visible de una determinada longitud de onda (Malaviya, 2008).

Los pigmentos son capaces de mejorar la eficiencia en la utilización de la energía lumínica por parte de las microalgas y protegerlas contra la radiación solar y los efectos relacionados (Gouveia et al., 2008). Son además las sustancias químicas responsables del color característico de estos microorganismos y forman parte de su sistema fotosintético. Son utilizados en la industria como potenciadores del color y colorantes naturales que además proporcionan beneficios a la salud. En la farmacéutica se los emplea como indicadores basados en fluorescencia y marcadores bioquímicos en ensayos inmunes. De manera general se los clasifica en: 1) carotenoides, los cuales constituyen aproximadamente entre 0.1-0.2% de su peso seco (ciertas

especies pueden alcanzar valores de hasta 14% para beta carotenos bajo condiciones de estrés), 2) clorofilas, entre 0.5-1.0% de su peso seco y 3) las ficobiliproteínas que pueden constituir hasta el 8% de su peso seco (Christaki, Bonos, & Florou-Paneri, 2015).

2.4.1.1. Carotenoides

Los carotenoides son los pigmentos más diversos y comunes encontrados en la naturaleza (Leo, 2015). Son una familia de pigmentos terpenoides liposolubles de colores dentro del rango de amarillo hasta naranja/rojo y son sintetizados *de novo* por organismos fotosintéticos, ciertas bacterias y hongos. La función principal de estos pigmentos consiste en proteger el aparato fotosintético del daño provocado por la luz. Los carotenos tienen también un rol en el fototropismo y fototaxis de las microalgas. Además se ha visto que estos pigmentos actúan como antioxidantes eliminando y desactivando radicales libres (Gouveia et al., 2008).

Los carotenoides son pigmentos indispensables en la captación de luz, la transferencia de energía durante la fotosíntesis y en la protección del aparato fotosintético contra el daño foto-oxidativo en las microalgas. Tanto su síntesis como la acumulación dentro de estos microorganismos son procesos complejos que incluyen no solo su biosíntesis sino también la síntesis coordinada tanto de lípidos y proteínas necesarias para la obtención de extractos ricos en carotenos(Leo, 2015). Los carotenoides de los cloroplastos funcionales de las algas verdes incluyen beta-caroteno, luteína, violaxantina y neoxantina como los principales componentes de las tilacoides fotoquímicamente activas. Dependiendo de las condiciones de crecimiento y factores de estrés, el porcentaje de composición de carotenoides (en % de peso) varía en los rangos: beta-caroteno 25-40%, luteína 40-57%, violaxantina 9-20% y neoxantina 5-13% (Lichtenthaler, 1987).

Estos compuestos se caracterizan por presentar una larga cadena de polienos la cual puede terminar en grupos cíclicos o con elementos oxigenados. El doble enlace presente en la cadena de polieno puede tener dos tipos de configuraciones; isómeros geométricos *cis* o *trans*, siendo los *trans* los más comunes en las microalgas (Sun, Liu, Bi, & Zhou, 2014). Debido a su estructura, los carotenoides son de naturaleza hidrofóbica y deben permanecer unidos a las membranas dentro de la célula. Estos pigmentos son clasificados como accesorios debido a que no son capaces de transferir la energía lumínica directamente la vía fotosintética por lo que deben pasar la energía absorbida a la clorofila (Malaviya, 2008).

El número de dobles enlaces conjugados dentro del esqueleto de carbono base y las modificaciones cíclicas y oxigénicas son los responsables de la variedad de carotenoides. Más de 750 estructuras se han aislado de diferentes fuentes naturales, sin embargo, no más de treinta carotenos juegan un papel directo en la fotosíntesis de las microalgas eucariotas (Leo, 2015).

La clasificación química los divide en dos grupos; en carotenos, hidrocarburos sin oxígeno, por ejemplo: alfa caroteno, beta caroteno y licopeno. Por otro lado, las xantofilas son moléculas oxigenadas. Las microalgas son capaces de sintetizar xantofilas (violaxantina, anteraxantina, zeaxantina, neoxantina y luteína) como las plantas superiores. Sin embargo, se ha demostrado que microalgas verdes poseen xantofilas adicionales, por ejemplo, lodoxantina, astaxantina y cantaxantina. Otro tipo de distinción puede realizarse entre carotenoides primarios y secundarios (Fu et al., 2017). Primarios por ser componentes funcionales (fotoprotectores) y estructurales del aparato fotosintético. Dentro de grupo se encuentran por ejemplo el beta caroteno y la luteína (Shi & Chen, 2002). Los carotenoides secundarios como la astaxantina y cantaxantina no están relacionados directamente con la fotosíntesis; son

sintetizados en los cloroplastos vía carotenogénesis y se acumulan en el citoplasma. Se producen en condiciones ambientales de estrés y permite a las microalgas adaptarse a altas densidades de luz, falta de nutrientes, variaciones en el pH y la temperatura, alta salinidad y estrés oxidativo. Estudios aseveran que los carotenoides contribuyen de manera significativa a la capacidad antioxidante total de las microalgas (Safafar, Wagenen, Møller, & Jacobsen, 2015).

2.4.1.2. Clorofila

Este pigmento absorbe la luz con mayor intensidad en las regiones azul y rojo del espectro electromagnético, pero escasamente en las verdes por lo que imparte el color verde característico de los tejidos que contienen clorofila. Este pigmento se encuentra unido a proteínas y es capaz de transferir la energía absorbida a la dirección requerida por el organismo (PubChem Database., 2019).

Las clorofilas son los componentes en las células de plantas y microalgas responsables del proceso de fotosíntesis y están presentes en varias formas. La clorofila *a* absorbe las ondas de luz de 400-450 nm y de 650-700 nm y corresponde aproximadamente al 75% de los pigmentos verdes encontrados en la naturaleza (S.-K. Kim, 2015). La clorofila *b* por otro lado absorbe las de 450-500 nm. Los dos tipos de clorofila son componentes de las membranas fotosintéticas y ocurren en la proporción (*a/b*) de aproximadamente 3:1. Las condiciones ambientales y factores ambientales pueden alterar esta proporción (Lichtenthaler, 1987).

Las clorofilas son moléculas complejas pertenecientes a la clase de las porfirinas que contiene un átomo de magnesio en su centro. En el cuarto anillo de pirrol, se encuentra un ácido propiónico, el cual se esterifica por un fitol que le confiere a la molécula de una cola lipofílica (Streit, Zepka, & Jacob-Lopes,

2015). La diferencia entre los diferentes tipos de clorofilas se encuentra en los sustituyentes que se poseen. La clorofila a presenta un grupo metilo (-CH₃) en el carbono tres (Malaviya, 2008).

2.4.2. Polifenoles

El término “polifenol” abarca más de 800 compuestos químicos naturales orgánicos caracterizados por poseer múltiples unidades de estructuras fenólicas y son comúnmente divididos en 10 clases dependiendo de su estructura química básica (S.-K. Kim, 2015; Safafar et al., 2015). Sus moléculas se encuentran formadas por uno o más anillos bencénicos con uno más grupos hidroxilos (Munir, Sharif, Naz, & Manzoor, 2013). Químicamente, se los puede clasificar en diversas clases tales como: ácidos fenólicos, flavonoides (dentro de esta categoría se incluyen las flavonas, antocianinas, entre otros), isoflavonoides (isoflavonas) y polímeros fenólicos (proantocianidinas – taninos condensados y taninos hidrolizables) (Gong & Bassi, 2016).

De todos los biocompuestos activos presentes en la naturaleza, los compuesto fenólicos son el grupo de compuestos que presentan el mayor número de evidencia con respecto a su potencial terapéutico en la salud humana ya que han relacionado su consumo con la reducción en el riesgo de desarrollar enfermedades tanto crónicas como degenerativas (Ballard et al., 2019). Estudios epidemiológicos han confirmado que el consumo de dietas ricas en compuestos fenólicos pueden prevenir enfermedades degenerativas (Safafar et al., 2015). Esto debido a que poseen actividad estabilizadora de radicales libres ya que donan átomos de hidrógeno o electrones para poder producir intermediarios de estos radicales más estables. Además tienen la capacidad de inhibir la formación de radicales libres de oxígeno mediada por hierro para prevenir procesos que participan en el estrés oxidativo (Jerez-Martel et al., 2017).

Los compuestos polifenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en plantas. Sin embargo, estudios han demostrado que las microalgas también poseen derivados fenólicos a niveles de μg en peso seco y existen evidencias claras sobre su síntesis en microalgas (Hajimahmoodi et al., 2010; Jerez-Martel et al., 2017; Li et al., 2007). Los polifenoles presentes en las microalgas tienen propiedades además de antioxidantes, antiinflamatorias y antirradicalaria. De manera general, las concentraciones de estos compuestos presentes en los extractos de las microalgas se determina mediante el método Folin-Ciocalteu (S.-K. Kim, 2015).

2.4.2.1. Flavonoides

Son un grupo de metabolitos secundarios que participan en diversos procesos como la señalización, pigmentación y la protección contra los rayos UV, contaminación ambiental, químicos entre otros. Se pueden clasificar de acuerdo a su estructura química en cinco principales grupos: flavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas, isoflavonas y antocianinas (Ballard et al., 2019).

Dentro de estas estructuras hay grupos fenólicos hidroxilo que les confiere propiedades de quelación de metales como el hierro y antirradicalaria hacia los radicales hidroxilo y superóxido, encargados del inicio de la cadena de peroxidación lipídica. Por lo cual son considerados potentes antioxidantes. Sin embargo, el organismo humano al no ser capaz de producir flavonoides se los obtiene principalmente a partir de la dieta (Martinez-Florez, González-Gallego, & Culebras, 2002). Se consideraban una característica única de plantas terrestres, sin embargo, en la actualidad se sabe que la capacidad metabólica para la producción de flavonoides está de igual manera presente en los principales linajes evolutivos de las microalgas Cyanobacteria, Rhodophyta, Chlorophyta, Haptophyta, Ochrophyta, pero su concentración y composición

dependerá del tipo de especies y las condiciones de cultivo (Safafar et al., 2015).

Se ha visto un creciente interés en los flavonoides debido a sus beneficios a la salud ya que presentan un amplio rango de actividades antioxidantes in vivo al promover la producción de enzimas antioxidantes o inhibir las que tienen un efecto pro-oxidante. Estudios afirman que el consumo de alimentos ricos en vitaminas C y E, flavonoides y carotenos juegan un rol protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y cataratas (Carr & Frei, 1999; Proteggente et al., 2002).

2.4.2.2. Taninos

Los taninos son un tipo de compuestos polifenólicos solubles en agua que tienen la capacidad de precipitar proteínas y alcaloides además de poseer propiedades astringentes. Se ha reportado gran variedad en cuanto a estructura y complejidad. No obstante, se los clasifica comúnmente de acuerdo a su composición química en taninos hidrolizables y condensados. Un tercer tipo de taninos se descubrió posteriormente, los florotatinos (Pérez-Lorenzo, Levy-Benshimol, & Gómez-Acevedo, 1998). Siendo este último tipo un rasgo propio de las algas, especialmente de las pardas pertenecientes a la clase Phaeophyceae, con respecto a las plantas terrestres (Elsa, González, I, & li, 2009). Debido a la estructura de los florotaninos, que contienen hasta ocho anillos bencénicos interconectados, resultan captadores o *scavengers* de radicales libres más potentes que otros polifenoles de plantas como por ejemplo la catequina (Munir et al., 2013). La industria farmacéutica solo ha aprovechado a los taninos para la producción de antidiarreicos a pesar de las capacidades antioxidantes que estudios recientes han demostrado (Isaza, 2007).

2.4.2.3. Antocianinas

Son un grupo de pigmentos hidrosolubles pertenecientes a los flavonoides y se han identificado más de 650 estructuras de antocianinas. Estos metabolitos secundarios son los responsables de las tonalidades naranja-rojo a azul-violeta en frutos, vegetales, granos y flores (Wallace & Giusti, 2014). Sin embargo estudios recientes han atribuido en parte a las antocianinas la capacidad antioxidante y potencial nutracéutico de las microalgas (Malagón Micán, Piñeros Corzo, Juliana, & Ruiz Manrique, 2017).

El rol de estos pigmentos incluye la protección de los cloroplastos contra los efectos adversos por el exceso de luz, la atenuación de la radiación UV-B y la actividad antioxidante como moduladores de las cascadas de señalización de las ERO. El grado al cual cada uno de estos procesos se ve afectado por las antocianinas varía de acuerdo a las especies (Gould, Davies, & Winefield, 2008). Se han reportado efectos beneficiosos para la salud y se ha promovido su uso como colorantes naturales. Sin embargo, su disponibilidad y diversidad para fines comerciales es limitada por lo cual se ha iniciado una búsqueda de fuentes alternativas de estos pigmentos naturales (Appelhagen et al., 2018).

2.4.3. Vitamina C

La vitamina C participa en varios procesos tanto fisiológicos como bioquímicos como agente reductor debido a que actúa como el donante de electrones de un amplio rango de enzimas mono y di oxigenasas, previniendo de esta forma que otros compuestos se oxiden (Brown & Miller, 1992). No obstante, durante este proceso la vitamina C se oxida. Sin embargo, los radicales libres formados son poco reactivos (Padayatty et al., 2013).

Determinadas microalgas contienen vitaminas hidro y liposolubles que en algunos casos existen en mayores concentraciones de alimentos que tradicionalmente se consideraban ricos en ellas. Es por esto que, se han considerado una fuente promisorio no convencional de vitaminas que pueden

ser utilizados como suplemento en la alimentación tanto humana como animal (Fabregas & Herrero, 1990).

El contenido de vitaminas en las algas dependerá del genotipo, la etapa en su ciclo de crecimiento, su estado nutricional y su tasa fotosintética. Su contenido se puede manipular variando estas condiciones. Sin embargo, el contenido vitamínico celular fluctúa de acuerdo a factores ambientales, el tratamiento de recolección y los métodos de secado de la biomasa (Munir et al., 2013).

2.4.4. Identificación y Clasificación de Microalgas

Las microalgas son un grupo polifilético y por lo tanto no puede ser fácilmente definido (Singh & Saxena, 2015). Este grupo no representa un grupo taxonómico formal, sino que constituye una colección heterogénea de divisiones con representantes en algunos reinos que poseen todas o la mayoría de las siguientes características: acuáticas, fotosintéticas (tienen clorofila a), planos corporales simples, sin raíces, tallos u hojas y cuerpos reproductivos que carecen de una capa estéril de células protectoras (Wher & Sheat, 2013).

La clasificación en eucariotas o procariotas depende principalmente de los organelos que posean (Bhalamurugan, Valerie, & Mark, 2018). Los grupos taxonómicos actuales incluyen 16 clases de microalgas siendo las más abundantes las diatomeas (Bacillariophyceae), seguidas de las algas verdes (Chlorophyceae), y las algas doradas (Chrysophyceae) (Jacob-Lopes et al., 2019). Tanto su bioquímica como ultra estructura son igual de diversas como su fisiología (Barclay & Apt, 2013) por lo cual es posible identificar estas divisiones de acuerdo a determinadas características que incluyen pigmentos fotosintéticos, productos de reserva, cobertura celular y aspectos de la organización celular (Ebenezer, Medlin, & Ki, 2012).

Con herramientas moleculares es posible identificar las especies sin importar su etapa de vida o fenotipo. Éstas han ayudado a esclarecer la taxonomía y a caracterizar la diversidad de estos microorganismos para una mejor comprensión de los diferentes grupos de microalgas (Wher & Sheat, 2013). Para este propósito se ha analizado el ADN ribosomal (ADNr) ya que posee características como varias tasas de evolución entre diferentes regiones (tanto entre genes como dentro de ellos), la presencia de varias copias de secuencias en el genoma y el patrón de evolución concertada presente entre copias repetidas (Hillis y Dixon, 1991).

Es por eso que las regiones conservadas y variables de los genes 16S rRNA para cianobacterias (Shariatmadari, Moharrek, Riahi, Heidari, & Aslani, 2017) y 18S rRNA (Gómez-Espinoza et al., 2018; Olmos, Paniagua, & Contreras, 2000) para microalgas son adecuados para la identificación a nivel de género. Para complementar la identificación de especies o cepas, se analizan también las secuencias transcritas internas (ITS, por sus siglas en inglés), ya que son más divergentes (Hadi et al., 2016). En particular, el ITS2, el cual se ubica entre el ARN ribosomal (ARNr) 5.8 y la subunidad larga ARNr, ya que es altamente conservado dentro de las especies, pero altamente divergente entre especies (Hoshina, 2014).

3. Capítulo III. Procedimientos

3.1. Sitios de muestreo

La población de microalgas fue previamente colectada en diez áreas protegidas del Ecuador (MAE, 2015) (Figura 1.) Además de las áreas conservadas Yasuní y la laguna de Chinchillas en la provincia de Loja por Guamán-Burneo & González Romero (2016). Las colectas fueron realizadas bajo los permisos correspondientes (Permiso de investigación No. 002-14 IC-MC-DNB/MA. Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos MAE-DNB-CM-2015-

0012/ UDLA: MAE-DNB-CM-2018-0093). Las muestras seleccionadas son parte del proyecto “Estudio de la capacidad antimicrobiana, antioxidante y antiinflamatoria de microalgas y cianobacterias nativas de sistemas lacustres de la Sierra Central del Ecuador” de la Dirección General de Investigación.

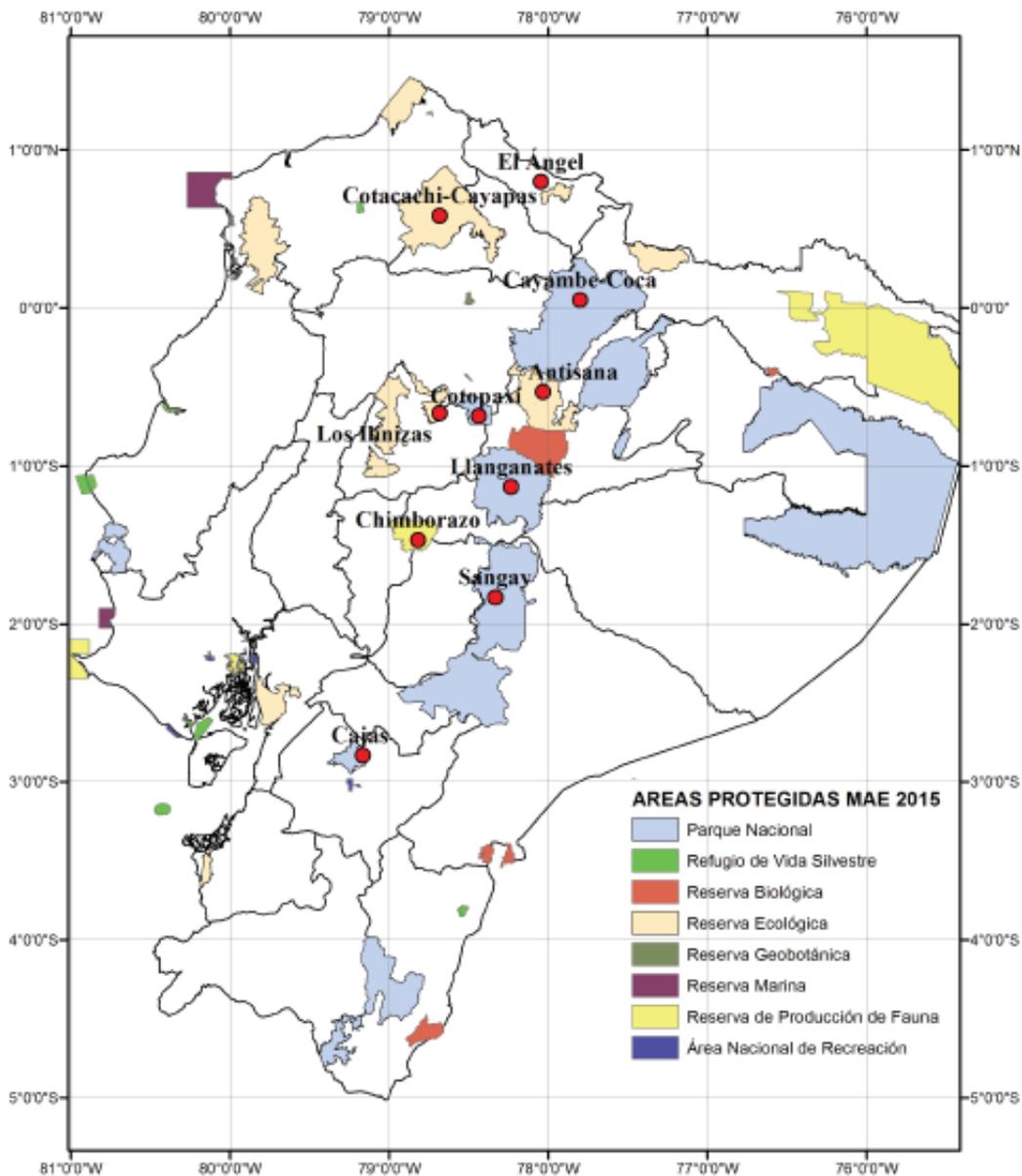


Figura 1. Sitios de muestreo para aislamiento de microalgas en Áreas protegidas del Ecuador

Tomada de: Guamán-Burneo & González Romero (2016).

Un total de 129 aislados fueron seleccionados y purificados de la Colección de Ficología (CF) - UDLA, instaurada por el proyecto para el escalamiento de cultivos puros de microalgas para su identificación molecular y posteriores pruebas de ensayos antioxidantes, entre otros.

Los sitios de muestreo de las cepas seleccionadas corresponden a la laguna de Chinchillas, Laguna de La Mica (Reserva Ecológica Antisana), Laguna de Antejos y Rodeococha (Parque Nacional Llanganates), Lagunas de Loreto y Virgen (Reserva Ecológica Cayambe-Coca), Colta (Reserva Faunística Chimborazo), Limoncocha (Reserva Biológica Limoncocha), de Yasuní, Estación Timburicocha (Parque Nacional Sumaco Napo-Galeras) y de varias localidades de la provincia de Pichincha.

3.1. Materiales y métodos para la obtención de los datos

3.1.1. Reactivación de aislados

Se reactivaron las muestras conservadas previamente en condiciones de oscuridad y procurando evitar un choque térmico según la metodología descrita por Day & Brand (2006). Los tubos fueron descongelados durante 4 minutos en baño María a 37 °C (Memmert WNB 14/Alemania), agitándolos cada minuto por inversión. Posteriormente, se centrifugaron (Hermle Z 233 M-2/Alemania) los criotubos durante 6 minutos a 2 000 rpm para sedimentar las células y eliminar el medio. Las células fueron lavadas con 1 mL de medio de cultivo y se centrifugaron por segunda vez durante 6 minutos a 2 000 rpm. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 1,5 mL de medio de cultivo. Los aislados de microalgas reactivados se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, los cultivos axénicos reactivados se traspasaron a tubos con 3 mL de medio de cultivo y se mantuvieron en condiciones controladas en una incubadora (Environmental Chamber SWGC Wisd/Irlanda) con una intensidad de luz de 20.2635 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Auto Ranging Light Meter with USB CEM DT-1309/Estados Unidos), a un fotoperíodo de 16: 8 (Luz:Oscuridad), la

temperatura se mantuvo $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 50 % de humedad relativa y agitación continua (ThermoFisher Scientific MaxQ 4000 Shaker/Estados Unidos).

3.1.2. Purificación y escalamiento de aislados

Se revisó la pureza y morfología de las muestras mediante microscopía (Olympus BX 41/Estados Unidos). Se identificaron las microalgas a nivel de género con el apoyo de catálogos ilustrados de microalgas (Guamán-Burneo & González Romero, 2016; Núñez-Avellaneda, Marciales-Caro, & Beltrán Gutiérrez, 2008). En caso de estar contaminadas, se emplearon técnicas de dilución seriada, plaqueo por estrías discontinuas en medios de cultivo sólido y micropesca invertida. Una vez puras y axénicas, los viales se escalaron bajo condiciones controladas empleando los medios de cultivo BG-11, Bold Basal Medium (BBM) (Bold, 1949; Rippka, Deruelles, B., Herdman, & Stanier, 1979), Bristol, f/2 y Zarrouk (Rojas et al., 2012; UTEX, 2019). La intensidad lumínica fue de $20.466 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Auto Ranging Light Meter with USB CEM DT-1309/Estados Unidos) con un fotoperíodo de 16:8 (Luz:Oscuridad), la temperatura se mantuvo $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y aireación continua (Aquarium SeBO SB-948/China; presión: 0,02 Mpa, salida: 4x3 L/min, poder: 8W). El fertilizante foliar Nitrofoska® Foliar PS fue empleado desde la escala piloto hasta escala de invernadero de 20 litros. Previo a la cosecha de la biomasa pura se volvió a revisar su pureza y se tomaron fotografías con escala (10 μm) y medidas (Olympus CX 31/Estados Unidos; Software: Infinity Analyze Lumera). La biomasa se centrifugó (Eppendorf Centrifuge 5804/Alemania) durante 10 minutos a 4000 rpm, se concentró y se mantuvo por dos horas a -20°C . Finalmente, se liofilizó (BUCHI Lyovapor L-200/Alemania) y se almacenó la biomasa a -80°C .

3.1.3. Identificación molecular de microalgas

3.1.3.1. Extracción de ADN genómico de aislados

Se utilizó el Kit de Purificación de ADN para plantas PureLink (Invitrogen, 2012) modificado. Se midió la densidad óptica de los cultivos a extraer (mínima de $OD_{440} \approx 0,5$) (Biotek Synergy HT/Estados Unidos). Se añadieron perlas de vidrio previo a una homogenización por vórtex (Vórtex LST TM/Corning) con el fin de mejorar el rendimiento de la extracción. El ADN extraído se cuantificó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm (ThermoFisher Scientific NanoDrop 2000/Estados Unidos). Las muestras de ADN purificadas fueron almacenadas a -20°C .

3.1.3.2. Amplificación del material genético

Se utilizó GoTaq® Green Master Mix (Promega, 2016) empleando los cebadores eucariotas del gen del ARNr 18S para las microalgas DIV4 F (5'-GCGGTAATTCCAGCTCCAATAG-3') y DIV4 R (5'-CTCTGACAATGGAATACGAATA-3') (Visco et al., 2015). Los cebadores procariotas del gen ARNr 16s para cianobacterias que se emplearon fueron CYA 106 F (5'-CGGACGGGTGAGTAACGCGTGT-3') y CYA 781 R (5'-GACTACTGGGGTATCTAATCCCAT-3') (Baldev, Mubarakali, Dinesh Kumar, & Thajuddin, 2015). Para la amplificación de la región ITS para microalgas se emplearon los cebadores ITS1F (5'-AGGAGAAGTCGTAACAAGGT-3') e ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Hadi et al., 2016). Para la amplificación de la región ITS de las cianobacterias se emplearon los cebadores ITSCYA236 F (5'-CTGGTTCRAGTCCAGGAT-3') e ITSCYA225 R (5'-TGCAGTTKTCAAGTTCT-3') (Valério et al., 2009). Finalmente, se analizaron los productos de PCR con un gel de electroforesis de 1,5 % (p/v) en cámara de 80V por 35 minutos (Labnet Enduro Gel X2/Estados Unidos). El buffer empleado fue TBE 1X (10,8 g de Tris, 5,5 g ácido bórico, H_3BO_3 , en 900 mL de agua destilada). Se añadieron 4mL de Na_2EDTA 0,5M, pH 8.0 y se aforó a un litro. Los productos de PCR fueron visualizados (BioRad ChemiDoc MP Imaging System/Estados Unidos, Software: ImageLab/BioRad) y los que tuvieron una correcta amplificación, Na_2EDTA 0,5M, pH 8.0 y se aforó a un litro.

Los productos de PCR fueron visualizados (BioRad ChemiDoc MP Imaging System/Estados Unidos, Software: ImageLab/BioRad) y la secuenciación se realizó mediante el kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle (Thermo Fisher Scientific, 2016) por parte del servicio de secuenciación ofrecido por el mismo laboratorio de la Universidad de las Américas. Las secuencias se ensamblaron, editaron y alinearon con el programa MEGA 7. Para complementar este proceso, se realizó el análisis comparativo y la búsqueda de secuencias homólogas utilizando el programa BLAST del centro nacional de información sobre biotecnología (NCBI). Las cepas fueron clasificadas en unidades taxonómicas operacionales (OTU, por sus siglas en inglés).

3.1.3.3. Programas de amplificación

Tabla 1.

Programa de amplificación 16S GoTaq

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial		2 min	1
Denaturación	95 ° C	45 s	
Hibridación	55 ° C	45 s	40
Extensión		45 s	
Extensión final	72 ° C	5 min	1
Almacenamiento	4 ° C	∞	

Tabla 2.

Programa de amplificación ITS microalgas GoTaq

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial		2 min	1
Denaturación	95 ° C	1 min	
Hibridación	49 ° C	45 s	40
Extensión		1 min	
Extensión final	72 ° C	5 min	1
Almacenamiento	4 ° C	∞	

Tabla 3.

Programa de amplificación ITS cianobacterias GoTaq

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial		6 min	1
Denaturación	95 ° C	45 s	
Hibridación	52 ° C	45 s	40
Extensión		45 s	
Extensión final	72 ° C	5 min	1
Almacenamiento	4 ° C	∞	

Tabla 4.

Programa de amplificación ITS microalgas GoTaq

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial		2 min	1
Denaturación	95 ° C	1 min	
Hibridación	49 ° C	45 s	40
Extensión		1 min	
Extensión final	72 ° C	5 min	1
Almacenamiento	4 ° C	∞	

3.1.4. Estudio de compuestos bioquímicos

3.1.4.1. Extracción metanólica

A 0,4 g de biomasa liofilizada se adicionaron 12 mL de metanol al 80% y se mantuvieron en agitación por 2 horas en oscuridad a temperatura (ThermoFischer Scientific Isotemp/Estados Unidos). La mezcla se centrifugó y el sobrenadante se filtró en papel filtro mientras que el pellet fue sometido nuevamente a agitación con 12 mL de metanol al 80%, centrifugación y filtrado.

Finalmente, los productos de las dos filtraciones se unieron y almacenaron en un frasco ámbar a -20°C .

3.1.4.2. Fenoles totales

El contenido total fenólico de los extractos metanólicos se determinó empleando el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo a la metodología descrita por Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós (1998) con modificaciones. Para la medición de muestras se utilizó con el extracto metanólico el siguiente protocolo. Se preparó una solución de 100 μL de la muestra más 500 μL del reactivo Folin (0,2N). Se dejó incubar durante cinco minutos y se añadió 400 μL de la solución de carbonato de sodio ($75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Después de una segunda incubación de dos horas en oscuridad a temperatura ambiente se colocaron las muestras en una placa de 96 pocillos por triplicado para medir su absorbancia en el espectrofotómetro lector de placas (Synergy Biotek HT/Estados Unidos; Software: Gen5/Biotek) a una longitud de onda de 760 nm contra un blanco. Se realizó una curva de calibración empleando ácido gálico como estándar cubriendo el rango de concentración de 0,1875 a 3 Mm. El contenido fenólico total (CFT) se expresó como mg equivalente de ácido gálico (EAG) por g de biomasa liofilizada de microalga peso seco (PS).

3.1.4.3. Flavonoides

Se determinó el contenido de flavonoides de acuerdo a la metodología propuesta por Dewanto, Wu, Adom, & Rui (2002) con modificaciones. Para la medición de muestras se realizó el siguiente protocolo con el extracto metanólico de las muestras por triplicado. Se preparó una solución de 20 μL de la muestra más 100 μL agua destilada. A continuación, se añadió 6 μL de nitrito de sodio al 5% y se dejó incubar a temperatura ambiente durante seis minutos. Posteriormente, se añadió cloruro de aluminio hexahidratado al 10% y se incubó por segunda ocasión durante cinco minutos. Finalmente, se agregaron 40 μL hidróxido de sodio 1M y 22 μL de agua destilada. Se colocaron las

muestras en una placa de 96 pocillos para medir su absorbancia en el espectrofotómetro lector de placas (Synergy Biotek HT/Estados Unidos; Software: Gen5/Biotek) a una longitud de onda de 510 nm contra un blanco. Se realizó una curva de calibración empleando catequina como estándar cubriendo el rango de concentración de 0,0625 a 0,5 mM. El valor de flavonoides se expresó como mg de equivalente de catequina (EC) por g de biomasa liofilizada de microalga (PS).

3.1.4.4. Taninos

Se determinó el contenido de taninos mediante la metodología propuesta por Hagerman (1988). Para la medición de las muestras se realizó el siguiente protocolo por triplicado. La solución de 0,05 g de biomasa liofilizada más 1 mL de N,N-dimetilformamida se agitó (ThermoFisher Scientific Isotemp/Estados Unidos) durante una hora. Transcurrido este tiempo se centrifugó (Hermle Z 233 M-2/Alemania) a 1000 gravedades por 10 minutos. Se procedió a recoger el sobrenadante. En una placa de 96 pocillos se agregaron 2,16 μL de sobrenadante, 143,8 μL de agua destilada, 27 μL de solución amoniacal y 27 μL de solución citrato férrico ($3,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Se dejó reposar durante 10 minutos en oscuridad. Finalmente, se midió su absorbancia en el espectrofotómetro lector de placas (Synergy Biotek HT/Estados Unidos; Software: Gen5/Biotek) a una longitud de onda de 525 nm contra un blanco. Se realizó una curva de calibración empleando una solución de ácido tánico al $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ como estándar cubriendo el rango de concentración de 0,020 a $0,111 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. El valor de taninos se expresó como mg de equivalente ácido tánico (EAT) por g de biomasa liofilizada de microalga (PS).

3.1.4.5. Antocianinas

Se determinó el contenido de antocianinas de acuerdo a la metodología propuesta por Rodríguez-Saona & Wrolstad (2001) con modificaciones. Para la medición de muestras se realizó el siguiente protocolo con el extracto

metanólico de las muestras por triplicado. Se prepararon dos soluciones tampón; la primera de cloruro de potasio (0,025 M) pH 1 y la segunda de acetato de sodio trihidratado (0,4 M) pH 4,5. En dos cubetas de cuarzo diferentes se añadieron 100 µL de la muestra. A continuación, en una de las cubetas se agregaron 900 µL la solución tampón 1 y en la segunda 900 µL de la solución tampón 2. Se midió la absorbancia de ambas soluciones a 500 y 700 nm en el espectrofotómetro (ShimadzuUVmini-1240/Japón) contra los blancos de cada solución tampón preparados previamente. Para el cálculo de la absorbancia se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Absorbancia} = (\text{Abs}500 \text{ nm} - \text{Abs}700 \text{ nm})_{\text{pH}1} - (\text{Abs}500 \text{ nm} - \text{Abs}700 \text{ nm})_{\text{pH}4,5}$$

Se utilizó una curva de calibración con perlagonidina como estándar cubriendo el rango de concentración de 5 a 150 mg·L⁻¹. El valor de antocianinas de las muestras se expresó como mg de equivalente perlagonidina (EP) por mg de biomasa liofilizada de microalgas (PS).

3.1.4.6. Clorofila

Se determinó el contenido de clorofila a mediante la metodología propuesta por Stevenson, Bothwell, & Rowe (1996) con modificaciones. Se pesaron 0,1 gramos de liofilizado de biomasa de microalga y se diluyeron con 10 mL de etanol absoluto en un tubo Falcon envuelto en papel aluminio. Se incubó durante 24 horas a -20 °C. Pasado este tiempo se centrifugó (Eppendorf Centrifuge 5804 R/Alemania) la muestra durante 5 minutos a 5 000 rpm. Se recolectó el sobrenadante y se midió en el espectrofotómetro (Shimadzu UVmini-1240/Japón) a longitudes de onda de 664 nm y 750 nm siendo el blanco etanol absoluto. Posteriormente, como método de corrección, se acidificó con 0,1 mL de HCl 0,1N, se incubó por tres minutos y se midió nuevamente a 665 nm y 750 nm siendo el blanco acidificado de igual manera. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Para el cálculo de la cantidad de clorofila a en la muestra se empleó la siguiente fórmula:

Clorofila a ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$): $28 (E664b-E665a) \cdot \text{Volumen extracto}/\text{Volumen cultivo} \cdot L$

En donde:

28: coeficiente de absorción para clorofila en 96% de etanol.

E664b: (absorbancia a 664 nm - absorbancia a 750 nm)* antes de la acidificación

E664a: (absorbancia a 665 nm - absorbancia a 750 nm)

Volumen del extracto: 10 mL

Volumen del cultivo: 6 litros aproximadamente

L: longitud de la celda de cuarzo usada en el espectrofotómetro (1 cm)

El valor de clorofila a se expresó como g de clorofila a por mL.

3.1.4.7. Carotenoides

Se determinó la concentración de beta-caroteno y luteína por medio de HPLC de acuerdo a la metodología propuesta por Othman, Noh, Hatta, & Jamaludin (2018) con modificaciones. Para la preparación de la muestra se mezcló 0,5 g de biomasa liofilizada, 1 g hidróxido de potasio y 20 mL de metanol puro. Se saponificó esta solución mediante el método de reflujo durante dos horas a 50°C (Heating Mantle R34/Estados Unidos). Transcurrido este tiempo se dejó enfriar la muestra. Posteriormente se agregaron 35 mL de éter de petróleo más 25 mL agua destilada en un balón de separación el cual se agitó, liberando constantemente el gas formado para la extracción de carotenos. Después de dejar que la mezcla se estabilice, se recogió la fase orgánica, se la traspasó a un balón para evaporar el éter en el rotavapor (BUCHI R210/Alemania). Finalmente, se añadieron 6mL de la fase móvil, compuesta a razón de isopropanol:metanol:aguamiliQ (32,5:15:2,5) para despegar la fase semi-sólida del balón. La muestra ya diluida se filtró con un filtro de jeringa de 0,22 μm . Finalmente se leyeron las muestras por duplicado a partir de un volumen de inyección de 20 μL a una longitud de onda de 450 nm con flujo de 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ en el equipo HPLC Agilent Technologies Series 1260, con la columna Eclipse

Plus C18 5 μm 4.6 x 250 mm. La curva de calibración fue previamente realizada a partir de un estándar de beta-caroteno y luteína de pureza 93.0% la cual cubre el rango de 0,05 – 10,0 mg/L (ppm). Los valores se expresaron como mg de beta-caroteno/luteína por g de biomasa liofilizada de microalgas (PS).

3.1.4.8. Vitamina C

Se determinó la concentración de Vitamina C mediante HPLC de acuerdo a la metodología propuesta por Dewanto y colaboradores (2002). En un balón ámbar se diluyó 10 mg de la biomasa liofilizada en 7 mL de ácido metafosfórico al 5%. A continuación, se colocaron en ultrasonido las muestras en baño de hielo (ThermoFisher Scientific Ultrasonic Batch/Estados Unidos) durante 20 minutos, agitando los balones cada cinco minutos. Transcurrido este tiempo se dejaron reposar hasta que estén a temperatura ambiente para aforar los balones a 10 mL con el diluyente. Después se filtró por filtro de jeringa de 0,22 μm . Finalmente se leyeron las muestras por duplicado a partir de un volumen de inyección de 20 μL a una longitud de onda de 245 nm con flujo de 1,0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ en el equipo HPLC Agilent Technologies Series 1260, con la columna Eclipse Plus C18 5 μm 4,6 x 250 mm. La curva de calibración fue previamente realizada a partir de un estándar de ácido ascórbico de pureza 99,5% la cual cubre el rango de 5,0 – 50,0 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ (ppm). El valor de vitamina C de las muestras se expresó como mg de vitamina C por g de biomasa liofilizada de microalga (PS).

3.1.5. Determinación de la capacidad de captación de radicales libres mediante el ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Se determinó la capacidad antioxidante de las muestras empleando el radical libre estable DPPH de acuerdo a la metodología propuesta por Prymont-Przyminska y colaboradores (2014) con modificaciones. Para la medición de muestras se realizó el siguiente protocolo con el extracto metanólico de las muestras por triplicado. Se utilizaron dos blancos para este ensayo; el Blanco 1 se preparó cada vez que se realizó el procedimiento experimental y el Blanco 2

por cada muestra. En diferentes tubos Eppendorf se prepararon de la siguiente manera: Blanco 1: 550 μL de etanol al 70% (v/v), 50 μL de metanol al 80% y 400 μL de la solución de DPPH (0,2 mM). Blanco 2: 550 μL etanol al 70% (v/v), 50 μL de muestra y 400 μL de metanol. Para la preparación de la muestra se colocaron 550 μL etanol al 70% (v/v), 50 μL de muestra y 400 μL de DPPH. Posteriormente, se agitó cada tubo en vórtex y se los incubó durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, agitándolos cada tres minutos. Finalmente se colocaron las muestras en una placa de 96 pocillos para medir su absorbancia en el espectrofotómetro lector de placas (Synergy Biotek HT/Estados Unidos; Software: Gen5/Biotek) a una longitud de onda de 517 nm contra los blancos preparados. Para calcular el porcentaje de inhibición del radical libre estable DPPH se realizará el siguiente cálculo por cada muestra:

$$\% \text{ de actividad de captación de DPPH} = \left(1 - \frac{\text{Absorbancia muestra} - \text{Blanco 2}}{\text{Blanco 1}} \right) * 100$$

Se realizó una curva de calibración empleando una solución de Trolox como estándar cubriendo el rango de 5 a 500 μM . Los resultados obtenidos fueron expresados como μmol equivalente Trolox por g de biomasa liofilizada de microalga (PS).

3.1.6. Determinación de la capacidad reductora mediante el ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Se determinó la capacidad reductora por el ensayo FRAP propuesta por Benzie & Strain(1996) con modificaciones. Para la medición de muestras se realizó el siguiente protocolo con el extracto metanólico de las muestras por triplicado. Se preparó la solución FRAP añadiendo 100 mL de acetato de sodio trihidratado 300 Mm, 10 mL de TPTZ 10 mM y 10 mL de solución de cloruro férrico hexahidratado 20 mM. A continuación, se colocaron en una placa de 96 pocillos 180 μL de la solución FRAP y 20 μL de la muestra. Se midió su absorbancia en el espectrofotómetro lector de placas (Synergy Biotek HT/Estados Unidos; Software: Gen5/Biotek) a una longitud de onda de 510nm contra el control. Se realizó una curva de calibración empleando una solución de Trolox como

estándar cubriendo el rango de 50 a 500 μM . Los resultados obtenidos fueron expresados como μmol equivalente Trolox por g de biomasa liofilizada de microalga (PS).

3.1.7. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en el estudio y la presentación de resultados se hizo uso del paquete estadístico IBM SPSS Statistics 20.0. Mediante estadística descriptiva se obtuvo un resultado a partir de las repeticiones de las cuantificaciones de los compuestos de cada ensayo. Para el estudio comparativo se empleará el análisis de varianza ANOVA de una variable para cada ensayo bioquímico y la prueba post hoc Tuckey. La significancia de la correlación entre el contenido fenólico y de carotenoides con la actividad antioxidante se verificó mediante correlaciones bivariadas utilizando el coeficiente Pearson. El nivel de confianza que se utilizó fue del 95 %. Se consideró un valor $p < 0,05$ como significativo y $p < 0,01$ altamente significativo.

4. Capítulo IV. Resultados y discusión

4.1. Identificación molecular y cepas seleccionadas

De los 129 aislados purificados de la CFE, se seleccionaron 19 cepas de microalgas, debido a que representan diferentes OTUs moleculares como se observa en la Tabla 5. A partir de éstas se obtuvo el 16% de cianobacterias, el 21% de Ochrophytas y el 63% correspondieron a microalgas del orden Chlorophyta.

Tabla 5.

Identificación molecular de aislados de microalgas

Código de colección	Primer	Referente	% Identidad	Especie	OTU
CFE-22-001	DIV4-F/DIV4-R	KX818836.1	100%	<i>Coelastrella</i> sp.	1
CFE-07-009	DIV4-F/DIV4-R	LC425389.1	100%	<i>Chlorella sorokiniana</i>	3

CFE-M-002	DIV4-F/DIV4-R	KX495055.1	100%	<i>Chlorella vulgaris</i>	5
CFE-I3-004	DIV4-F/DIV4-R	AJ236860.1	100%	<i>Spumella obliqua</i>	6
CFE-22-007	DIV4-F/DIV4-R	KF651119.1	100%	<i>Spumell asp. OF-40</i>	7
CFE-B2-002	DIV4-F/DIV4-R	AY651089.1	95%	<i>Spumella-like flagellate</i>	8
CFE-G1-003	DIV4-F/DIV4-R	MH979037.1	100%	<i>Scenedesmus sp. KMITL-OVG</i>	9
CFE-D4-001					
CFE-J1-001	DIV4-F/DIV4-R	KX094828.1	100%	<i>Stichococcus sp. WB66</i>	11
	ITS1/ITS4	KX094859.1	99%	<i>Stichococcus sp. WB66</i>	
CFE-07-010	DIV4-F/DIV4-R	MH459062.1	100%	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	12
CFE-I5-002	DIV4-F/DIV4-R	KM020063.1	99%	<i>Gloeotilopsis sterilis</i>	13
CFE-07-002	DIV4-F/DIV4-R	KU666441.1	100%	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	17
CFE-22-002	DIV4-F	AY197639.1	96%	<i>Scenedesmaceae sp. Tow 9/21 P-14w</i>	18
	ITS1/ITS4	AB917137.1	98%	<i>Desmodesmus sp.</i>	
CFE-07-017	CYA106/CYA781	FJ968741.1	99%	<i>Parachlorella kessleri</i>	20
CFE-07-001	DIV4-F/DIV4-R	MH542675.1	99%	<i>Poterochromonas malhamensis</i>	21
CFE-B2-005	DIV4-F	KR758764.1	100%	<i>Acutodesmus obliquus</i>	22
CFE-05-003	DIV4-F/DIV4-R	KF673371.1	100%	<i>Desmodesmus abundans</i>	24
CFE-07-016	CYA106	MG663226.1	100%	<i>Synechocystis sp. KUMCC</i>	Y1
CFE-D2-001	CYA106/CYA781	MG710496.1	100%	<i>Chroococciopsis thermalis</i>	Y2
	ITSCYA236F/ITSCYA225R	MG710496.1	99%	<i>Chroococciopsis thermalis</i>	
CFE-07-004	CYA106/CYA781	NC_005229.1	100%	<i>Synechocystis sp.</i>	Y4

4.2. Ensayos espectrofotométricos

4.2.1. Polifenoles

Se utilizó el protocolo de Folin-Ciocalteu para determinar el contenido fenólico total y correlacionar con resultados de métodos como Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), utilizado en la presente investigación, y del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), los cuales determinan el poder reductor y la capacidad antioxidante respectivamente.

La cepa de la CFE-UDLA que presentó una diferencia significativa en cuanto al contenido fenólico total fue *Scenedesmaceae* sp. *Tow 9/21 P-14w* CFE-22-002 (16,819 mg EAG·g⁻¹) como se observa en la Figura 2. De hecho, se evidencia una mayor concentración de polifenoles que otras especies de *Scenedesmus* reportadas, como por ejemplo *Scenedesmus opoliensis* (Stoica et al., 2013). Los investigadores ensayaron diferentes solventes de extracción en esta especie y la concentración máxima que obtuvieron fue de 151,5 mg EAG·100 g⁻¹, la cual sigue siendo menor que la obtenida por la *Scenedesmaceae* sp. *Tow 9/21 P-14w* CFE-22-002. Este resultado se correlaciona con los valores obtenidos de flavonoides y taninos ya que esta misma cepa presentó los valores más altos de estos compuestos en la presente investigación. Resultados aún más significativos se evidencian en los valores obtenidos para DPPH y FRAP, mismos que dan una pauta de cómo los compuestos fenólicos contribuyen a la capacidad antioxidante de las microalgas. Sin embargo, a partir del extracto de *Scenedesmaceae* sp. *Tow 9/21 P-14w* CFE-22-002 no se detectaron antocianinas, por lo que se debería realizar un análisis del perfil fenólico completo para ver además de flavonoides y taninos qué compuestos le confieren estas propiedades. Porque como se conoce, las halogenaciones de los diferentes compuestos fenólicos son responsable de distintas actividades biológicas (Andrade, 2018).

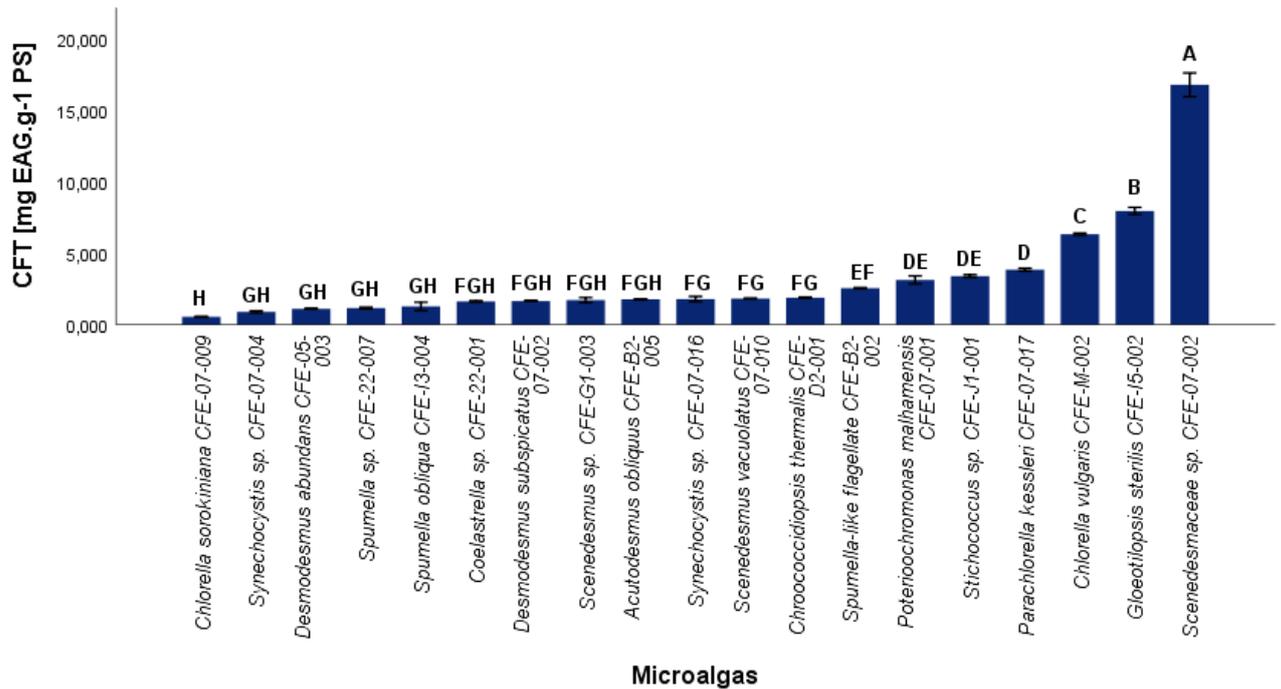


Figura 2. Contenido Fenólico Total (CFT) de las 19 OTUs determinado mediante el ensayo Folin-Ciocalteu. Los valores representan la media \pm Error estándar. Los resultados se expresan como mg Equivalentes ácido gálico por g de microalga peso seco. Las medias con diferentes letras son diferentes significativamente (Tukey's HSD, $p < 0.005$).

Entre las microalgas analizadas se encuentra *Gloeotilopsis sterilis* CFE-I5-002, una microalga verde (Chlorophyta) perteneciente a la clase Ulvophyceae. Existen reportes de contenido de polifenoles dentro de esta clase de algas (Hardouin et al., 2016; J. H. Kim, Kim, Edwards, & Lee, 2018; Z. Liu, Zeng, & Zeng, 2014). Sin embargo, del género *Gloeotilopsis* existen únicamente escasos estudios sobre ciclo de vida y morfología mas no de su composición bioquímica (Sluiman, 1991). Este estudio resulta pionero en cuanto a la determinación de compuestos fenólicos en esta microalga, demostrando un gran potencial ya que se destaca al obtener la segunda mayor concentración de polifenoles (7,978 mg EAG·g⁻¹ (Figura 2.).

Por otro lado, *Chlorella vulgaris* CFE-M-002 la cual es un referente debido a que esta especie ha sido utilizada como organismo modelo por su ciclo de vida corto y rutas metabólicas similares a plantas superiores, ha sido extensamente estudiada y comprobado su potencial antioxidante (Olasehinde, Odjadjare, Mabinya, Olaniran, & Okoh, 2019; Silva et al., 2018). *Chlorella* es además el género de microalgas que más se comercializa como suplemento nutricional y fuente de proteína principalmente ya que se ha confirmado que son una fuente segura de consumo (Muys et al., 2019). Por esta razón, se puede observar en la Figura 3. que *Chlorella vulgaris* CFE-M-002 destaca por su contenido de compuestos fenólicos y flavonoides con respecto al resto de cepas.

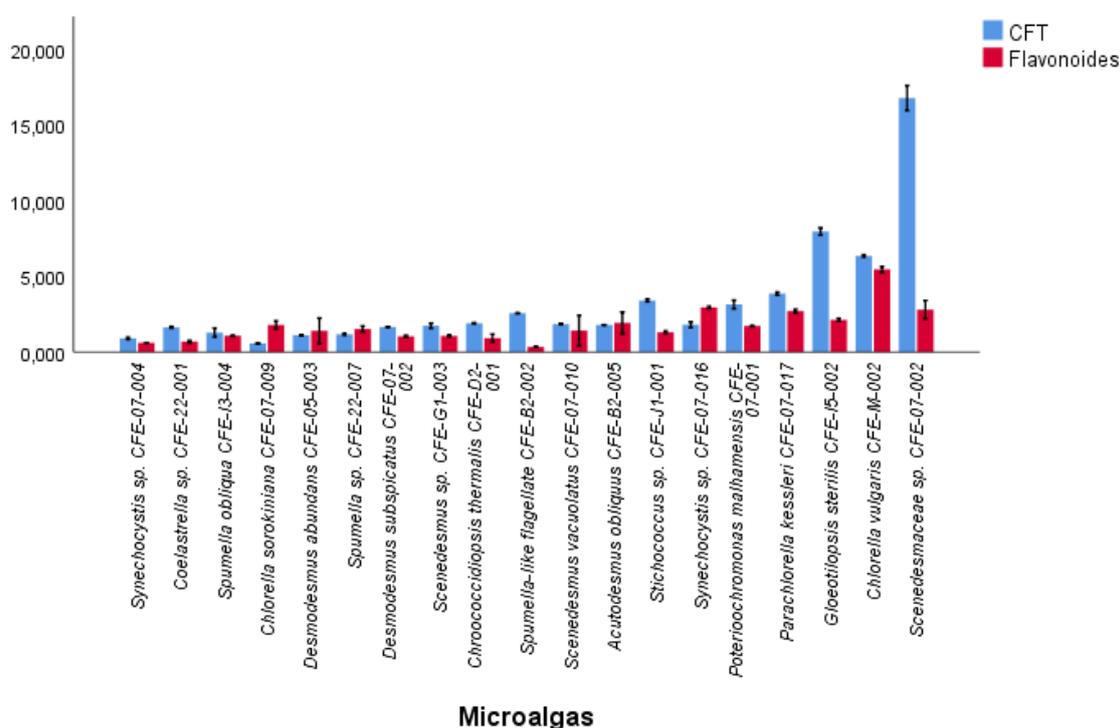


Figura 3. Contenido Fenólico Total (CFT) y de flavonoides de las 19 OTUs analizadas. Los valores representan la media \pm Error estándar. Los resultados se expresan como mg Equivalentes ácido gálico para los polifenoles y como mg Equivalentes de catequina, por g de microalga peso seco, para los flavonoides.

Estudios similares realizados por Miranda, Sato, & Mancini-Filho (2001) utilizaron el método Folin-Ciocalteu para determinar los compuestos fenólicos a partir de un extracto metanólico de *Chlorella vulgaris*. Como variable para obtener un mayor rendimiento, cultivaron la cepa a diferentes temperaturas y a 30 °C obtuvieron 24,95 mg·g⁻¹ demostrando así la plasticidad metabólica de estos microorganismos al ser capaces de secretar metabolitos secundarios como respuesta a la exposición a estrés abiótico (Olasehinde et al., 2019). En el presente estudio, *Chlorella vulgaris* CFE-M-002 obtuvo 6,353 mg EAG·g⁻¹ siendo cultivada a 23±2 °C; sin condiciones de estrés. De las 19 OTUs analizados, es la tercera cepa con mayor concentración de compuestos fenólicos, demostrando el potencial antioxidante que posee aun siendo cultivada a temperatura ambiente. Mediante la bibliografía se puede inferir que no se necesitan grandes variaciones de temperatura con respecto a la que se utilizó en este estudio para aumentar la producción de estos compuestos, por lo que se recomienda probar esta variable con las cepas promisorias para estos antioxidantes.

Las diferencias en cuanto al contenido de biocompuestos activos fenólicos de extractos microalgales entre el presente estudio y la literatura consultada pueden deberse a si los compuestos son endógenos o secretados al medio, las diferentes condiciones de cultivo y según cada especie. Estudios han demostrado que existen diferencias específicas propias de cada especie en cuanto al manejo del estrés oxidativo, la producción de metabolitos secundarios y del perfil fenólico (Cirulis et al., 2013). Estas diferencias dependen aún más de las condiciones de crecimiento y del disolvente utilizado para la extracción (Goiris et al., 2012).

4.2.2. Correlación entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico

Se empleó tanto el ensayo FRAP, capaz de reaccionar con el hierro (II) y con el grupo de antioxidantes que contengan un grupo tiol, así como el ensayo DPPH que utiliza radicales orgánicos. De esta manera, al emplear conjuntamente los

dos métodos, se refleja con precisión todos los antioxidantes de una muestra (Hajimahmoodi et al., 2010).

A partir de estudios que probaron con diferentes fracciones como etil acetato, agua y hexano se ha logrado demostrar que el extracto metanólico es el más eficiente para extraer compuestos que presentan una mayor actividad antioxidante (Jerez-Martel et al., 2017; Senevirathne, Kim, Siriwardhana, & Ha, 2006). Por lo cual, en el presente estudio se utilizó metanol al 80% como solvente de extracción para todas las muestras.

Los resultados obtenidos por Morowvat & Ghasemi (2016) del ensayo DPPH y Folin-Ciocalteu sugieren que gran parte de la actividad antioxidante de las cinco cepas de microalgas estudiadas (*Dunaliella salina*, *Fischerella ambigua*, *Nostoc muscorum*, *Oocystis pusilla* y *Scenedesmus rubescens*) se debe a los compuestos fenólicos debido a la correlación de estos factores ($R^2=0,9316$). Obtuvieron que una especie del género *Scenedesmus* presentó el mayor potencial. De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación mediante la correlación de Pearson, se evidencia una correlación positiva altamente significativa (R^2 de 0,841) como se observa en la Figura 4. Los resultados concuerdan con lo reportado por Vijayavel & Anbuselvam, C. Balasubramanian, (2007) debido a que, de igual manera, fue *Scenedesmaceae* sp. *Tow 9/21 P-14w* CFE-22-002, del género *Scenedesmus*, la que presentó mayor potencial antioxidante de acuerdo a los ensayos DPPH y FRAP como se observa en la Figura 5. Esta alta actividad de eliminación de radicales libres de *Scenedesmaceae* sp. *Tow 9/21 P-14w* CFE-22-002, también podría estar relacionada con su interacción con el sistema antioxidante enzimático y no enzimático que atenúa el estrés oxidativo.

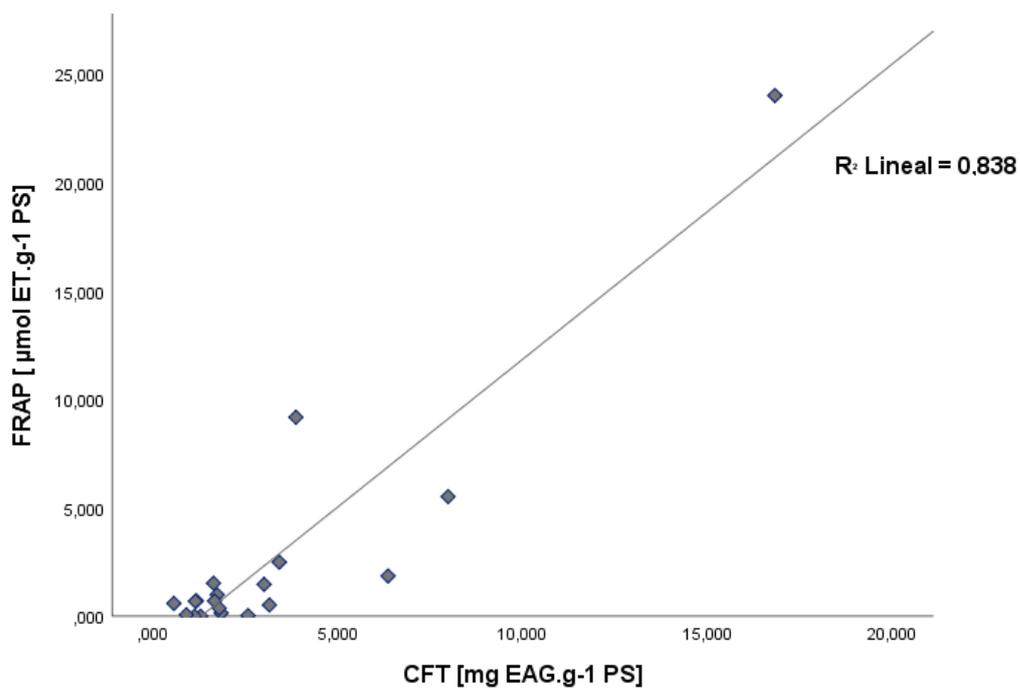
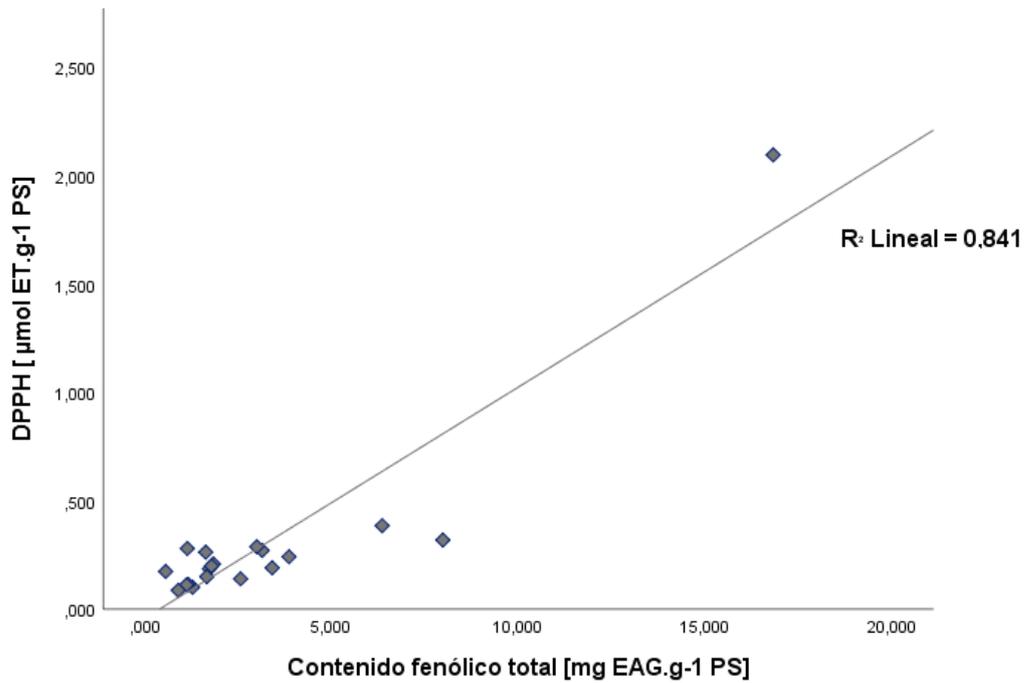


Figura 4. Correlación entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico total de las 19 OTUs analizadas.

En el primer gráfico de la Figura 4. se observa la correlación entre la capacidad medida por el método DPPH y el CFT medido por el método Folin-Ciocalteu.

En el segundo gráfico de la Figura 4. se observa la correlación entre el poder reductor medido por el ensayo FRAP y el CFT medido por el método Folin-Ciocalteu. Los valores de los ensayos DPPH y FRAP son expresados como μmol Equivalentes Trolox por g de microalga peso seco. El valor del CFT es expresado como mg Equivalentes ácido gálico por g de microalga peso seco.

En estudios realizados por Jerez-Martel y colaboradores (2017) en donde emplean RP-HPLC para la determinación del perfil fenólico, en lugar de Folin-Ciocalteu, los resultados confirman esta correlación debido a que obtuvieron valores de $R^2 > 0,997$ para cada compuesto fenólico analizado. El valor de R^2 del presente estudio no fue tan alto como el mencionado, probablemente a los tiempos de incubación de los protocolos, ya que investigadores han identificado inconvenientes del método DPPH, como por ejemplo, la reacción puede no estar completada cuando la absorbancia es medida y una subestimación de la capacidad antioxidante puede ocurrir (Pérez-Jiménez et al., 2008).

Por otro lado, Hajimahmood y colaboradores (2010) obtuvieron coeficientes de correlación significativos ($>0,9$ en la fracción etil acetato) entre los parámetros indicados empleando el ensayo FRAP, pudiendo de esta forma asegurar que los compuestos fenólicos son los de mayor contribución al poder reductor de los extractos de las 12 cepas de microalgas que evaluaron.

Estudios realizados empleando de igual manera el ensayo FRAP por Sawant, Animesh, Bhagwat, & Kelkar-Mane (2014) con diferentes especies de *Chlorella* obtuvieron un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,99$ en la fracción acuosa el cual indica la contribución de los compuestos fenólicos a la capacidad antioxidante de estas especies. Resultados similares fueron obtenidos por Goiris y colaboradores (2012) en donde examinaron 32 cepas mediante el

ensayo FRAP atribuyendo no solo a los carotenoides, sino también a los compuestos fenólicos, la capacidad antioxidante de las microalgas.

En este estudio realizado con microalgas de sistemas lacustres ecuatorianos se observó también que los compuestos fenólicos juegan un papel principal en el poder antioxidante de las microalgas mediante el mecanismo de reducción de iones férricos. Según los resultados obtenidos mediante la correlación de Pearson existe una correlación altamente significativa (R^2 de 0,838) como se observa en la Figura 4. Si bien no es tan alta la correlación como la determinada por Sawant y colaboradores (2014) puede deberse a que utilizaron diferentes solventes de extracción y estándares en su ensayo FRAP.

Sin embargo, hay resultados contradictorios ya que Li y colaboradores (2007) después de la evaluación de 23 cepas determinaron que no existe una correlación entre los polifenoles y poder reductor después de realizar el ensayo ABTS, el cual al igual que el DPPH estudia la habilidad del antioxidante para estabilizar un radical libre (Londoño, 2012). En ninguna de las fracciones probadas; hexano ($R^2 = 0.0075$), etil acetato ($R^2 = 0.5851$) y agua ($R^2 = 0.3599$) existe una correlación. Por lo que, no se puede inferir una conclusión definitiva acerca del rol de estos fitoquímicos y la capacidad antioxidante de las microalgas. Es por esto que el presente estudio ayuda al esclarecimiento de esta relación.

Resulta complejo correlacionar el perfil fenólico con el poder antioxidante de las muestras debido a que el ensayo Folin-Ciocalteu no es específico para compuestos fenólicos; al reaccionar con otras sustancias reductoras, este reactivo mide la capacidad reductora total de la muestra, incluyendo compuestos nitrogenados, complejos metálicos, derivados de vitaminas y ácidos orgánicos (Safafar et al., 2015). Por lo tanto, este procedimiento no da

una imagen completa de la cantidad o calidad de los compuestos fenólicos de la muestra (López, Rico, Rivero, & Tangil, 2011). Debido a esto, se puede inferir que cada extracto tiene diferentes clases de compuestos con su respectiva actividad antioxidante que pueden reaccionar de manera diferente con el reactivo Folin. De igual manera, se debería tomar en cuenta que estas mezclas de compuestos fenólicos pueden tener interacciones antagónicas, sinérgicas o aditivas entre ellos al momento de neutralizar radicales libres (Jacobo-Velazquez & Cisneros-Zevallos, 2009). También se debería considerar las diferentes polaridades, y por tanto su solubilidad, de cada grupo de compuestos antioxidantes presentes en los extractos (Stoica et al., 2013).

Por consiguiente, al momento de evaluar el potencial antioxidante de los extractos es necesario discutir no solo sobre los solventes de extracción sino también el perfil fenólico (López et al., 2011). Es por esto que, la determinación paralela de compuestos fenólicos específicos como flavonoides, taninos y antocianinas ayudan a esclarecer el aporte de los mismos en la capacidad antioxidante.

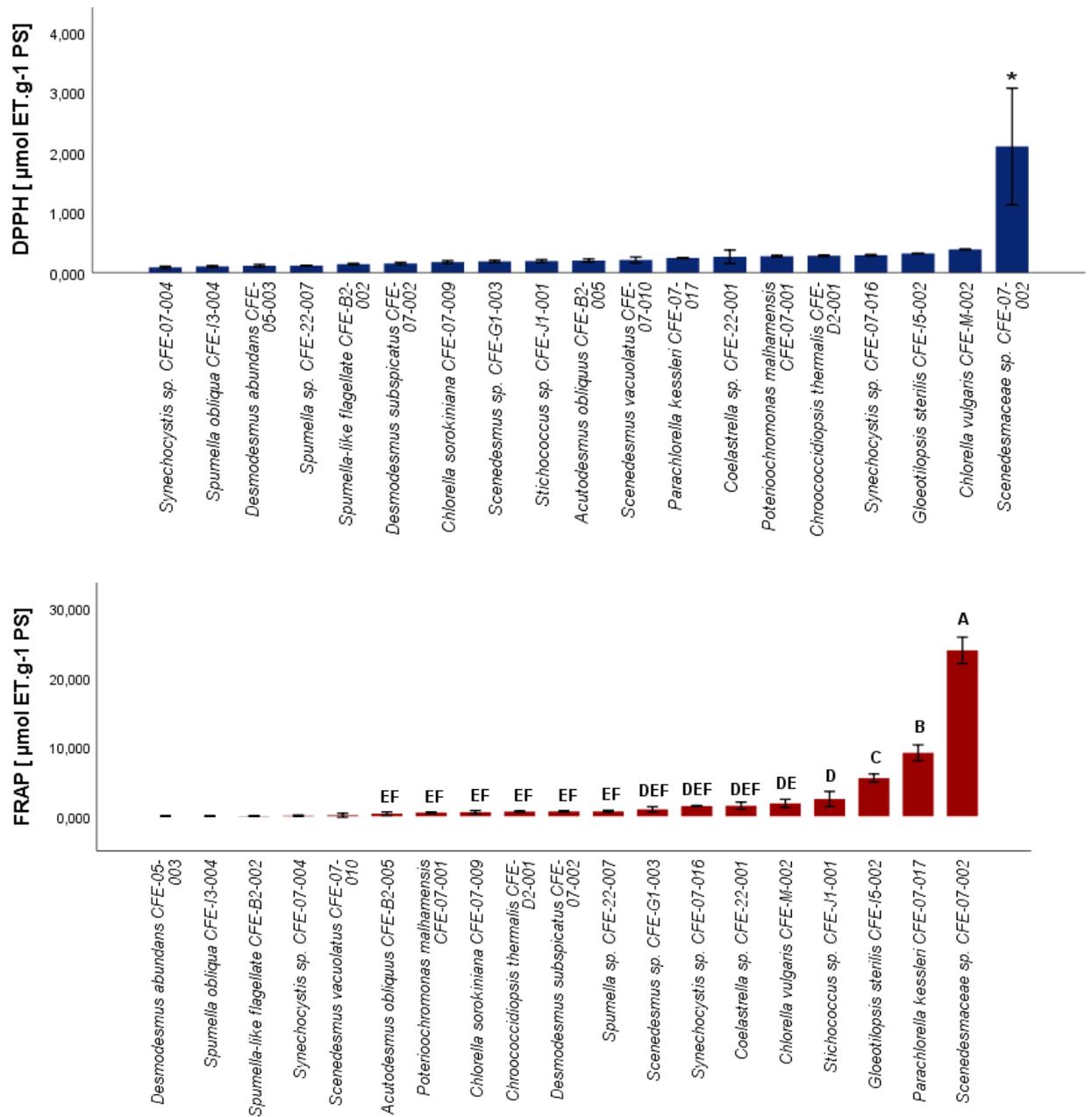


Figura 5. Actividad antioxidante de los extractos microalgales de las 19 OTUs analizadas.

En el primer gráfico de la Figura 5. se observa la actividad captadora de radicales medida por el ensayo DPPH (* representa diferencia significativa). Mientras que en el segundo gráfico de la Figura 5. Se observa el poder reductor medido por el ensayo FRAP. Los valores representan la media ± Error

estándar. Los resultados se expresan como μmol Equivalentes Trolox por g de microalga peso seco. Las medias con diferentes letras son diferentes significativamente (Tukey's HSD, $p < 0.005$).

4.2.3. Flavonoides

Se registraron diferencias considerables en los resultados de contenido de flavonoides dentro del mismo género *Chlorella*. *C. vulgaris* CFE-M-002 obtuvo 5,462 mg EC·g⁻¹ indicando el mayor contenido entre los 19 OTUs analizados; a comparación de *Chlorella sorokiniana* CFE-07-009, la cual obtuvo una concentración de 0,085 (Figura 6). No obstante, se sabe que la variabilidad del valor nutricional existe no solo entre especies y cepas, sino también dentro de la misma especie. Depende de los parámetros tales como la temperatura, el pH, la concentración de nutrientes, la calidad e intensidad de luz (Olasehinde et al., 2019). *Chlorella vulgaris* CFE-M-002 proveniente del oriente del Ecuador, Sucumbíos, de la Reserva Biológica Limoncocha, presentó mayores concentraciones no sólo de flavonoides sino de metabolitos de interés en general con respecto a *Chlorella sorokiniana* CFE-07-009 proveniente de la sierra, de Pichincha. Las condiciones de ambas regiones del país pudieron haber influenciado y se demuestra también el potencial de especies encontradas en Áreas Protegidas y Conservadas del Ecuador.

Las investigaciones se han enfocado principalmente en microalgas eucariotas para la determinación de estos compuestos (Goiris, Muylaert, Voorspoels, Noten, & De Paepe, 2014). Por lo que, resulta interesante que la segunda cepa con mayor contenido de flavonoides es la microalga procariota *Synechocystis* sp. CFE-07-016 (2,947 mg EC·g⁻¹) como se observa en la Figura 6. Si bien no existen reportes previos del contenido de flavonoides en este género, hay evidencia que las cianobacterias son capaces de producir fitonutrientes y pigmentos de con potencial antioxidante. Esto se demuestra con estudios realizado por Hossain, Ratnayake, Meerajini, & Wasantha Kumara (2016) en donde evaluaron 4 especies de cianobacterias (*Oscillatoria* sp., *Lyngbya* sp.,

Microcystis sp. y *Spirulina* sp.) y obtuvieron concentraciones de flavonoides totales en un rango de 392-664 mg Equivalentes quercetina·g⁻¹, sin embargo, utilizaron quercetina como estándar.

La mayoría de los estudios de flavonoides en microalgas se han enfocado en determinar qué tipos de estos compuestos están presentes utilizando técnicas más sensibles. Goiris, Muylaert, Voorspoels, Noten, & De Paepe (2014) identificaron apigenina, luteolina, quercetina, entre otros mediante Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento / Espectrometría de Masas Bidimensional (UHPLC-MS/MS), en siete clases de microalgas y su concentración varió de 0,2 a 14 ng·g⁻¹. Por otro lado, Kováčik, Klejdus, & Bačkor (2010) identificaron en *Scenedesmus quadricauda* los flavonoles quercetina (2–4 µg·g⁻¹) y kaempferol (4–7 µg·g⁻¹) mediante HPLC. En el presente estudio se analizó *Scenedesmus* sp.CFE-G1-003 y se obtuvo un valor de 1,064 mg EC·g⁻¹). Sin embargo, esto refleja el valor de flavonoides totales. Por lo tanto, resulta complicado comparar con bibliografía ya que los valores de estos estudios se presentan en un orden de magnitud más bajo ya que se enfocan en flavonoides específicos empleando métodos más sensibles.

El presente estudio da una pauta de las cepas que contienen mayores concentraciones de flavonoides a nivel basal como son (en orden descendente): *Chlorella vulgaris* CFE-M-002 (5,463 mg EC·g⁻¹), *Synechocystis* sp. KUMCC CFE-07-016 (2,947 mg EC·g⁻¹) y destacándose nuevamente, *Scenedesmaceae* sp. *Tow 9/21 P-14w* CFE-22-002 (2,800 mg EC·g⁻¹) (Figura 6). La precisión de los resultados obtenidos espectrofotométricamente de los flavonoides pudieron haberse visto afectados ya que al tratarse de muestras complejas, interfieren otros compuestos, principalmente los pigmentos (Safafar et al., 2015). Además, este tipo de análisis espectrofotométricos no considera las diferencias en los perfiles fenólicos que pueden cualitativos (tipo de flavonoides presentes) y cuantitativos (las cantidades relativas o proporciones

de cada tipo de flavonoides presente) entre las muestras analizadas (Jacobovelazquez & Cisneros-Zevallos, 2009).

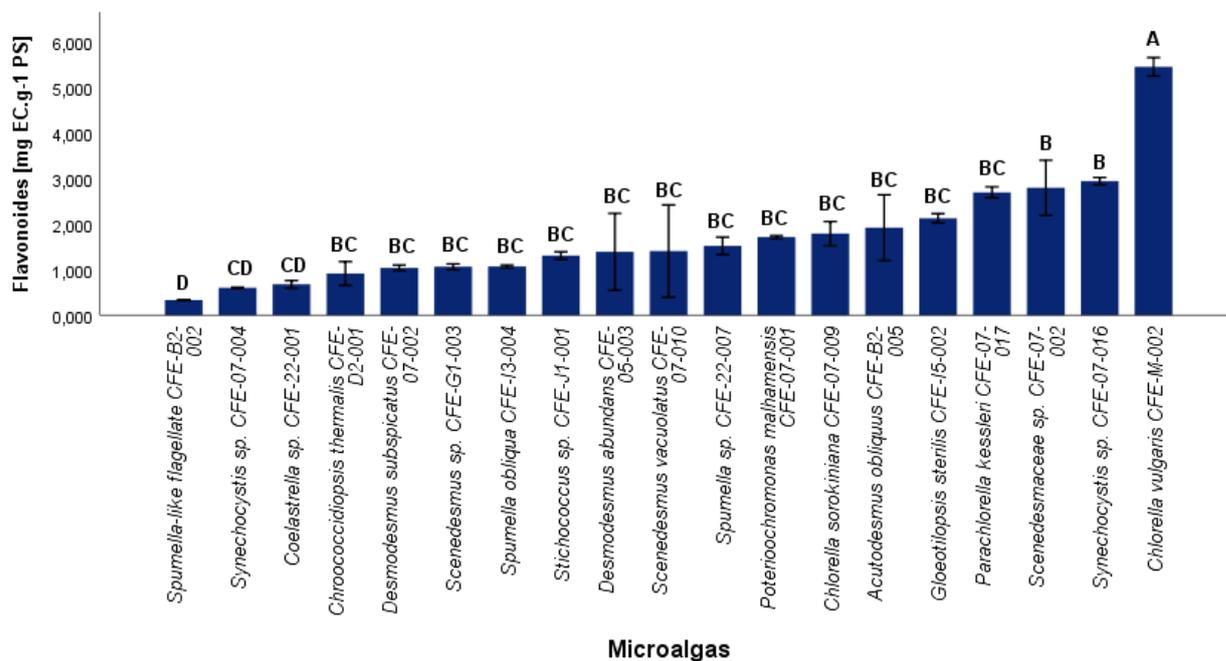


Figura 6. Contenido de flavonoides de las 19 OTUs analizadas. Los valores representan la media \pm Error estándar. Los resultados se expresan como mg Equivalentes ácido catequina por g de microalga peso seco. Las medias con diferentes letras son diferentes significativamente (Tukey's HSD, $p < 0.005$).

4.2.4. Taninos

Estudios realizados por Abdala-Díaz, Cabello-Pasini, Márquez-Garrido, & Figueroa, 2014 evidenciaron que el floroglucinol, unidad monomérica de los florotaninos, se encontraba únicamente en las algas pardas marinas pertenecientes a la clase Phaeophyceae. Sin embargo, estudios recientes realizados por Goiris, Muylaert, Voorspoels, Noten, & De Paepe (2014), reportaron por primera vez la presencia de floroglucinol en microalgas (Ochrophyta, Haptophyta, Chlorophyta y Cyanobacteria) en concentraciones que varían de $39\text{--}81 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Agregán y colaboradores (2018) confirmaron este hallazgo cuando realizaron una comparación entre la composición fenólica, tanto de macro como de microalgas y encontraron que, aunque en una menor

concentración, las microalgas contienen florotaninos. Demostraron también que, la capacidad antioxidante de las macroalgas se debe principalmente a estos potentes compuestos antioxidantes por lo que se justifica su análisis en el presente estudio. Este compuesto presenta fuertes propiedades antioxidantes (Quéguineur et al., 2012) por lo cual su contribución al contenido fenólico total y actividad antioxidante de las microalgas estudiadas es substancial.

De la misma manera que las antocianinas en microalgas, la literatura con respecto a este tipo de compuestos fenólicos se enfoca en macroalgas o plantas terrestres y reporta valores de un tipo de taninos específico, detectado con HPLC o utilizando floroglucinol como estándar.

En el presente estudio *Chlorella vulgaris* CFE-M-002 obtuvo una concentración de 1,504 mg EAT·g⁻¹. Similar a este resultado, reportes previos realizados por Wu, Ho, Shieh, & Lu (2005) determinaron un valor de 1,44 +/- 0,04 mg ácido tánico·g⁻¹ con la misma especie de microalga. Sin embargo, los investigadores reportaron que otras especies como *Spirulina* producen hasta cinco veces más contenido fenólico que *Chlorella*. De la misma forma, en este estudio, *Chlorella vulgaris* no obtuvo alto contenido de taninos. Los resultados de los extractos de las microalgas muestran una gran variación de valores entre las cepas dentro de la misma clase de algas. Por ejemplo, dentro de las mismas Merismopediaceae, *Synechocystis* sp. CFE-07-016 obtuvo la concentración más alta de las 19 cepas analizadas; 2,666 mg EAT·g⁻¹ mientras que *Synechocystis* sp. CFE-07-004 obtuvo 0,281 mg EAT·g⁻¹.

El mismo caso se puede evidenciar con las Ochrophyta, *Spumella-like flagellate* CFE-B2-002 obtuvo una concentración de 1,213 mg EAT·g⁻¹ mientras que *Spumella* sp. CFE-22-007 obtuvo valores no detectables (Figura 7). Por lo que, a partir de este estudio se puede inferir que al ser notables las variaciones

de taninos, o sus precursores, dentro del mismo género pueden ser los factores de estrés o condiciones de los sitios en que fueron colectadas las cepas las que influyen en su producción. Aunque otros autores (Assunção et al., 2016) también reportaron este tipo de variación en determinación de compuestos fenólicos dentro de diferentes cepas de la misma especie o familia. Por lo cual, se debería caracterizar molecularmente la cepa para confirmar si se trata de características propias de la especie.

Asimismo, la detección de taninos es más compleja y suele presentar inconvenientes al existir dos tipos; hidrolizables y condensados que originan la precipitación de sólido durante la reacción en las muestras microalgales. De acuerdo a La (2012) no hay un método ampliamente aceptado para cuantificar taninos de manera simple y eficaz en varias muestras.

Adicionalmente, según Wu y colaboradores (2005) reportan haber empleado ácido tánico como estándar para la determinación de polifenoles totales. Sin embargo, en el presente estudio se empleó un protocolo que utiliza ácido tánico como estándar con el cual fue posible determinar con éxito el contenido de taninos totales en microalgas. Al haber utilizado un estándar diferente al floroglucinol no se puede comparar con otros estudios existentes en el área de la ficología. Si bien la presente metodología no indica la presencia de la unidad monomérica floroglucinol específicamente, reporta contenido de taninos totales con diferentes grados de polimerización. Por lo tanto, es importante realizar un estudio de los tipos de taninos presentes en la muestra ya que se entiende que la intensidad de la actividad antioxidante de estos polifenoles complejos está relacionada con su grado de polimerización (Elena, Miguel, A., & Castro-Puyana, 2014).

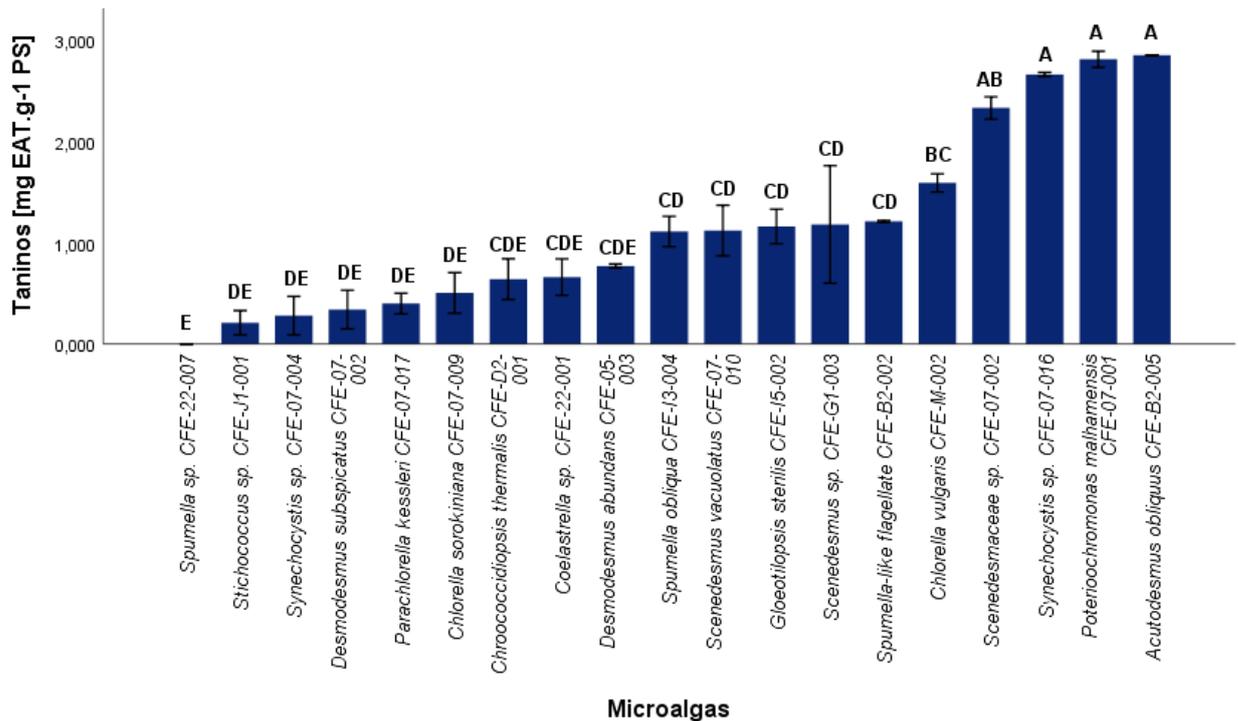


Figura 7. Contenido de taninos en las 19 OTUs analizadas. Los valores representan la media \pm Error estándar. Los resultados se expresan como mg Equivalentes ácido tánico por g de microalga peso seco. Las medias con diferentes letras son diferentes significativamente (Tukey's HSD, $p < 0.005$).

4.2.5. Antocianinas

La mayoría de estudios sobre antocianinas se han realizado en plantas, pero a partir de éstos, se sabe que estos pigmentos sirven como protectores de los tejidos fotosintéticos contra el estrés oxidativo inducido por la luz (Glover & Martin, 2012; Solovchenko, 2010). Se conoce también que son pigmentos inestables en solución y varían su coloración de acuerdo al pH, la interacción con otros pigmentos y si forman complejos con otros metales (Appelhaagen et al., 2018). Pueden ser estos los casos de las microalgas y que de igual manera, el pH y metales traza del medio de cultivo (ANEXO 2) altere su pigmentación. No obstante, estudios sobre el contenido y el rol de las antocianinas específicos para estos microorganismos son necesarios.

Stafford (1990) asegura que, a pesar de la existencia de reportes ocasionales sobre la ocurrencia de antocianinas en algas, resulta difícil encontrarlas en estos organismos. Siendo así, este estudio resulta pionero en cuanto a la presentación de concentraciones específicas de antocianinas en microalgas empleando métodos espectrofotométricos.

De acuerdo a Bajhaiya, Ziehe Moreira, & Pittman (2007) es escasa la presencia de antocianinas en microalgas, lo que concuerda con los valores presentados. Además, posiblemente en los casos donde no se detectaron las antocianinas se debe a que las cepas no sintetizan este compuesto. Otro motivo pudo ser que las concentraciones no estaban dentro de los límites de detección del método utilizado. No obstante, es importante su análisis ya que al ser parte de los antioxidantes naturales extraídos a partir de microalgas, pueden contribuir al efecto sinérgico que potencia su actividad antioxidante (Mäki-Arvela et al., 2014).

Siendo así, es importante realizar la determinación de estos compuestos de las cepas de la colección CFE-UDLA *Parachlorella kessleri* CFE-07-017 (0,0006 mg EP·g⁻¹), *Chlorella sorokiniana* CFE-07-009 (0,0005 mg EP·g⁻¹) y *Desmodesmus subspicatus* CFE-07-002 (0,0005 mg EP·g⁻¹) los cuales presentaron mayores concentraciones en los análisis de antocianinas (Figura 8). La estandarización de esta metodología para estos microorganismos es importante debido a que, según se ha visto en plantas, las diferencias en los ambientes de crecimiento, los factores genéticos y los métodos de preparación y extracción, contribuyen a la variabilidad en las antocianinas (Wallace & Giusti, 2014).

4.2.6. Clorofila a

El presente estudio empleó el método espectrofotométrico que analiza algunas longitudes de onda seleccionadas para medir la concentración de clorofila a en

las microalgas. La acetona al 90% es el solvente de extracción que tradicionalmente se ha empleado para este tipo de análisis (Johan, Jafri, Lim, & O, 2014). Sin embargo, en el presente estudio se empleó etanol absoluto de acuerdo a las recomendaciones de Kim (2015) y Ritchie (2006).

Estudios realizados en *Chlorella* sp. por Yu, Oo, Su, & Kyaw, (2017) reportan un contenido de clorofila *a* de 0,00845 mg·mL⁻¹ empleando un método espectrofotométrico utilizando acetona al 90% como solvente de extracción. En el presente estudio *Chlorellavulgaris* CFE-M-002 obtuvo un valor de 0,4 mg·mL⁻¹ (Tabla 6). Sin embargo, estudios realizados por Johan, Jafri, Lim, & O (2014) en donde utilizaron de igual manera acetona al 90% para el análisis de microalgas a partir de muestras ambientales obtuvieron resultados en el rango de 0,00053 – 0,00358 mg·mL⁻¹. En el presente estudio el promedio de clorofila *a* obtenido fue de 100 mg·mL⁻¹.

Cabe mencionar que este tipo de método espectrofotométrico sirve para determinar la concentración de clorofila *a* en microalgas para analizar su densidad y biomasa en ecosistemas acuáticos. Los investigadores utilizan información para evaluar el nivel nutricional o estado trófico del agua (Johan et al., 2014). Es decir, el método no fue el más adecuado ya que se enfoca en el análisis del rol ambiental de estos microorganismos. Para la cuantificación de este pigmento a partir de cultivos puros de una colección con fines nutraceuticos se recomienda emplear un método más sensible. Halim, Hosikian, Lim, & Danquah (2010) analizaron diferentes métodos de extracción de clorofila *a* a partir de biomasa microalgal pura y confirman esta teoría ya que reportan que métodos como la extracción con fluidos supercríticos es superior a la extracción con disolventes orgánicos. De igual manera, otros autores (S.-K. Kim, 2015; Santos, 2003) recomiendan la cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) con estándares específicos como método para determinar la cantidad de clorofila en los organismos fotosintéticos como las microalgas.

De igual manera, resulta complicado comparara con bibliografía debido a que se emplean diferentes ecuaciones y algoritmos para el cálculo de clorofila *a* en muestras de algas como las determinadas por Jeffery & Humphrey (1975), Porra (1991) y Rowan (1989). Inclusive, en el presente estudio se empleó una ecuación modificada de una de las originales previamente mencionada. Es necesario entonces estandarizar un conjunto consistente de ecuaciones para el cálculo de clorofila ya sea de muestras ambientales o microalgas cultivadas Ritchie (2006).

Por otro lado, se puede atribuir a la elección del solvente las concentraciones presentadas. Si bien la medición de clorofila *a* en acetona fría es mucho más largo y costoso que otros solventes (Johan, Jafri, Lim, & O, 2014), se puede evidenciar que se logra mayor especificidad que con etanol. Los resultados posiblemente fueron afectados ya que se pudieron haber extraído y medido otro tipo de moléculas biológicas. Al emplear métodos espectrofotométricos, la presencia de otros pigmentos como la clorofila *b* con sus respectivos productos de degradación actúan como los principales interferentes al momento de determinar clorofila *a*. Este método puede o bien subestimar o sobreestimar su concentración debido a que estos interferentes (siendo los principales los productos de degradación feofitina y clorofilida) absorben cerca de la misma longitud de onda que la clorofila *a*, afectando su cuantificación (Santos, 2003). Por otro lado, de acuerdo a la investigación realizada por Simon & Helliwell (1998) la disrupción celular es muy importante ya que aún si se utiliza un método adecuado solamente un cuarto de la clorofila puede ser extraída si no se realiza este proceso previo. Por ende, los bajos resultados reportados en este estudio pueden corresponder a esta pequeña fracción ya que no se realizó este paso previo.

De manera general, como se puede evidenciar en la Tabla 6, utilizando el mismo método para analizar un grupo de cepas las concentraciones de clorofila no varían de manera significativa. Esto se debe a que estudios han demostrado que el contenido de clorofila *a* en relación al resto de pigmentos se mantiene constante en la mayoría de grupos de algas (Dere, Tohit, & Ridvan, 1998).

No obstante, fueron las dos cepas colectadas en la Amazonía las que presentaron un ligero incremento en la concentración con respecto a las otras cepas; *Stichococcus* sp. CFE-J1-001 (0,029 g·mL⁻¹) y *Desmodesmus abundans* CFE-05-003 (0,025 g·mL⁻¹) como se evidencia en la Tabla 6. Estas diferencias pueden ser explicadas por las propiedades específicas de la pared celular y la capa de mucílago de estas especie (Schumann, Häubner, Klausch, & Karsten, 2005). Parámetros como la estratificación de la intensidad lumínica y de la temperatura de los sitios de colecta pudieron también haber promovido la acumulación de este pigmento.

Por otro lado, las concentraciones más bajas reportadas fueron de *Coelastrella* sp. CFE-22-001, *Spumella oblique* CFE-I3-004 y *Spumella* sp. CFE-22-007 (todas: 0,002 g·mL⁻¹) (Tabla 6). El factor que podría explicar estas concentraciones puede ser la fase de crecimiento de las cepas al momento de la extracción. La cantidad de clorofila extraída a partir de microalgas está correlacionada con estas fases; al extraer en la fase estacionaria se obtiene una cantidad significativamente mayor de clorofila en comparación a la logarítmica (Schumann et al., 2005).

Por lo tanto, se recomienda el empleo de un método más sensible para el análisis de clorofila de *Stichococcus* sp. CFE-J1-001 y *Desmodesmus abundans* CFE-05-003. Para este propósito, la literatura consultada enfatiza la importancia de identificar las condiciones óptimas para la producción. Esto

debido a que por lo general no todas las condiciones que incrementan la acumulación de clorofila celular resulta en una mayor productividad, ya que estas condiciones afectan el crecimiento celular y por lo tanto la biomasa total (Ferreira & Sant, 2017).

Tabla 6.
Resultados de ensayo espectrofotométricos de los 19 OTUs.

OTU	Identificación	Fenoles		Carotenoides			Clorofila a [µg·L ⁻¹]	Vitamina C [µg·g ⁻¹ PS]	
		CFT [mg EAG·g ⁻¹ PS]	Flavonoides [mg EC·g ⁻¹ PS]	Taninos [mg EAT·g ⁻¹ PS]	Antocianinas [mg EP·g ⁻¹ PS]	β-caroteno [mg·g ⁻¹ PS]			Luteína [mg·g ⁻¹ PS]
1	<i>Coelastrella</i> sp. CFE-22-001	1,633 ± 0,004	0,06 ± 0,004	0,662 ± 0,006	n.d.	0,195 ± 0,006	0,201 ± 0,011	0,002 ± 0,002	49,8 ± 0,017
3	<i>Chlorella sorokiniana</i> CFE-07-009	0,56 ± 0,002	1,792 ± 0,012	1,013 ± 0,007	0,0005 ± 0,015	0,243 ± 0,008	0,143 ± 0,004	0,005 ± 0,006	236 ± 0,000
5	<i>Chlorella vulgaris</i> CFE-M-002	6,354 ± 0,006	5,463 ± 0,009	1,504 ± 0,003	n.d.	0,525 ± 0,022	0,526 ± 0,032	0,0004 ± 0,001	n.d.
6	<i>Spumella obliqua</i> CFE-I3-004	1,283 ± 0,023	1,067 ± 0,001	1,112 ± 0,005	0,0002 ± 0,014			0,002 ± 0,002	n.d.
7	<i>Spumella</i> sp. CFE-22-007	1,169 ± 0,005	1,523 ± 0,008	n.d.	n.d.	0,075 ± 0,005	0,183 ± 0,004	0,002 ± 0,007	n.d.
8	<i>Spumella-like flagellate</i> CFE-B2-002	2,566 ± 0,002	0,331 ± 0,000	1,213 ± 0,000	0,0002 ± 0,002				
9	<i>Scenedesmus</i> sp. CFE-G1-003	1,73 ± 0,013	1,064 ± 0,003	1,474 ± 0,019	0,0002 ± 0,004	0,004 ± 0,000	n.d.	0,013 ± 0,009	n.d.
11	<i>Stichococcus</i> sp. CFE-J1-001	3,411 ± 0,007	1,308 ± 0,004	0,211 ± 0,004	0,0004 ± 0,013			0,029 ± 0,005	n.d.
12	<i>Scenedesmus vacuolatus</i> CFE-07-010	1,839 ± 0,003	1,408 ± 0,029	1,122 ± 0,008	n.d.	0,457 ± 0,056	0,261 ± 0,008	0,013 ± 0,014	32,9 ± 0,002
13	<i>Gloeotilopsis sterilis</i> CFE-I5-002	7,978 ± 0,019	2,131 ± 0,004	1,163 ± 0,006	n.d.	0,356 ± 0,001	0,390 ± 0,056		n.d.
17	<i>Desmodesmus subspicatus</i> CFE-07-002	1,66 ± 0,001	1,039 ± 0,003	0,341 ± 0,006	0,0005 ± 0,001			0,014 ± 0,004	n.d.
18	<i>Scenedesmeaceae</i> sp. CFE-07-002	3,862 ± 0,008	2,8 ± 0,026	2,336 ± 0,004	n.d.				
20	<i>Parachlorella kessleri</i> CFE-07-017	3,144 ± 0,022	2,701 ± 0,005	0,401 ± 0,003	0,0006 ± 0,057	0,205 ± 0,016	0,347 ± 0,017	0,012 ± 0,018	22,7 ± 0,001
21	<i>Potriochromonas malhamensis</i> CFE-07-001	16,819 ± 0,063	1,715 ± 0,001	2,817 ± 0,003	0,0001 ± 0,004	0,141 ± 0,018	0,194 ± 0,011	0,014 ± 0,018	n.d.
22	<i>Acutodesmus obliquus</i> CFE-B2-005	1,787 ± 0,001	1,923 ± 0,031	2,857 ± 0,000	n.d.			0,012 ± 0,013	147,32 ± 0,022
24	<i>Desmodesmus abundans</i> CFE-05-003	1,117 ± 0,002	1,392 ± 0,031	0,771 ± 0,001	0,0001 ± 0,005	0,348 ± 0,010	0,321 ± 0,006	0,025 ± 0,001	
Y1	<i>Synechocystis</i> sp. CFE-07-016	3 ± 0,014	2,947 ± 0,003	2,666 ± 0,001	n.d.	0,371 ± 0,014	0,109 ± 0,000	0,003 ± 0,048	81 ± 0,000
Y2	<i>Chroococcidiopsis thermalis</i> CFE-D2-001	1,14 ± 0,003	0,916 ± 0,011	0,642 ± 0,007	0,0003 ± 0,011	0,157 ± 0,009	0,149 ± 0,001		
Y4	<i>Synechocystis</i> sp. CFE-07-004	0,898 ± 0,006	0,6 ± 0,001	0,281 ± 0,006	0,0003 ± 0,006	0,227 ± 0,005	0,267 ± 0,004	0,005 ± 0,004	n.d.

Nota: n.d. = no detecta

4.3. Ensayos mediante HPLC

4.3.1. Carotenoides

De las 19 OTUs, 12 fueron del orden Chlorophyta. Las especies de este filo se caracterizan por producir altas concentraciones de carotenoides primarios como beta-caroteno y secundarios como la neoxantina y violaxantina. Estudios han demostrado el alto potencial antioxidante de estos compuestos (Del Campo et al., 2000). Siendo así, se comprende la alta capacidad antioxidante obtenida de las cepas de este taxón en el presente estudio. Sin embargo, métodos más sensibles y el fraccionamiento son necesarios para determinar los compuestos responsables del secuestro de radicales libres durante los ensayos (Assunção et al., 2016).

Diferentes estudios han confirmado la contribución de los carotenoides a la capacidad antioxidante de las microalgas (Gong & Bassi, 2016; Rammuni et al., 2019; Safafar et al., 2015). Sin embargo, otros estudios realizados por Choochote & Suklampoo (2013) y Sawant, Animesh, Bhagwat, & Kelkar-Mane (2014) donde evaluaron la capacidad antioxidante tanto en fracciones acuosas como etanólicas de microalgas, encontraron que el mayor rendimiento se encontraba en la acuosa. Esta fase presenta un bajo contenido de carotenoides por el carácter lipofílico de estos compuestos (Gong & Bassi, 2016). Esto indica que los carotenoides no son los únicos que contribuyen al potencial antioxidante, sino que otro tipo de compuestos son también responsables de este efecto. Por lo cual se justifica el análisis del contenido fenólico, vitamina C y de clorofilas en las muestras.

Del género *Scenedesmus*, hay reportes que indican que el carotenoide primario de *Scenedesmus almeriensis* es la luteína seguida del beta-caroteno (Rammuni et al., 2019). De este género se realizaron los análisis de *Scenedesmus* sp. CFE-D4-001 y *Scenedesmus vacuolatus* CFE-07-010 y se obtuvo que ambos

carotenoides se encuentran en proporciones similares. Sin embargo, permanece pendiente la determinación de estos compuestos de *Scenedesmaceae* sp. Tow 9/21 P-14w CFE-22-002 la cual presenta alto potencial antioxidante para analizar si esta capacidad se debe a su perfil de carotenos.

Guedes, Amaro, Sousa-Pinto, & Malcata (2013) mencionan que las microalgas comúnmente utilizadas como fuentes de carotenoides pertenecen a la familia Chlorellaceae (*Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas* y *Haematococcus* sp.) ya que tienden a acumular estos biocompuestos como una parte intrínseca de su biomasa. Esta relación no concuerda con el presente estudio ya que la cepa que presentó mayor concentración tanto de beta-caroteno como luteína (0,887 y 0,583 mg·g⁻¹ biomasa respectivamente) fue *Scenedesmus* sp. CFE-D4-001, perteneciente a la familia Scenedesmaceae, seguida de *Chlorella vulgaris* CFE-M-002 que pertenece a Chlorellaceae y *Gloeotilopsis sterilis* CFE- I5-002 perteneciente a Ulotrachaceae como se observa en la Figura 7. Si bien todas pertenecen al filo Chlorophyta se ve que existe potencial en otras familias de microalgas, por lo cual no se puede generalizar que una es mayor productora de carotenoides. Por lo que se recomienda realizar estos análisis en las diferentes cepas aprovechando la biodiversidad que existe en la Colección.

La baja concentración de luteína por parte de *Synechocystis* sp. CFE-07-004 se debe a que algunas especies de microalgas poseen una pared celular rígida la cual puede ser un impedimento al momento de la extracción de estos biocompuestos (Zuluaga, Gueguen, Pavon-Djavid, & Letourneur, 2017). No obstante, Zuluaga, Gueguen, Pavon-Djavid, & Letourneur (2017) han reportado que *Synechocystis* sp. es estudiada debido a sus altos contenidos de zeaxantina por lo cual se debería realizar la cuantificación de este carotenoide con alto potencial antioxidante con las cepas que se tiene en la colección *Synechocystis* sp. CFE-07-004 y *Synechocystis* sp. CFE-07-016.

Othman, Noh, Hatta, & Jamaludin (2018) identificaron los carotenoides de seis especies del filo Chlorophyta a través de análisis en HPLC y obtuvieron que los principales fueron la luteína, beta-cryptoxantina y beta-caroteno. Sin embargo, su proporción varía de acuerdo a las especies. El género *Chlorella* presentó concentraciones substancialmente mayores de luteína y beta-caroteno; *Chlorella fusca* con $69,54 \pm 11,29 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco de luteína mientras que *Chlorella vulgaris* con $18,42 \pm 9,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco de beta-caroteno. Aún así, tanto *Chlorella vulgaris* CFE-M-002 ($0,525 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de beta-caroteno y $0,526 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de luteína) como *Chlorella sorokiniana* CFE-07-009 ($0,242 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de beta-caroteno y $0,142 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de luteína) del presente estudio, colectadas en sistemas lacustres ecuatorianos, presentan concentraciones mayores a las reportadas comprobando su potencial (Figura 7).

Se observó que resultó en una mejora significativa la estandarización del proceso de preparación de las muestras microalgales al eliminar el paso de la extracción con cloroformo antes de la saponificación. De esta manera se logró recuperar mayor cantidad de carotenoides debido a que estos compuestos bioactivos son más estables en su matriz natural que en los extractos (Christaki et al., 2015).

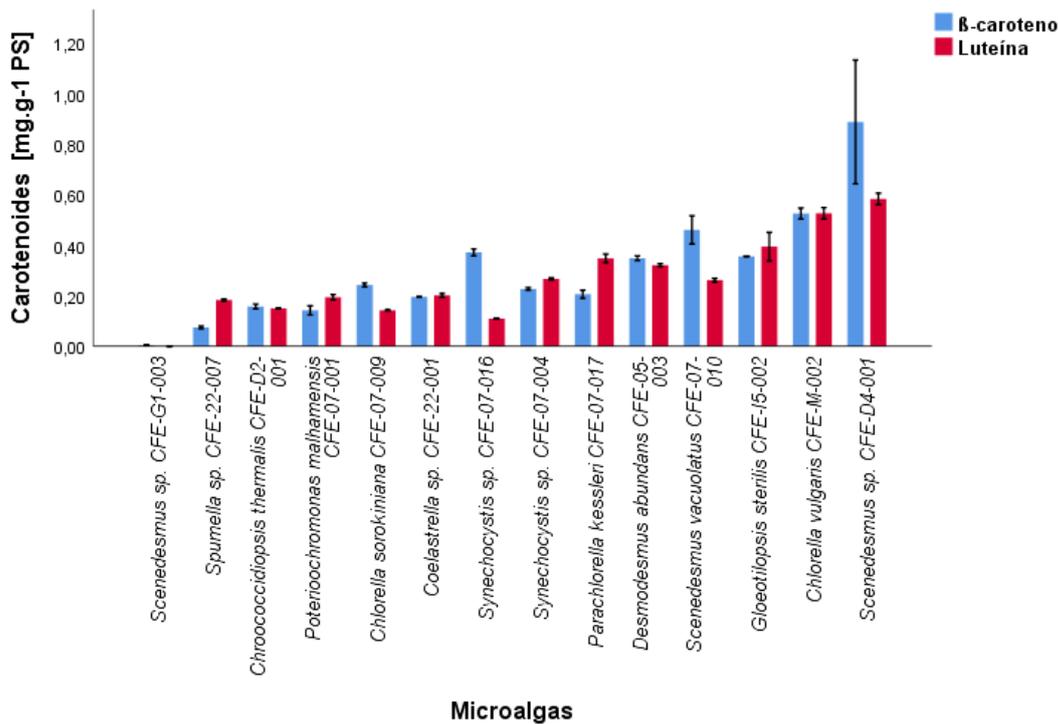


Figura 7. Concentración de β-caroteno y luteína de microalgas. Los valores representan la media ± Error estándar. Los resultados se expresan como mg por g de microalga peso seco.

La luteína al tener propiedades fisicoquímicas similares a la astaxantina (considerado el antioxidante más poderoso de la naturaleza) (Rammuni et al., 2019) puede ser estudiado y extraído para posteriores aplicaciones en el área de salud humana para prevenir o tratar la degeneración macular y enfermedades cardiovasculares o simplemente como suplemento. Especies que por literatura se sabe contienen luteína como carotenoide prominente en sus estructuras perteneces a los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* (*Chlorella protothecoides*, *Scenedesmus almeriensis*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*) (Zuluaga et al., 2017). Los resultados de este estudio son comparables con esta información ya que como se mencionó anteriormente éstos fueron los géneros que presentaron las mayores concentraciones. Por lo tanto, se recomienda realizar el respectivo análisis en HPLC de las cepas de estos géneros que hay en la CFE-UDLA, lo cual puede resultar interesante ya que algunas son posibles nuevas especies.

4.3.1.1. Correlación entre capacidad antioxidante y carotenoides

La correlación obtenida entre la actividad antioxidante medida por el ensayo DPPH y el contenido de carotenoides no fue significativa; $R^2 = 0,176$ para beta-caroteno (Figura 8) y $R^2 = 0,132$ para luteína. Maadane y colaboradores (2015) obtuvieron resultados similares sin una correlación entre estos dos parámetros ($R^2 = 0,154$), lo que sugiere que los carotenoides podrían no ser los principales contribuyentes a la capacidad antioxidante de las microalgas marinas.

Por otro lado, otras investigaciones (Choochote & Suklampoo, 2013; Feller et al., 2018; Jaime et al., 2005; Saranya, Hemalatha, Parthiban, & Anantharaman, 2014) observaron que el contenido de carotenoides desempeña un papel vital directo en las propiedades antioxidantes totales ya que a medida que aumenta el contenido de estos pigmentos, aumenta la actividad antioxidante total. Se explica ya que los carotenoides en general, carotenos y xantofilas, cumplen un papel importante en la extinción de los EROs generados durante la fotosíntesis (Munir et al., 2013).

Las inconsistencias en estos resultados pueden atribuirse a los ensayos espectrofotométricos utilizados para determinar la actividad antioxidante de los carotenoides. Los estudios realizados por Müller, Fröhlich, & Böhm (2011) identificaron grandes variaciones en la reactividad de los tipos de carotenoides en diferentes pruebas. Ellos evidencian que los carotenos tienen mayor actividad antioxidante que las xantofilas según el ensayo FRAP, pero obtuvieron resultados opuestos con el ensayo TEAC. Por lo tanto, estos métodos no solo están relacionados con la cantidad de estos pigmentos, sino también con las características específicas de los carotenoides (Goiris et al., 2012).

Por lo tanto, los resultados presentados pueden deberse a que la capacidad antioxidante no solo proviene del beta-caroteno y la luteína, sino de otros carotenoides presentados en microalgas con una fuerte capacidad antioxidante como la astaxantina, zeaxantina, violaxantina (Lemoine & Schoefs, 2010; Rammuni et al., 2019; Zhang, Duan, Huang, Zhang, & Wang, 2007; Zuluaga et al., 2017). Como resultado, las interacciones sinérgicas o aditivas entre ellos en el momento de neutralizar los radicales libres se podrían haber interferido ya que el perfil de los carotenoides no se tuvo en cuenta. Además, el resultado de estas correlaciones indica la posible participación de otros compuestos bioactivos que pueden actuar como antioxidantes, como clorofilas, polisacáridos de bajo peso molecular y compuestos sulfatados (Elsa et al., 2009; Mohan et al., 2014; Silva et al., 2018).

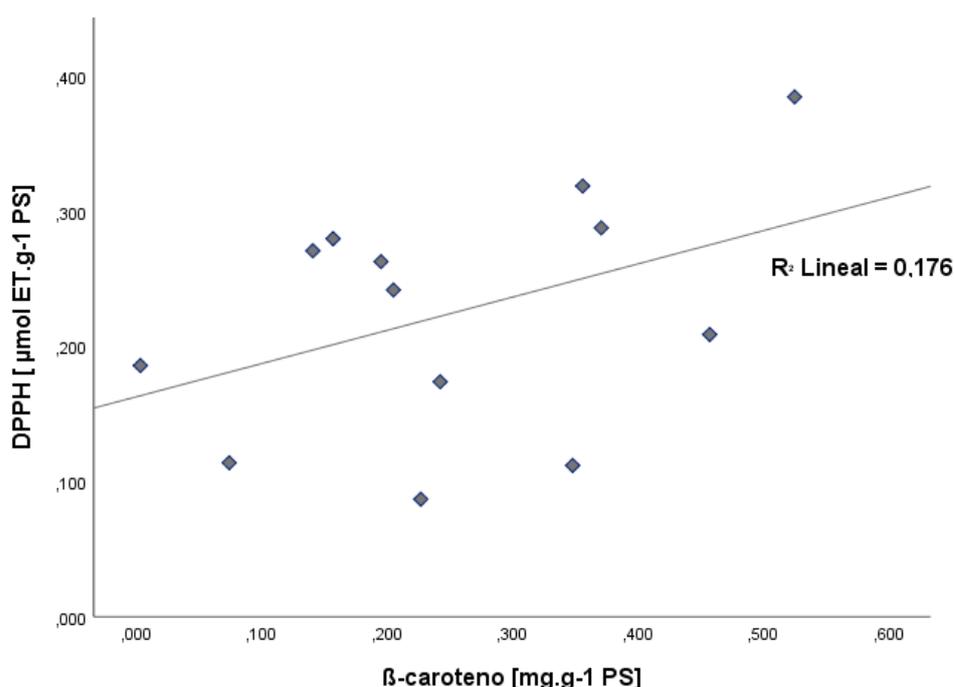


Figura 8. Correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de beta-caroteno de las OTUs analizadas. El valor del ensayo DPPH es expresado como µmol Equivalentes Trolox por g de microalga peso seco. El valor de beta caroteno es expresado como mg por g de microalga peso seco.

4.3.2. Vitamina C

Estudios mencionan la presencia de vitamina C en especies de *Chlorella* como mecanismo antioxidante enzimático, específicamente en *Chlorella vulgaris* tiene el rol de aumentar la afinidad de enzimas antioxidantes como la glutatión reductasa (Vijayavel & Anbuselvam, C. Balasubramanian, 2007). Inclusive Silva y colaboradores (2018) aseguran que el género *Chlorella* es rico en ácido ascórbico. Vaz, Moreira, Morais, & Costa (2016) de igual manera mencionan que las microalgas en general son una fuente de vitaminas como tocoferoles, ácido ascórbico, B1, B2, B3, B6, B9, B12, ácido fólico, entre otras. Existen únicamente reportes antiguos realizados por Fabregas & Herrero (1990) en donde analizaron el contenido vitamínico de *Chlorella stigmatophora* y obtuvieron que es capaz de producir 100,2 mg· g⁻¹ peso seco de ácido ascórbico. Los autores mencionan que las condiciones de cultivo fueron previamente optimizadas para una producción máxima de biomasa no obstante no se especifican cuáles.

En el presente estudio, *Chlorella sorokiniana* CFE-07-009 presentó la mayor concentración de vitamina C (236 µg·g⁻¹) (Figura 9), más que lo reportado en la bibliografía, comprobando así nuevamente que es un género con alto valor nutricional. Sin embargo, a la mayoría de cepas analizadas no se logró detectar contenido de vitamina C o presentaban valores muy bajos. Estos resultados pudieron haberse visto afectados por la temperatura a la cual se manipulaban las muestras y el tiempo que se tardó en realizar los análisis. Como mencionan Mendoza Corvis, Arteaga Márquez, & Pérez Sierra (2017). El ácido ascórbico se caracteriza por ser un constituyente termosensible que disminuye cuando se expone la biomasa a condiciones adversas de conservación.

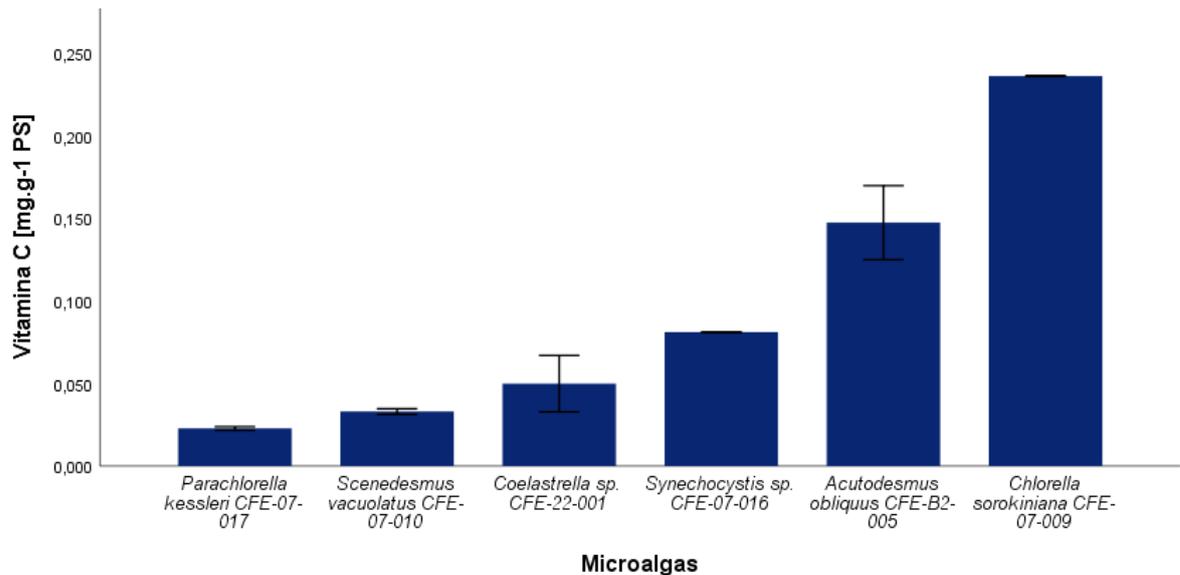


Figura 9. Concentración de Vitamina C en microalgas. Los valores representan la media \pm Error estándar. Los resultados se expresan como mg por g de microalga peso seco.

Resulta complicado comparar los resultados obtenidos en la presente investigación ya que existen pocos reportes de esta vitamina en microalgas y no especifican cómo lograr mejorar su rendimiento. Además se sabe que este contenido se ve afecto por el contenido de vitaminas propias del medio de cultivo por lo cual existen grandes variaciones inclusive dentro de la misma especie (Fabregas & Herrero, 1990).

Por lo tanto, al no existir literatura suficiente con respecto al contenido de vitamina C en microalgas, como lo reportado en plantas terrestres, se justifica la investigación respectiva. Además, es importante analizar este compuesto ya que es el antioxidante hidrosoluble más potente en el plasma sanguíneo humano y actúa como regenerador de la vitamina E en sistemas lipídicos (Stahl & Sies, 2003). Al tener interacciones sinérgicas con el beta-carotenopara la eliminación de las especies de nitrógeno reactivo, es necesario ver su

concentración para de esta manera poder analizar si este es el caso en las microalgas.

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

Las Áreas Protegidas y Conservadas del Ecuador presentan una biodiversidad de microalgas con potencial biotecnológico y bioquímico. Las 19 cepas identificadas molecularmente de la CFE-UDLA son capaces de sintetizar pigmentos y metabolitos secundarios polifenólicos con una diversidad de estructuras químicas las cuales se consideraban estaban únicamente presentes en plantas terrestres y macrofitas acuáticas. Se logró cuantificarlos mediante la estandarización de protocolos espectrofotométricos empleados en plantas y frutos. Las especies que destacan por su contenido compuestos fenólicos son *Scenedesmaceae* sp., *Gloeotilopsis sterilis* y *Chlorella vulgaris*.

El presente estudio ayudó a comprobar que son los compuestos fenólicos los principales contribuyentes a la actividad antioxidante de estos microorganismos mas no su contenido de carotenoides.

Las microalgas representan una fuente promisoría de carotenoides en donde destacan *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris*. Considerando los resultados obtenidos, se puede concluir que estos microorganismos tienen una composición bioquímica de interés ya que son capaces de sintetizar compuestos bioactivos antioxidantes con potencial aplicación en áreas nutraceuticas y farmacológicas.

5.2. Recomendaciones

Se sugiere continuar con los estudios a partir de las cepas prometedoras o con las posibles nuevas especies de microalgas de la CFE-UDLA en líneas celulares para un mejor entendimiento de las interacciones fenólicas ya que la

actividad antioxidante determinada no necesariamente predice la efectividad biológica de los extractos. La cepa *Scenedesmaceae* sp. *Tow 9/21 P-14w* CFE-22-002 presentó los valores más significativos en los estudios espectrofotométricos, por lo cual se recomienda realizar la continuación de los estudios; determinación de carotenoides, vitamina C y clorofila.

De igual manera, se recomienda aplicar uno o varios tipos de condiciones de estrés, y estandarizar los parámetros y condiciones de cultivo, para de esta manera alterar el metabolismo de las microalgas a favor del compuesto de interés que se desea producir

Se recomienda determinar mediante HPLC otros tipos de carotenoides como la cantaxantina, astaxantina y violaxantina, los cuales se sabe por bibliografía son producidos por las microalgas y poseen una alta capacidad antioxidante.

Por otro lado, se recomienda determinar mediante métodos como HPLC otros antioxidantes como los compuestos simples sulfatados, los florotaninos y bromofenoles los cuales son un rasgo distintivo de las microalgas con respecto a las plantas terrestres.

REFERENCIAS

- Abdala-Díaz, R. T., Cabello-Pasini, A., Márquez-Garrido, E., & Figueroa, F. L. (2014). Variación intratalo de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y actividad de la fenolsulfatasa en *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyceae) del sur de España. *Ciencias Marinas*, 40(1), 1–10. <https://doi.org/10.7773/cm.v40i1.2350>
- Agregán, R., Munekata, P., Franco, D., Carballo, J., Barba, F., & Lorenzo, J. (2018). *Antioxidant Potential of Extracts Obtained from Macro- (Ascophyllum nodosum, Fucus vesiculosus and Bifurcaria bifurcata) and Micro-Algae (Chlorella vulgaris and Spirulina platensis) Assisted by Ultrasound*. *Medicines*, 5(2), 33. <https://doi.org/10.3390/medicines5020033>
- Ahmad, S. (2012). *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. Springer Science & Business Media.
- Andes Spirulina. (2016). Spirulina Ecuador. Recuperado el 3 de febrero de 2019 de: <http://www.espirulinaecuador.com/>
- Andrade, L. M. (2018). *Chlorella and Spirulina Microalgae as Sources of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements; an Overview*. *MOJ Food Processing & Technology*, 6(1). <https://doi.org/10.15406/mojfpt.2018.06.00144>
- Apetrei, C. (2016). *Frontiers in Bioactive Compounds: Natural Sources, Physicochemical Characterization and Applications* (first). Sharjah: Bentham Science Publishers.
- Appelhagen, I., Wulff-Vester, A. K., Wendell, M., Hvoslef-Eide, A.-K., Russell, A. K., Oertel, A., Matros, A. (2018). *Colour bio-factories: Towards scale-up production of anthocyanins in plant cell cultures*. *Metabolic Engineering*, 48, 218–232.
- Assunção, M., Assunção, M. F. G., Amaral, R., Martins, C. B., Ferreira, J. D., Ressurreição, S., & Dias, S. (2016). *Screening microalgae as potential sources of antioxidants*, (March 2018). <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0980-7>
- Bajhaiya, A. K., Ziehe Moreira, J., & Pittman, J. K. (2017). *Transcriptional Engineering of Microalgae: Prospects for High-Value Chemicals*. *Trends in Biotechnology*, 35(2), 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.06.001>
- Baldev, E., Mubarakali, D., Dinesh Kumar, R., & Thajuddin, N. (2015). *Molecular phylogeny of morphologically diverse cyanobacteria based on ribosomal conserved sequence*. *Journal of Environmental Science and Technology*, 8(5), 188–197. <https://doi.org/10.3923/jest.2015.188.197>
- Ballard, C. R., Roberto, M., & Junior, M. (2019). *Bioactive Compounds Health Benefits and Potential Applications*. (M. R. Segura Campos, Ed.), *Bioactive Compounds*. Campinas: Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00010-4>
- Barclay, W., & Apt, K. (2013). *Handbook of Microalgal Culture_ Applied Phycology and Biotechnology*. (A. Richmond, Ed.) (Second Edi). Wiley-Blackwell.
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Boca Ratón, FL: CRC Press.
- Bellinger, E., & Sigeo, D. (2010). *Freshwater Algae Identification and Use as*

- Bioindicators Edward* (First edit). Chichester: Wiley-Blackwell.
- Benzie, I., & Strain, J. (1996). *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay*. *Analytical Biochemistry*, 76(239), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bharamurugan, G. L., Valerie, O., & Mark, L. (2018). *Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review*, 23(3), 229–241.
- Bold, H. C. (1949). *The Morphology of Chlamydomonas chlamydogama, Sp. Nov.* *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 76(2), 101–108.
- Brown, M. R., & Miller, K. A. (1992). *The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in mariculture*. *Journal of Applied Phycology*, 4, 205–215.
- Carr, A. C., & Frei, B. (1999). *Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans 1 – 3*, 1086–1107.
- Choochote, W., & Suklampoo, L. (2013). *Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae*. *Journal of Applied*, 26(1), 43–48. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0084-6>
- Christaki, E., Bonos, E., & Florou-Paneri, P. (2015). *Innovative Microalgae Pigments as Functional Ingredients in Nutrition*. In *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00014-5>
- Cirulis, J. T., Scott, J. A., & Ross, G. M. (2013). *Management of oxidative stress by microalgae*¹. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91(1), 15–21. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0249>
- Day, J. G., & Brand, J. J. (2006). *Cryopreservation Methods for Maintaining Microalgal Cultures*. In R. A. Andersen (Ed.), *Algal Culturing Techniques* (First). Amsterdam: Elsevier.
- De Jesus Raposo, M. F., De Morais, A., & De Morais, R. M. S. C. (2015). *Carotenoids from marine microalgae: A valuable natural source for the prevention of chronic diseases*. *Marine Drugs*. <https://doi.org/10.3390/md13085128>
- de la Calle, F. (2007). *Fármacos de origen marino*. *Les Biotechnologies*, 58, 141–155. <https://doi.org/10.2436/20.1501.02.50>
- Del Campo, J. A., Moreno, J., Rodríguez, H., Angeles Vargas, M., Rivas, J., & Guerrero, M. G. (2000). *Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in Muriellopsis sp. (Chlorophyta)*. *Journal of Biotechnology*, 76(1), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00178-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00178-9)
- Dere, Ş., Tohit, G., & Ridvan, S. (1998). *Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A , B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents*. *Turkish Journal of Botany*, 22, 13–17.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K., & Rui, H. (2002). *Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 3010–3014. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/31/22/002>
- Ebenezer, V., Medlin, L. K., & Ki, J. (2012). *Molecular Detection , Quantification , and Diversity Evaluation of Microalgae*, 129–142.

<https://doi.org/10.1007/s10126-011-9427-y>

- Elena, I., Miguel, H., A., M. J., & Castro-Puyana, M. (2014). Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. In *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications* (pp. 55–98). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1247-2>
- Elsa, A., González, B., I, M. B. C., & Li, J. M. (2009). Las algas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes, *14*(2), 1–18.
- Estrella, J., Manosalvas, R., Mariaca, J., & Ribadeneira, M. (2005). *BIODIVERSIDAD Y RECURSOS GENÉTICOS: Una guía para su uso y acceso en el Ecuador*. Quito: Ediciones Abya-Yala.
- Fabregas, J., & Herrero, C. (1990). Vitamin content of four marine microalgae . Potential use as source of vitamins in nutrition. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *5*, 259–264. <https://doi.org/10.1007/BF01569683>
- Feller, R., Matos, Â. P., Mazzutti, S., Moecke, E. H. S., Tres, M. V., Derner, R. B., ... Junior, A. F. (2018). Polyunsaturated Ω -3 and Ω -6 fatty acids, total carotenoids and antioxidant activity of three marine microalgae extracts obtained by supercritical CO₂ and subcritical n-butane. *Journal of Supercritical Fluids*, *133*(November 2017), 437–443. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.11.015>
- Ferreira, S., & Sant, C. (2017). Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2181-6>
- Fu, W., Nelson, D. R., Yi, Z., Xu, M., Khraiwesh, B., & Jijakli, K. (2017). *Bioactive Compounds From Microalgae: Current Development and Prospects*, *54*, 199–225. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63929-5.00006-1>
- Gangl, D., Zedler, J. A. Z., Rajakumar, P. D., Martinez, E. M. R., Riseley, A., Włodarczyk, A., ... Robinson, C. (2015). *Biotechnological exploitation of microalgae*. *Journal of Experimental Botany*, *66*(22), 6975–6990. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv426>
- Glover, B. J., & Martin, C. (2012). *Anthocyanins*. *Current Biology*, *22*(5), 147–150. Retrieved from <https://core.ac.uk/download/pdf/81119898.pdf>
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. (2012a). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, *24*(6), 1477–1486. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9804-6>
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. (2012b). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9804-6>
- Goiris, K., Muylaert, K., Voorspoels, S., Noten, B., & De Paepe, D. (2014). Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *Journal Oh Phycology*, *50*(3), 483–492. <https://doi.org/10.1111/jpy.12180>
- Goiris, K., Van Colen, W., Wilches, I., León-Tamariz, F., De Cooman, L., & Muylaert, K. (2015). Impact of nutrient stress on antioxidant production in

- three species of microalgae. *Algal Research*, 7, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.002>
- Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>
- Gould, K., Davies, K. M., & Winefield, C. (2008). *Anthocyanins: biosynthesis, functions, and applications*. Springer Science & Business Media.
- Gouveia, L., Batista, A. P., Sousa, I., Raymundo, A., & Bandarra, N. M. (2008). *Microalgae in Novel Food Product*. *Food Chemistry Research Developments*. <https://doi.org/10.1002/pssb.201451614>
- Guamán-Burneo, M., & González Romero, N. (2016). Catálogo de Microalgas Y Cianobacterias de agua dulce del Ecuador. (L. Re de Guillén, Ed.) (primera). Quito: Corporación para la Investigación Energética.
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., Sousa-Pinto, I., & Malcata, F. X. (2013). *Bioactive Carotenoids from Microalgae*. In *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources*. <https://doi.org/10.1002/9781118412893.ch7>
- Gupta, V. K., Tuohy, M. G., & O'Donovan, Anthonia Mohtashim, L. (2015). *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications* (first). West Sussex: Jhon Wiley & Sons Ltd.
- Hadi, S. I. I. A., Santana, H., Brunale, P. P. M., Gomes, T. G., Oliveira, M. D., Matthiensen, A., ... Brasil, B. S. A. F. (2016). *DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters*. *PLoS ONE*, 11(2), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149284>
- Hagerman, A. E. (1988). *Extraction of tannin from fresh and preserved leaves*. *Journal of Chemical Ecology*, 14(453–461). Recuperado el 12 de diciembre de 2018 de: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01013897>
- Hahn, T., Kelly, S., Muffier, K., Tippkötter, N., & Ulber, R. (2011). *Extraction of Lignocellulose and Algae for the Production of Bulk and Fine Chemicals*. *Industrial Scale Natural Products Extraction*, 221–245. <https://doi.org/10.1002/9783527635122.ch7>
- Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M. A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M. R., & Nafissi-Varcheh, N. (2010). *Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae*. *Journal of Applied Phycology*. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9424-y>
- Halim, R., Hosikian, A., Lim, S., & Danquah, M. K. (2010). *Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects*. *International Journal of Chemical Engineering*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/391632>
- Hardouin, K., Bedoux, G., Burlot, A. S., Donnay-Moreno, C., Bergé, J. P., Nyvall-Collén, P., & Bourgougnon, N. (2016). *Enzyme-assisted extraction (EAE) for the production of antiviral and antioxidant extracts from the green seaweed *Ulva armoricana* (Ulvales, Ulvophyceae)*. *Algal Research*, 16, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.013>
- Hossain, M. F., Ratnayake, R. R., Meerajini, K., & Wasantha Kumara, K. L. (2016). *Antioxidant properties in some selected cyanobacteria isolated from fresh water bodies of Sri Lanka*. *Food Science and Nutrition*, 4(5), 753–758. <https://doi.org/10.1002/fsn3.340>
- Invitrogen. (2012). *PureLink Plant Total DNA Purification Kit*. Recuperado el 3

- de enero de 2019 de: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_plant_man.pdf
- Isaza, J. H. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica*, 1(33), 13–18.
- Jacob-Lopes, E., Maroneze, M. M., Depra, M. C., Sartori, R. B., Dias, R. R., & Zepka, L. Q. (2019). *Bioactive food compounds from microalgae: an innovative framework on industrial biorefineries*. *Science Direct*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.12.003>
- Jacobo-Velazquez, D. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2009). *Correlations of Antioxidant Activity against Phenolic Content Revisited: A New Approach in Data Analysis for Food and Medicinal Plants*. *Journal of Food Science*, 74(9), 107–113. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01352.x>
- Jaime, L., Mendiola, J. A., Herrero, M., Soler-Rivas, C., Santoyo, S., Señorans, F. J., ... Ibáñez, E. (2005). *Separation and characterization of antioxidants from Spirulina platensis microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD*. *Journal of Separation Science*, 28(16), 2111–2119. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500185>
- Jeffery, S. W., & Humphrey, G. F. (1975). *New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c1, and c2 in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton*. *Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen*, 167, 191–194.
- Jerez-Martel, I., García-poza, S., Rodríguez-martel, G., Rico, M., Afonso-olivares, C., & Gómez-pinchetti, J. L. (2017). *Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Crude Extracts from Microalgae and Cyanobacteria Strains*. *Journal of Food Quality*, 2017, 8.
- Johan, F., Jafri, M. Z., Lim, H. S., & O, W. M. W. (2014). *Laboratory Measurement: Chlorophyll-a Concentration Measurement with Acetone Method Spectrophotometer*. *IEEE International Conference on Industrial Engineering and Engineering Management*, 744–748.
- Kaur, C., & Harish, K. (2000). *Review: Antioxidants in fruits and vegetables ± the millennium's health*. *International Journal of Food Science and Technology*, (36), 703–725. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2001.00513.x>
- Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O. N., Gayen, K., & Bhowmick, T. K. (2018). *Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review*. *Food and Bioproducts Processing*, 110, 60–84. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.02.002>
- Kim, J. H., Kim, S. A., Edwards, M. S., & Lee, I. A. (2018). *Anti-inflammatory Effects of Polyphenol Extracts from Ulva linza (Ulvophyceae, Chlorophyta)*. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 10(3), 212–219. <https://doi.org/10.1007/s13530-018-0366-0>
- Kim, S.K. (2015). *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications*. (K. Chojnacka, Ed.) (primera). John Wiley & Sons, Incorporated. Recuperado el 30 de septiembre de 2018 de: <https://ebookcentral.proquest.com>
- Kováčik, J., Klejduš, B., & Bačkor, M. (2010). *Physiological responses of scenedesmus quadricauda (Chlorophyceae) to UV-A and UV-C light*. *Photochemistry and Photobiology*, 86(3), 612–616.

- <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00708.x>
- Kulkarni, S., & Nikolov, Z. (2018). *Process for selective extraction of pigments and functional proteins from Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 35, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.024>
- La, D. E. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo, *VI(2)*, 84–93.
- Lemoine, Y., & Schoefs, B. (2010). *Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: A multifunctional response to stress*. *Photosynthesis Research*, 106(1–2), 155–177. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9583-3>
- Leo, R. (2015). *Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges*. *Photosynthesis Research*, 125(3), 423–436. <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0149-2>
- Levine, I., & Joel, F. (2000). *Microalgae in Health and Disease Prevention*. *Journal of Visual Languages & Computing* (Vol. 11).
- Li, H. Bin, Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., & Jiang, Y. (2007). *Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae*. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.022>
- Lichtenthaler, H. (1987). *Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes*. *Methods in Enzymology*, 148, 350–382.
- Liu, L., Pohnert, G., & Wei, D. (2016). *Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential*. *Marine Drugs*. <https://doi.org/10.3390/md14100191>
- Liu, Z., Zeng, H., & Zeng, M. (2014). *Primary studies on screening of marine algae polyphenols for quorum sensing inhibitor and their activities*. *Journal of Food Safety and Quality*, 5(12), 4097–4101.
- Londoño, J. L. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *Corporación Universitaria Lasallista*, 129–162.
- López, A., Rico, M., Rivero, A., & Tangil, M. S. De. (2011). *The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of Stypocaulon scoparium algae extracts*. *Food Chemistry*, 125, 1104–1109. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.101>
- Maadane, A., Merghoub, N., Ainane, T., El Arroussi, H., Benhima, R., Amzazi, S., ... Wahby, I. (2015). *Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content*. *Journal of Biotechnology*, 215, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.400>
- MAE. (2015). Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador. Recuperado el 28 de noviembre de 2018 de: <http://areasprotegidas.ambiente.gob.ec/>
- Mäki-Arvela, P., Hachemi, I., & Murzin, D. Y. (2014). *Comparative study of the extraction methods for recovery of carotenoids from algae: Extraction kinetics and effect of different extraction parameters*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89(11), 1607–1626. <https://doi.org/10.1002/jctb.4461>
- Malagón Micán, L. M., Piñeros Corzo, Juliana, R., & Ruiz Manrique, I. G. (2017). Uso potencial de fitoquímicos derivados de microalgas para la obtención de nutraceuticos. *América Semilleros Formación Investigativa*, 3(1), 91–100.
- Malaviya, N. (2008). *Modern Botany* (primera). India: Scientific Publishers

- (India).
- Martínez-Florez, S., González-Gallego, J., & Culebras, J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 6(November), 271–278.
- Martínez Andrade, K., Lauritano, C., Romano, G., & Ianora, A. (2018). *Marine Microalgae with Anti-Cancer Properties*. *Marine Drugs*, 16(5), 165. <https://doi.org/10.3390/md16050165>
- Mendoza Corvis, F. A., Arteaga Márquez, M. R., & Pérez Sierra, O. A. (2017). Degradación de la vitamina C en un producto de mango (*Mangifera indica* L.) y lactosuero, 18(1), 125–137.
- Miller, M. C., Kannan, M., & Colinvaux, P. A. (1984). *Limnology and primary productivity of Andean and Amazonian tropical lakes of Ecuador*. *SIL Proceedings*, 1922-2010, 22(2), 1264–1270. <https://doi.org/10.1080/03680770.1983.11897482>
- Miranda, M. J., Sato, S., & Mancini-Filho, J. (2001). *Antioxidant activity of the microalga *Chlorella vulgaris* cultured on special conditions*. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, 140(3), 165–168.
- Mohan, A., Misra, N., Srivastav, D., & Umapathy, D. (2014). *Spirulina-The Nature's Wonder: A Review*. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences (SJAMS)*, 17(3), A225–A226. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jval.2014.03.1318>
- Morowvat, M. H., & Ghasemi, Y. (2016). *Evaluation of antioxidant properties of some naturally isolated microalgae: Identification and characterization of the most efficient strain*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8(August), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.09.010>
- Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. (2011). *Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay*. *Food Chemistry*, 129(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.045>
- Munir, N., Sharif, N., Naz, S., & Manzoor, F. (2013). *Algae : A potent antioxidant source*. *Sky Journal of Microbiology Research*, 1(3), 22–31.
- Muys, M., Sui, Y., Schwaiger, B., Lesueur, C., Vandenheuvel, D., Vermeir, P., & Vlaeminck, S. E. (2019). *High variability in nutritional value and safety of commercially available *Chlorella* and *Spirulina* biomass indicates the need for smart production strategies*. *Bioresource Technology*, 275(November 2018), 247–257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.059>
- Norton, T. A., Melkonian, M., & Andersen, R. A. (1996). Algal biodiversity*. *Phycologia*, 35(4), 308–326. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-4-308.1>
- Núñez-Avellaneda, M., Marciales-Caro, L. J., & Beltrán Gutiérrez, M. (2008). Microalgas acuáticas: La otra escala de la biodiversidad en la Amazonía colombiana. *Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - SINCHI*, 1.
- oilgae. (s.f.). Microalgas. Recuperado el 23 de noviembre de: http://www.oilgae.com/non_fuel_products/biopolymers.html
- Okezie I, A., & Cuppett, S. L. (1997). *Antioxidant methodology: in vivo and in vitro concepts*. Illinois: The American Oil Chemists Society.
- Olasehinde, T. A., Odjadjare, E. C., Mabinya, L. V., Olaniran, A. O., & Okoh, A.

- I. (2019). *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella minutissima* exhibit antioxidant potentials, inhibit cholinesterases and modulate disaggregation of β -amyloid fibrils. *Electronic Journal of Biotechnology*, 40, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.03.008>
- Othman, R., Noh, N. H., Hatta, F. A. M., & Jamaludin, M. A. (2018). *Natural carotenoid pigments of 6 chlorophyta freshwater green algae species*. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 8(1), 1–5. <https://doi.org/10.6000/1927-5951.2018.08.01.1>
- Pachacama, L., Tirado, J. O., Duchicela, J., Manjunatha, B., Kundapur, R. R., & Rajeswari, B. (2016). *Evaluation of microalgae's (Chlorella sp. and Synechocystis sp.) pollutant removal property: Pig effluent as a live stock discharge*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(8), 135–141. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60821>
- Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, H., ... Levine, M. (2013). *Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention*. *Journal of the American College of Nutrition*, 5724. <https://doi.org/10.1080/07315724.2003.10719272>
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz-Rubio, M. E., Gon, I., & Saura-calixto, F. (2008). *Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results*. *Food Research International*, 41, 274–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.004>
- Pérez-Lorenzo, S., Levy-Benshimol, A., & Gómez-Acevedo, S. (1998). *Presence of lectins, tannins and protease inhibitors in venezuelan marine algae*. *Acta Científica de Venezuela*, 49, 144–151.
- Porra, R. (1991). *Recent advances and re-assessments in chlorophyll extraction and assay procedures for terrestrial, aquatic and marine organisms, including recalcitrant algae*. In Scheer H (Ed.), *Chlorophylls* (pp. 31–57). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Prescott, G. W. (1978). *The fresh-water algae. How To Know*. Dubuque, Iowa: W. C. Brown Co.
- Promega. (2016). *GoTaq® Green Master Mix*. Recuperado el 4 de febrero de 2019 de: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-protocol.pdf?la=en>
- Proteggente, A. R., Pannala, A. S., Paganga, G., Buren, L. E. O. V. A. N., Wagner, E., Wiseman, S., ... Rice-evans, C. A. (2002). *The Antioxidant Activity of Regularly Consumed Fruit and Vegetables Reflects their Phenolic and Vitamin C Composition*, 36(2), 217–233. <https://doi.org/10.1080/10715760290006484>
- Prymont-Przyminska, A., Zwolinska, A., Sarniak, A., Wlodarczyk, A., Krol, M., Nowak, M., ... Nowak, D. (2014). *Consumption of strawberries on a daily basis increases the non-urate 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity of fasting plasma in healthy subjects*. *J. Clin. Biochem. Nutr*, 55(1), 48–55. <https://doi.org/10.3164/jcbn.13>
- PubChem Database. (2019). *Clorofila a*. *National Center for Biotechnology Information*. Recuperado el 3 de agosto de 2018 de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12085802>

- Quéguineur, B., Goya, L., Ramos, S., Martín, M. A., Mateos, R., & Bravo, L. (2012). *Phloroglucinol: Antioxidant properties and effects on cellular oxidative markers in human HepG2 cell line*. *Food and Chemical Toxicology*, 50(8), 2886–2893. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.05.026>
- Rajneesh, Singh, S. P., Pathak, J., & Sinha, R. P. (2017). *Cyanobacterial factories for the production of green energy and value-added products: An integrated approach for economic viability*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 69(October 2016), 578–595. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.110>
- Rammuni, M. N., Ariyadasa, T. U., Nimarshana, P. H. V., & Attalage, R. A. (2019). *Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina**. *Food Chemistry*, 277(October 2018), 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.066>
- Rippka, R., Deruelles, J., B., W. J., Herdman, M., & Stanier, R. (1979). *Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria*. *Journal of General Microbiology*, 111(2), 1–61.
- Ritchie, R. J. (2006). *Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents*. *Photochemistry and Photobiology*, 89, 27–41. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S. A., Lee, K., & Rashid, N. (2018). *Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92(April), 394–404. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>
- Rodriguez-Saona, L. E., & Wrolstad, R. E. (2001). *The extraction, isolation and purification of Anthocyanins*. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(2), 312–313. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0101s00>
- Rojas, E., Ávila, M., Parada, G., Acuícola, Á. D., Brava, A. P., Magíster, P., & Ciencias, F. De. (2012). *Aplicación de estrategias nutricionales y su efecto en el crecimiento en el cultivo continuo de Spirulina (Arthrospira platensis)*, 40(3), 763–771.
- Rowan, K. (1989). *Photosynthetic pigments of algae*. Cambridge University Press.
- Safafar, H., Wagenen, J. Van, Møller, P., & Jacobsen, C. (2015). *Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater*. *Marine Drugs*. <https://doi.org/10.3390/md13127069>
- Santos, D. O. S. (2003). *Comparison of three methods for Chlorophyll determination: Spectrophotometry and Fluorimetry in samples containing pigment mixtures and spectrophotometry in samples with separate pigments through High Performance Liquid*, 15(3), 7–18.
- Saranya, C., Hemalatha, A., Parthiban, C., & Anantharaman, P. (2014). *Evaluation of Antioxidant Properties, Total Phenolic and Carotenoid Content of Chaetoceros calcitrans, Chlorella salina and Isochrysis galbana*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(8), 365–377. <https://doi.org/10.1108/09574099710805673>
- Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2017).

- Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. Saudi Journal of Biological Sciences.* <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>
- Sawant, S., Animesh, A. J., Bhagwat, A., & Kelkar-Mane, V. (2014). *Tapping the antioxidant potential of a novel isolate - Chlorella emersonni.* *World Journal of Pharmaceutical Research*, 3(7), 726–739.
- Schumann, R., Häubner, N., Klausch, S., & Karsten, U. (2005). *Chlorophyll extraction methods for the quantification of green microalgae colonizing building facades.* *International Biodeterioration and Biodegradation*, 55(3), 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.12.002>
- Scientific, T. F. (2016). *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.* Recuperado el 5 de enero de: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4337455>
- Segura Campos, M. R. (2019). *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications* (first). Duxford: Woodhead Publishing.
- Senevirathne, M., Kim, S.-H., Siriwardhana, N., & Ha, J.-H. (2006). *Antioxidant Potential of Ecklonia cava on Reactive Oxygen Species Scavenging, Metal Chelating, Reducing Power and Lipid Peroxidation Inhibition.* *Food Science and Technology International*, 12(27). <https://doi.org/10.1177/1082013206062422>
- Shahidi, F. (2016). *Antioxidants in food and food antioxidants.* *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(15), 4701–4706. <https://doi.org/10.1002/anie.201600546>
- Shariatmadari, Z., Moharrek, F., Riahi, H., Heidari, F., & Aslani, E. (2017). *Efficiency of partial 16S rRNA gene sequencing as molecular marker for phylogenetic study of cyanobacteria, with emphasis on some complex taxa.* *Acta Biologica Szegediensis*, 61(1), 59–68.
- Shi, X., & Chen, F. (2002). *High-Yield Production of Lutein by the Green Microalga Chlorella protothecoides in Heterotrophic Fed-Batch Culture.*
- Silva, J., Alves, C., Pinteus, S., Reboleira, J., Pedrosa, R., & Bernardino, S. (2018). *Chlorella. Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements.* Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812491-8.00026-6>
- Simon, D., & Helliwell, S. (1998). *Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae.* *Water Research*, 32(7), 2220–2223. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00452-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00452-1)
- Singh, J., & Saxena, R. C. (2015). *An Introduction to Microalgae : Diversity and Significance*, 11–24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00002-9>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1998). *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent.* *Methods in Enzymology*, 299(1974), 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sluiman, H. J. (1991). *Cell division in Gloetilopsis planctonica, a newly identified ulvophycean alga (Chlorophyta) studied by freeze fixation and freeze substitution.* *Journal of Applied Phycology*, 27, 291–298.
- Solovchenko, A. (2010). *Photoprotection in plants: optical screening-based mechanisms.* Springer Science & Business Media.
- Stafford, H. A. (1990). *Flavonoid Metabolism.* CRC Press.
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). *Antioxidant activity of carotenoids.* *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345–351. <https://doi.org/10.1016/S0098->

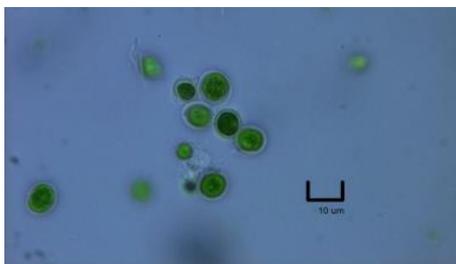
2997(03)00030-X

- Stevenson, R. J., Bothwell, M. L., & Rowe, L. L. (1996). *Algal ecology: Freshwater benthic ecosystems* (primera). Academic Press.
- Stoica, R., Velea, S., Iue, L., Calugareanu, M., Ghimis, S. B., & Ion, R.-M. (2013). *The influence of ethanol concentration on the total phenolics and antioxidant activity of scenedesmus opoliensis algal biomass extracts. Revista de Chimie, 64(3).*
- Streit, N., Zepka, L. Q., & Jacob-Lopes, E. (2015). Producción de pigmentos naturales (clorofila-, 8(2), 27–34.
- Suh, S. S., Kim, S.-M., Yang, E. J., Lee, S. G., Youn, U. J., Han, S. J., ... Kim, S. (2017). *Anticancer activities of ethanol extract from the Antarctic freshwater microalga, Botrydiopsisidaceae sp. Complementary and Alternative Medicine, 14(6), 560–569. <https://doi.org/10.7150/ijms.18702>*
- Sun, Z., Liu, J., Bi, Y. H., & Zhou, Z. G. (2014). *Microalgae as the production platform for carotenoids. Recent Advances in Microalgal Biotechnology.*
- Talero, E., García-Mauriño, S., Ávila-Román, J., Rodríguez-Luna, A., Alcaide, A., & Motilva, V. (2015). *Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and cancer. Marine Drugs, 13(10), 6152–6209. <https://doi.org/10.3390/md13106152>*
- Tirado, J. O., Flores, F., Maldonado, S., Mihae, R., Naranjo, B., Muñoz, D., ... Rajeswari, B. (2017). *Molecular characterization and antioxidant potential of Andean chlorophytes from Ecuador. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 7(5), 56–60. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70510>*
- Usov, A. I. (2011). *Polysaccharides of the red algae. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (1st ed., Vol. 65). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385520-6.00004-2>
- UTEX. (2019). *Algal Culture Media Recipes*. Recuperado el 28 de abril de 2019 de: <https://utex.org/products/f-2-medium>
- Valério, E., Chambel, L., Paulino, S., Faria, N., Pereira, P., & Tenreiro, R. (2009). *Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. Microbiology, 155(2), 642–656. <https://doi.org/10.1099/mic.0.022848-0>*
- Vaz, B. da S., Moreira, J. B., Morais, M. G. de, & Costa, J. A. V. (2016). *Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. Current Opinion in Food Science. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.12.006>*
- Vijayavel, K., & Anbuselvam, C. Balasubramanian, M. P. (2007). *Antioxidant effect of the marine algae Chlorella vulgaris against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. Vijayavel, K., Anbuselvam, C. & Balasubramanian, M.P., 3030(1–2), 39–44.*
- Visco, J. A., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Cordonier, A., Esling, P., Pillet, L., & Pawlowski, J. (2015). *Environmental Monitoring: Inferring the Diatom Index from Next-Generation Sequencing Data. Environmental Science and Technology, 49(13), 7597–7605. <https://doi.org/10.1021/es506158m>*
- Wallace, T. C., & Giusti, M. M. (2014). *Anthocyanins in Health and Disease*. (CRC Press, Ed.).
- Wher, J. D., & Sheat, R. G. (2013). *Freshwater algae of North America. Ecology and Classification*. Academic Press.

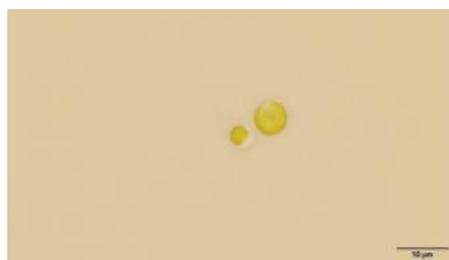
- Wu, L. C., Ho, J. A. A., Shieh, M. C., & Lu, I. W. (2005). *Antioxidant and antiproliferative activities of spirulina and Chlorella water extracts*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4207–4212. <https://doi.org/10.1021/jf0479517>
- Yan, C., Fan, J., & Xu, C. (2013). *Analysis of oil droplets in microalgae*. *Methods in Cell Biology* (1st ed., Vol. 116). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408051-5.00005-X>
- Yu, Y., Oo, N., Su, M. C., & Kyaw, K. T. (2017). *Extraction And Determination Of Chlorophyll Content From Microalgae*, 1(5), 298–301.
- Zhang, W. W., Duan, X. J., Huang, H. L., Zhang, Y., & Wang, B. G. (2007). *Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from Symphyocladia latiuscula (Rhodomelaceae)*. *Journal of Applied Phycology*, 19(2), 97–108. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9115-x>
- Zuluaga, M., Gueguen, V., Pavon-Djavid, G., & Letourneur, D. (2017). *Carotenoids from microalgae to block oxidative stress*. *BiolImpacts*, 7(1), 1–3. <https://doi.org/10.15171/bi.2017.01>

ANEXOS

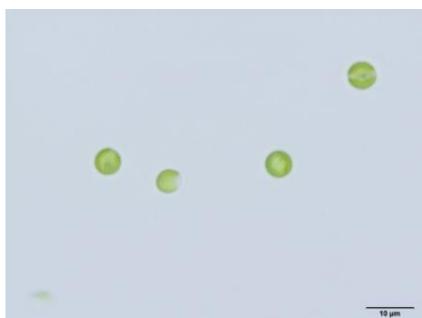
Anexo 1. Fotografías de las microalgas estudiadas en una escala de 10 µm.



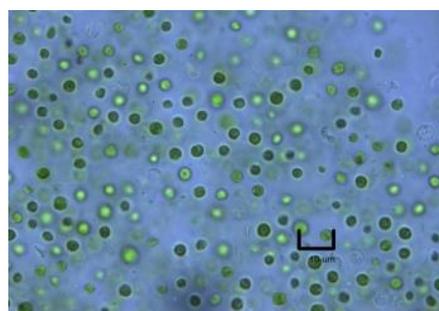
OTU 1. *Coelastrella* sp.



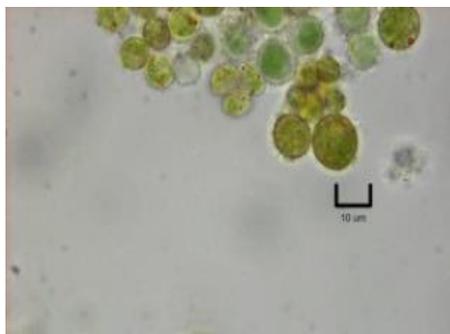
OTU 3. *Chlorella sorokiniana*



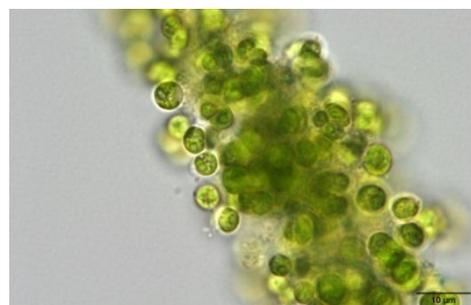
OTU 5. *Chlorella vulgaris*



OTU 6. *Spumella obliqua*



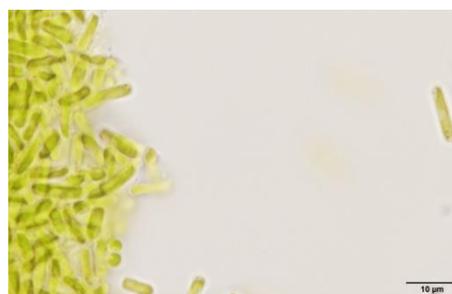
OTU 7. *Spumella* sp. OF-40



OTU 8. *Spumella-like flagellate*



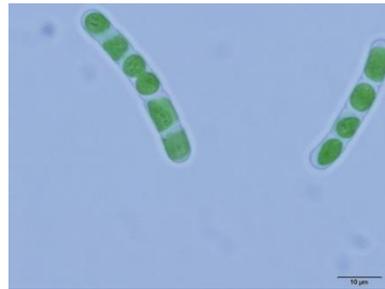
OTU 9. *Scenedesmus* sp.



OTU 11. *Stichococcus* sp.



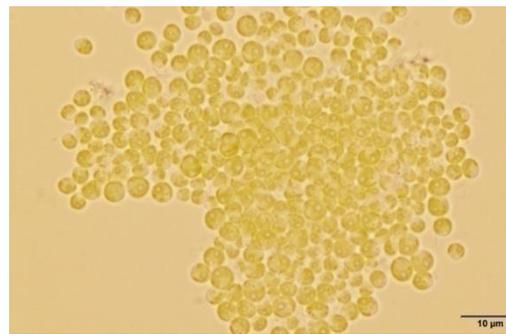
OTU 12. *Scenedesmus vacuolatus*



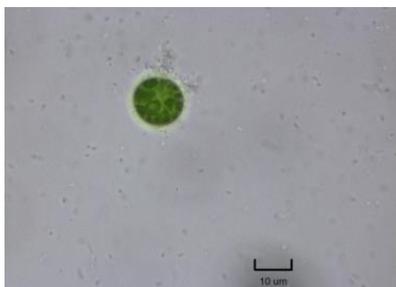
OTU 1. *Gloeotilopsis sterilis*



OTU 1. *Desmodesmus subspicatus*



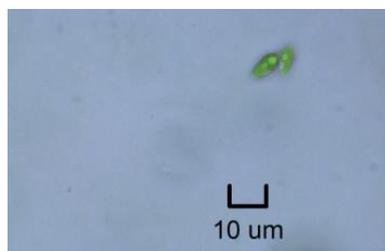
OTU 18. *Scenedesmaceae* sp.



OTU 20. *Parachlorella kessleri*



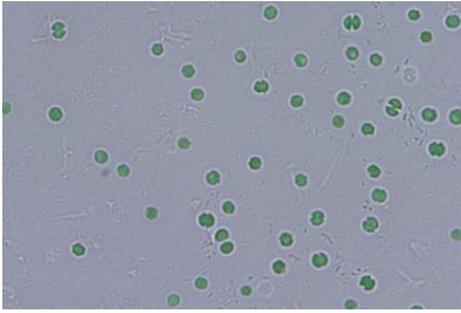
OTU 21. *Poterioochromonas malhamensis*



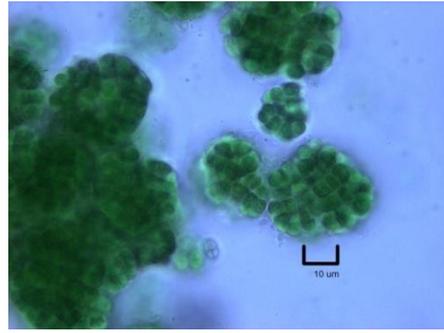
OTU 22. *Acutodesmus obliquus*



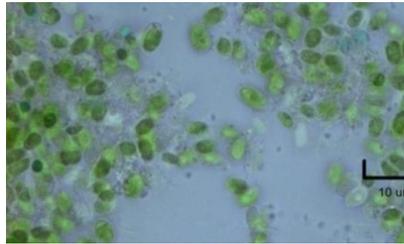
OTU 24. *Desmodesmus abundans*



OTU Y1. *Synechocystis* sp.



OTU Y2. *Chroococidiopsis thermalis*



OTU Y4. *Synechocystis* sp.

Anexo 2. Medios utilizados para cultivo de microalgas.

Medio BG-11 (pH 7,5)		
(Rippka et al., 1979)		
Compuesto	Solución Stock (g.L⁻¹ dH₂O)	Adición por litro de medio de cultivo
MgNa ₂ EDTA .1H ₂ O	1 g	1 mL
Citrato férrico de amonio	6 g	1 mL
Ácido cítrico .1H ₂ O	6 g	1 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O	36 g	1 mL
KH ₂ PO ₄ .3H ₂ O	40 g	1 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	75 g	1 mL
Na ₂ CO ₃	20 g	1 mL
NaNO ₃		1,5 g
Solución Metales Traza (para 1 L)		1 mL
H ₃ BO ₃	2,86 g	
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,81 g	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22 g	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,39 g	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08 g	
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,05 g	

Medio BBM (pH 6,6)		
(Bold, 1949)		
Compuesto	Solución Stock (g.L⁻¹ dH₂O)	Adición por litro de medio de cultivo
NaNO ₃	25 g	10 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5 g	10 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5 g	10 mL
K ₂ HPO ₄	7,5 g	10 mL
KH ₂ PO ₄	17,5 g	10 mL
NaCl	2,5 g	10 mL
Solución EDTA (para 1 L)		1 mL
EDTA	50 g	
KOH	31 g	
Solución de hierro acidificada (para 100 mL)		1 mL
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,498 g	
H ₂ SO ₄ (96%)	0,1 mL	
H ₃ BO ₃	11,42 g	1 mL

Solución Metales Traza (para 1 L)		1 mL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,82 g	
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,44 g	
MoO ₃	0,71 g	
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57 g	
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,49 g	

Medio Bristol (pH 6)		
(UTEX, 2019)		
Compuesto	Solución Stock (g.400 mL⁻¹ dH₂O)	Adición por litro de medio de cultivo
NaNO ₃	10	10 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	1	10 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	3	10 mL
K ₂ HPO ₄	3	10 mL
KH ₂ PO ₄	7	10 mL
NaCl	1	10 mL

