



UNIVERSIDAD DE CUENCA

**Facultad de Ciencias Químicas
VLIR-Network Ecuador**

**Maestría en Biociencias Aplicadas con mención en
Biodescubrimiento**

**“Caracterización de compuestos antioxidantes carotenoides y
polifenoles presentes en las microalgas *Chlorella* sp. y
Nannochloropsis oculata cultivadas in vitro con potencial
nutricional”**

*Trabajo de titulación previo a la obtención del título de
Magíster en Biociencias Aplicadas con mención en Biodescubrimiento*

AUTORA: B.Q.F. Jessenia Lizbeth Romero Asanza
C.I. 070491665-9

DIRECTORA: Silvia Johana Ortiz Ulloa, Ph.D.
C.I. 030108289-7

CODIRECTOR: Efrén Germán Santos Ordoñez, Ph.D.
C.I. 090889713-5

ASESOR: Fabián León Tamariz, Ph.D.
C.I. 010231161-0

**Cuenca – Ecuador
Marzo, 2019**



RESUMEN

Las microalgas constituyen una excelente fuente para la investigación y producción de compuestos bioactivos. En este trabajo, se evaluó la capacidad antioxidante de diferentes solventes de extracción en *Chlorella*, y se caracterizaron carotenoides y polifenoles en *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis oculata*. Por tanto, se utilizó una metodología que incluye cultivo optimizado de microalgas, identificación genética con herramientas de biología molecular, extracción con maceración y ultrasonificación mediante solventes hidrofílicos: etanol/agua 50:50 y 95:5 (v/v), y lipofílicos: diclorometano y n-hexano, comparación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos por los métodos de captura del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), poder reductor y blanqueamiento del β -caroteno, y caracterización química en ambas microalgas por RP-HPLC-DAD, para relacionar su actividad antioxidante con su perfil químico. Los solventes polar y apolar más eficientes en actividad antioxidante en *Chlorella* fueron aplicados a *N. oculata*. Se percibió que el empleo de cultivos enriquecidos generó grandes concentraciones de antioxidantes. La evaluación molecular reveló similitud para *Chlorella* spp. con la secuencia ITS. Los resultados demostraron que los solventes etanol/agua 95:5 y diclorometano proporcionaron la mayor actividad antioxidante en todas las pruebas, lo que explica que los compuestos extraídos tengan múltiples mecanismos antioxidantes. Se encontró importantes concentraciones de carotenoides (luteína, α - y β -caroteno) y un compuesto fenólico (luteolina) en *Chlorella* sp. En cambio en *N. oculata*, una importante concentración del carotenoide fucoxantina. Al parecer, los carotenoides encontrados en *Chlorella* explicarían la alta actividad antioxidante observada. La alta producción de luteína, especialmente, la convierte en una fuente con gran potencial nutricional.

Palabras clave: Actividad antioxidante; carotenoides; *Chlorella* sp.; *N. oculata*; polifenoles.

ABSTRACT

Microalgae are an excellent source for the research and production of bioactive compounds. In this work, the antioxidant capacity of different extraction solvents in *Chlorella* was evaluated, and carotenoids and polyphenols were characterized in *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis oculata*. Therefore, a methodology that includes optimized culture of microalgae, genetic identification with molecular biology tools, extraction with maceration and ultrasonication by hydrophilic solvents: ethanol/water 50:50 and 95:5 (v/v), and lipophilic solvents: dichloromethane and n-hexane, comparison of the antioxidant activity of the extracts obtained by the methods of capture of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH), reducing power and the β -carotene bleaching, and chemical characterization in both microalgae by RP-HPLC-DAD, was used to relate its antioxidant activity with its chemical profile. The polar and apolar solvents most efficient in antioxidant activity in *Chlorella* were applied to *N. oculata*. It was perceived that the use of enriched cultures generated high concentrations of antioxidants. The molecular evaluation revealed similarity for *Chlorella* spp. with the *ITS* sequence. The results showed that the ethanol/water 95:5 and dichloromethane solvents provided the highest antioxidant activity in all the tests, which explains why the extracted compounds have multiple antioxidant mechanisms. Important concentrations of carotenoids (lutein, α - and β -carotene) and a phenolic compound (luteolina) were found in *Chlorella* sp. In contrast, in *N. oculata*, an important concentration of the carotenoid fucoxanthin. Apparently, the carotenoids found in *Chlorella* could explain the high observed antioxidant activity. The high production of lutein, especially, makes it a source with great nutritional potential.

Keywords: Antioxidant activity; carotenoids; *Chlorella* sp.; *N. oculata*; polyphenols.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ÍNDICE DE CONTENIDOS	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
AGRADECIMIENTOS	9
DEDICATORIA	10
1. Introducción	11
2. Materiales y métodos.....	12
2.1. <i>Reactivos y solventes</i>	12
2.2. <i>Microalgas y condiciones de cultivo</i>	13
2.3. <i>Obtención de biomasa</i>	13
2.4. <i>Identificación genética</i>	13
2.4.1. <i>Extracción, purificación y evaluación del ADN genómico total</i>	14
2.4.2. <i>Amplificación del código de barra molecular, secuenciación y análisis</i>	14
2.5. <i>Extracción de antioxidantes por maceración con ultrasonificación asistida (UAE)</i>	15
2.6. <i>Evaluación de la actividad antioxidante de Chlorella sp.</i>	16
2.6.1. <i>Método de captura de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)</i>	16
2.6.2. <i>Método de poder reductor</i>	16
2.6.3. <i>Método de blanqueamiento del β-caroteno</i>	17
2.7. <i>Caracterización química por HPLC en ambas microalgas</i>	18
2.7.1. <i>Análisis, identificación y cuantificación de carotenoides</i>	18
2.7.2. <i>Análisis, identificación y cuantificación de compuestos fenólicos</i>	18
2.8. <i>Análisis estadístico</i>	19
3. Resultados y discusión.....	19
3.1. <i>Cultivo, obtención de biomasa y rendimiento de biomasa</i>	19
3.2. <i>Análisis Barcoding e identificación genética</i>	20
3.3. <i>Eficiencia de la extracción de compuestos bioactivos</i>	22
3.4. <i>Capacidad antioxidante de los extractos microalgales</i>	23
3.4.1. <i>Actividad antioxidante en Chlorella sp. con el ensayo de DPPH</i>	23
3.4.2. <i>Actividad antioxidante en Chlorella sp. con el ensayo de poder reductor</i>	24
3.4.3. <i>Actividad antioxidante en Chlorella sp. con el ensayo del blanqueamiento del β-caroteno</i>	25
3.4.4. <i>Comparación de actividad antioxidante entre solventes de extracción</i>	27
3.5. <i>Perfil químico de antioxidantes de los extractos microalgales por HPLC</i>	27
3.5.1. <i>Carotenoides y polifenoles en Chlorella sp.</i>	27
3.5.2. <i>Carotenoides y polifenoles en N. oculata</i>	29
3.5.3. <i>Potencial nutricional de los antioxidantes encontrados</i>	29
4. Conclusiones y recomendaciones	29
Conflicto de interés.....	30
Agradecimientos	30
Referencias	31
Anexos	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers y programa de amplificación de los marcadores moleculares de este estudio	15
Tabla 2. Resultados de similitudes de secuenciaciones en BLASTN	21
Tabla 3. Análisis con BLASTN del consenso del ITS1, ITS2	21
Tabla 4. Evaluación del rendimiento de extracción de biocompuestos con los diferentes solventes ...	22
Tabla 5. Capacidad antioxidante por DPPH, poder reductor y blanqueamiento del β -caroteno de extractos hidrofílicos y lipofílicos de <i>Chlorella</i> sp. y de los estándares.....	26
Tabla 6. Cuantificación de carotenoides detectados por RP-HPLC-DAD en los extractos microalgales	28



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR dirigidos a marcadores de interés de genes para <i>Chlorella</i> y <i>Nannochloropsis</i> . (A) No amplificación de <i>matK</i> . (B) Amplificación de <i>rbcL</i> . (C) Amplificación de la región <i>ITS1</i> . (D) Amplificación de la región <i>ITS2</i> . MM: marcador de peso molecular 100 bp.....	20
Figura 2. Secuencia consenso utilizando las secuencias 93, 103, 105 y 107 correspondientes al <i>ITS1</i> , <i>ITS2</i>	21



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Jessenia Lizbeth Romero Asanza, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Caracterización de compuestos antioxidantes carotenoides y polifenoles presentes en las microalgas *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis oculata* cultivadas in vitro con potencial nutricional", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 13 de Marzo de 2019

Jessenia Lizbeth Romero Asanza

C.I: 070491665-9



Cláusula de Propiedad Intelectual

Jessenia Lizbeth Romero Asanza, autora del trabajo de titulación “Caracterización de compuestos antioxidantes carotenoides y polifenoles presentes en las microalgas *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis oculata* cultivadas in vitro con potencial nutricional”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 13 de Marzo de 2019

Jessenia Lizbeth Romero Asanza

C.I: 070491665-9

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco infinitamente a Dios, quien ha sido siempre mi guía y mi fortaleza en todo momento.

Dejo constancia de mi agradecimiento a la Universidad de Cuenca, ESPOL y EPN que son el eje de nuestra formación académica.

A la Directora de Tesis, Johana Ortiz, por la colaboración brindada a este trabajo, por su orientación y atención a mis consultas, cuyas instrucciones recibidas durante el desarrollo del mismo permitieron la culminación de tan importante proyecto.

Un trabajo de investigación es generalmente fruto de muchas ideas, propuestas y del apoyo de más profesionales en esta maestría, gracias al Dr. Fabián León y Dr. Efrén Santos, quienes brindaron su asesoría en distintas ocasiones para el desarrollo del presente estudio.

A mi familia, especialmente a Vicente y Mateo por su gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles de este trabajo.

A todos, muchas gracias.

LA AUTORA



DEDICATORIA

Dedico la culminación de este trabajo:

A mis padres Héctor y Zoila, por los valores y principios inculcados y por acompañarme con sus oraciones y consejos en esta travesía de la tesis.

A mi esposo Vicente especialmente, por estar siempre allí en los momentos buenos y malos, por ser pilar fundamental en mi vida y en mis estudios, por su apoyo incondicional que le otorga un valor sentimental a este trabajo. Ha sido la persona que más ha sentido los efectos de la realización de este trabajo de investigación.

A mi hijo Mateo, por enseñarme a apreciar las cosas de la vida, por regalarme cada día su sonrisa y su ternura que han sido mi fortaleza ante las adversidades del diario vivir.

A mis hermanos Fernando y Vanessa por el cariño que siempre me brindan.

A las personas cercanas, de las cuales valoro cada gesto que tuvieron conmigo.

¡Para ustedes con cariño!

LA AUTORA

CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES CAROTENOIDES Y POLIFENOLES PRESENTES EN LAS MICROALGAS *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis oculata* CULTIVADAS IN VITRO CON POTENCIAL NUTRICIONAL

Jessenia Romero¹, Efrén Santos², Fabián León¹, Johana Ortiz¹

¹ Departamento de Biociencias, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca, Av. 12 de Abril, Cuenca, Ecuador

² Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 Vía Perimetral, Apartado 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

E-mail address: jessenia.romero2211@ucuenca.edu.ec; gsantos@espol.edu.ec; fabian.leont@ucuenca.edu.ec; johana.ortiz@ucuenca.edu.ec

1. Introducción

Muchos estudios han explorado microalgas como reservorio ilimitado de biocompuestos, gracias a sus características fisicoquímicas, diversidad taxonómica y distribución mundial (Dewapriya & Kim, 2014; Freitas et al., 2012; Gacheva & Gigova, 2014; Plaza et al., 2009; Samarakoon & Jeon, 2012). Las microalgas son organismos eucariotas, fotoautótrofos, la mayoría unicelulares, con formas y tamaños diversos (de Morais et al., 2015). La exposición al estrés y a la variabilidad del ambiente hace que produzcan compuestos con actividades biológicas como mecanismos de adaptación y defensa (Gacheva & Gigova, 2014; Grimi et al., 2014; Klein et al., 2012). La mayoría de compuestos se acumulan en la biomasa y pocos son excretados al medio (de Morais et al., 2015). La importancia de las microalgas radica en que son fuente de proteínas, ácidos grasos, polisacáridos, carotenoides, polifenoles, vitaminas, que pueden aplicarse en alimentos, aditivos, nutraceuticos, farmacéuticos y biocombustibles (Freitas et al., 2012; Lin et al., 2015; Samarakoon & Jeon, 2012). En particular, existe interés en las microalgas como fuente de antioxidantes, por su mayor disponibilidad de metabolitos que en las plantas y por las altas concentraciones que se pueden obtener con la manipulación de condiciones propicias (Fernández et al., 2010; Lin et al., 2015). Los antioxidantes son moléculas capaces de retrasar, prevenir o eliminar la oxidación causada por especies reactivas de oxígeno, responsables de enfermedades (Huang et al., 2005; Klein et al., 2012).

Chlorella (división Chlorophyta, clase Trebouxiophyceae) y *Nannochloropsis* (división Eustigmatophyta, clase Eustigmatophyceae) son microalgas verdes, esféricas u ovals, con ciclo de vida y rutas metabólicas similares a las plantas. Estos organismos alcanzan un diámetro de 2-15 μm en *Chlorella* y 2-4 μm en *Nannochloropsis* y son de reproducción asexual (Posten & Chen, 2016; van den Hoek et al., 1995). *Chlorella* contiene una pared de celulosa, núcleo, cloroplastos, tilacoides, mitocondrias, pigmentos, vacuolas, almidón, cuerpos lipídicos y pirenoides (Bock et al., 2011; Leliaert et al., 2012; Posten & Chen, 2016). Presenta una composición de proteínas (51-68%) y aminoácidos esenciales; lípidos (6.5-22%) incluyendo ácidos grasos; carbohidratos (12-17%); vitaminas como tiamina, riboflavina, ácido fólico, biotina, ácido pantoténico, ácido ascórbico; minerales (8.5-11.5%) como K, Na, Mg, Fe, Ca; carotenoides (0.1-2%) como α - y β -caroteno, luteína, zeaxantina, violaxantina, neoxantina, linoxantina, cantaxantina, astaxantina (Janczyk, 2006; Liu & Chen, 2014; Rodríguez & Guil, 2008; Sen Roy & Pal, 2014). *Nannochloropsis* en cambio contiene un cloroplasto con clorofila *a*, clorofila *c* y pocos carotenoides, siendo violaxantina el más abundante (Reboloso et al., 2001; van den Hoek et al., 1995). La mayoría acumula cuantiosos lípidos en respuesta a

condiciones de estrés (Gouveia & Oliveira, 2009; Simionato et al., 2011). Su composición incluye 38% de carbohidratos, 29% de proteínas, 18% de lípidos, 17.4% de ácidos grasos como ácido mirístico, palmítico, palmitoleico, oleico, linoleico, araquidónico y eicosapentaenoico, 3% de microelementos (Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Cr, Ni, Co, S), 0.29% de clorofilas y 0.06% de carotenoides (Reboloso et al., 2001).

En la actualidad, el empleo de microalgas responde a la necesidad de buscar antioxidantes naturales, en reemplazo de hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisol butilado (BHA) usados comercialmente, por sospechas de toxicidad (Abd El Baky & El-Baroty, 2013; Shahidi & Ambigaipalan, 2015a). El creciente interés está dirigido a polifenoles y carotenoides de fuentes distintas a las tradicionales (Fernández et al., 2010; Lin et al., 2015). Se ha descrito una gran variedad de técnicas desarrolladas para extraer antioxidantes microalgales que incluyen el uso de líquidos presurizados, extracción supercrítica-CO₂, ultrasonificación, entre otras (Liau et al., 2010; Koo et al., 2012; Singh et al., 2015). Sin embargo, a pesar de estos avances, todavía existen problemas relacionados con el desarrollo de protocolos efectivos de extracción, y problemas con restricciones metabólicas en algunas microalgas (Guedes et al., 2014; Parniakov et al., 2015a). Por otro lado, la extracción convencional presenta limitaciones relacionadas con la laboriosidad, consumo de tiempo, bajos rendimientos, seguridad del solvente, que fácilmente pueden superarse con métodos más promisorios pero más costosos (Herrero et al., 2006). Por ello es de gran utilidad la combinación de técnicas convencionales y eléctricas simultáneas o como pretratamiento cuando no es posible reemplazar el solvente, para generar altos rendimientos de extracción (Parniakov et al., 2015a; Singh et al., 2015).

El objetivo del estudio fue evaluar la capacidad antioxidante de diferentes solventes extractantes en *Chlorella*, comparando la actividad antioxidante de los extractos mediante los ensayos de DPPH para todos los extractos, poder reductor para los extractos polares y blanqueamiento del β-caroteno para los extractos apolares. La actividad antioxidante se relacionó con su perfil de carotenoides y polifenoles en *Chlorella* sp. y *N. oculata*. El estudio estuvo dirigido a determinar los solventes de carácter polar y apolar que demostraron mayor actividad y mayor contenido antioxidante. Adicionalmente, se evaluó el cultivo y la utilidad de marcadores moleculares en la identificación genética de las microalgas.

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos y solventes

NaNO₃, NaHCO₃, Na₂MoO₄·2H₂O, Na₂EDTA·2H₂O, NaH₂PO₄·H₂O, glicilglicina, tiamina·HCl, biotina, cianocobalamina (Sigma-Aldrich, USA), CaCl₂·2H₂O (Amresco, USA), MgSO₄·7H₂O (J.T.Baker, Japón), Na₂SiO₃·9H₂O, ZnSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O (Fisher Scientific, USA), K₂HPO₄, H₃BO₃ (VWR, USA), CoCl₂·6H₂O, MnCl₂·4H₂O (Alfa Aesar, Gran Bretaña) y FeCl₃·6H₂O (Merck, USA) fueron usados para preparar medios de cultivo. Etanol, diclorometano y n-hexano p.a. (Merck, Alemania) usados para las extracciones. Metanol, cloroformo (Merck, Alemania), β-caroteno, ácido linoleico y Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) usados para la prueba de blanqueamiento del β-caroteno. NaH₂PO₄·2H₂O (Sigma, Alemania) y Na₂HPO₄·7H₂O (Sigma, Japón) para preparar el buffer de fosfato 0.2 M (pH 6.6), junto con K₃Fe(CN)₆, FeCl₃·6H₂O (Sigma, China), ácido tricloroacético (Sigma, Reino Unido) usados para la prueba de poder reductor. Metanol y 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (Sigma, USA) usados para la prueba de DPPH. Estándares BHT (Sigma-Aldrich, USA) y ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, China) usados para las curvas de calibración de la actividad antioxidante. Estándares de carotenoides (fucoxantina, luteína, β-criptoxantina, α-caroteno, β-caroteno) y de polifenoles (rutina, luteolina, epicatequina, quercetina, ácido gálico (GA), ácido clorogénico, ácido ferúlico, apigenina, mangiferina) adquiridos de Sigma-Aldrich, Carl Roth, y HWI (USA) para

la identificación de antioxidantes. Solventes grado cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como metanol (Sigma-Aldrich, Canadá), acetonitrilo (Sigma-Aldrich, Francia), acetato de etilo (Merck, Alemania), tri-etil-amina (Sigma-Aldrich, Bélgica) y ácido acético (Merck, Alemania) utilizados para el análisis RP-HPLC-DAD. Kit de purificación DNA Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega, USA), colorante SYBR® Safe DNA (Invitrogen, USA), marcador de peso molecular de 100 bp (Promega, USA) y de 1 kb (Thermo Fisher Scientific, USA), GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA), colorante de carga (Thermo Scientific, USA) adquiridos para la extracción, purificación, evaluación y PCR.

2.2. Microalgas y condiciones de cultivo

Las microalgas fueron obtenidas del Laboratorio de Microalgas del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca. *Chlorella* sp. y *N. oculata* se cultivaron en un sistema cerrado de botellas de vidrio de borosilicato (Corning Pyrex®, modelo 2L, Alemania) adaptadas a un compresor electromagnético de aire (Jad Aquarium, modelo ACQ-009, Taiwan), que provee una fuente de 105 Watts, frecuencia 60 Hz, presión 0.03 MPa y caudal 160 L/min. Las botellas fueron colocadas sobre agitadores magnéticos (Cole-Parmer Lab Companion, modelo MS-12BB, Korea). *Chlorella* sp. fue cultivada en medio líquido Wright's Cryptophyte (WC) para especies de agua dulce, y *N. oculata* en medio f/2 para especies marinas (Andersen, 2005). Los medios fueron esterilizados a 121°C por 20 min en autoclave y enriquecidos con tiamina, biotina y cianocobalamina. El pH de los medios a 20°C fue 7.6 para WC y 7.2 para f/2 (potenciómetro Boeco, modelo BT-600, Alemania). La preparación de los medios consta en el Anexo 1. Se utilizó un tipo de cultivo discontinuo de acuerdo a condiciones estandarizadas para una mayor síntesis de polifenoles y carotenoides (Lucero & Siavichay, 2016). Estas condiciones incluyeron un fotoperíodo para *Chlorella* de 14:10 h de luz/oscuridad y para *Nannochloropsis* 10:14 h de luz/oscuridad con luz fluorescente (Italight) a 2300 luxes de intensidad (luxómetro Cole-Parmer Sper Scientific, modelo 840020, USA), doble concentración de nutrientes N y P (170.02 g/L NaNO₃, 17.42 g/L K₂HPO₄ para *Chlorella*; 150 g/L NaNO₃, 10 g/L NaH₂PO₄•H₂O para *Nannochloropsis*), temperatura ambiental 30°C (termómetro Fisher Scientific™, USA), agitación constante de 150 rpm y aireación constante de 20 L/min a través de un filtro de fibra de vidrio Hepa-Vent (Whatman™, USA) que provee aire esterilizado. Un inóculo de 200 ml de suspensión microalgal (dependiendo de la especie) fue agregado a 1800 ml del respectivo medio en cabina de bioseguridad clase II (Labconco Logic A, 3430001, USA).

2.3. Obtención de biomasa

La biomasa fue cosechada en la fase estacionaria de mayor actividad metabólica determinada por Lucero & Siavichay (2016). La biomasa fue obtenida después de 8 días de cultivo para *Chlorella* y después de 7 días para *N. oculata*, por centrifugación (Sigma, modelo 2-6, rotor 11030, Alemania) a 1351 g por 5 min (Lucero & Siavichay, 2016). El sedimento de la cosecha fue lavado dos veces con agua destilada, recuperado paulatinamente y almacenado a -20°C hasta completar la obtención de biomasa (Grimi et al., 2014). El rendimiento de biomasa fue evaluado por gravimetría con respecto al contenido de agua antes y después del centrifugado, y expresado en porcentaje (Solana, Rizza, & Bertucco, 2014). La biomasa total fue congelada a -80°C (Ultracongelador Arctiko Dairei, ULTF 80, Dinamarca) y liofilizada por 28 h (Liofilizador Labconco, modelo 7670520, USA) a 0.09 mbares y -52°C. Se reportó el peso de la biomasa en gramos y se almacenó en viales ámbar a -20°C hasta análisis posteriores.

2.4. Identificación genética

La identificación genética se realizó con la técnica Barcoding mediante extracción de ADN total siguiendo la metodología de Querci et al. (2006) con adaptaciones del protocolo del

Laboratorio de Biología Molecular del CIBE-ESPOL. Los marcadores cloroplastídeos amplificados por PCR fueron *matK* (Megakaryocyte-Associated Tyrosine Kinase, matura K del cloroplasto) y *rbcL* (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, codifica para RuBisCo), y los marcadores nucleares rDNA *ITS1* (Internal Transcribed Spacer entre los genes 18S y 5.8S rRNA) e *ITS2* (Internal Transcribed Spacer entre los genes 5.8S y 26S rRNA).

2.4.1. Extracción, purificación y evaluación del ADN genómico total

Se centrifugó 2 ml de biomasa fresca de cada microalga a 16000 g por 5 min (Centrífuga Eppendorf, modelo 5424, USA). El sedimento obtenido fue lisado con perlas de cerámica (1.4 mm, MagNA Lyser Green Beads, Roche, USA) y triturado en un molino (Retsch®, modelo MM 400, Alemania) a 30 Hz de frecuencia por 30 s para extraer el ADN. Estas muestras fueron sumergidas en nitrógeno líquido por 1 min para conservación. Para la extracción se utilizó 0.5 a 1 ml del sedimento que corresponde a 50 y 100 mg de biomasa, respectivamente (Balanza Thomas Scientific, modelo TSXB220A, USA). El ADN fue aislado por el método del bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) (Somma, 2006) (Anexo 2). El ADN fue purificado con el kit Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System por centrifugación con 40 µl de ADN. Este ADN purificado fue eluido con agua libre de nucleasa, incubado a temperatura ambiente por 1 min y centrifugado a 16000 g por 1 min. La elución fue reincubada a 65°C en estufa (Memmert, modelo SFD-400, USA) por 15 min y recentrifugada por segunda ocasión. El ADN eluido fue almacenado a -20°C y cuantificado en espectrofotómetro (Thermo Scientific, modelo NanoDrop 2000, USA) a 260 nm, utilizando software para análisis de datos Gen5™ con 2 µl de muestra. La calidad de ADN fue evaluada mediante electroforesis (BioRad subcell GT, modelo Wide mini sub y fuente de poder PAC 300, USA) en gel de agarosa al 1% en buffer TAE (Tris base-ácido acético glacial-EDTA) con SYBR® Safe DNA. Se adicionó loading DYE en cada muestra y se empleó un control negativo de agua y un marcador de peso molecular de 1 kb. Las muestras fueron corridas a 100 V por 30 min. Los fragmentos de ADN fueron revelados en un sistema de imagen molecular (BioRad, Gel Doc™+ XRT Universal Hood II) mediante transiluminación UV y con el programa de lectura de geles Quantity One.

2.4.2. Amplificación del código de barra molecular, secuenciación y análisis

La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue realizada con 2 y 10 µl de ADN de 20 ng/µl de concentración, y con 8 y 40 µl de GoTaq® Green Master Mix para la obtención de amplicones para visualización y secuenciación, respectivamente (Anexo 3). La amplificación de regiones específicas del genoma nuclear y plastídico se realizó por triplicado y usando un termociclador (Eppendorf, modelo 5345, USA) con primers universales que corresponden a dos espaciadores no codificantes *ITS1* e *ITS2* (Chen et al., 2010; Schoch et al., 2012; White et al., 1990) y dos porciones de genes codificantes *matK* y *rbcL* (CBOL Plant Working Group, 2009; Kress et al., 2005). Los detalles de marcadores moleculares, primers y condiciones de amplificación se resumen en la Tabla 1. Los productos de PCR se examinaron en gel de agarosa al 1.8% (*p/v*) en TAE por electroforesis a 100 V durante 30 min, con 10 µl de muestra para visualización de amplicones, y 50 µl para secuenciación, empleando un marcador molecular de 100 pb. Los geles fueron visualizados en el transiluminador y los productos de PCR purificados, cuantificados y secuenciados comercialmente (Macrogen, Maryland, USA) con un volumen de 7.5 µl de ADN y 7.5 µl de cada primer para cada gen.

Las secuencias individuales fueron comparadas con accesiones de la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide (BLASTN) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Kazi, Reddy, & Jha, 2013; Madden, 2013) para explorar similitudes. Así mismo, se realizó una secuencia consenso usando el programa MEGA 7.0 a partir de las secuencias de mejor calidad.

Tabla 1. Primers y programa de amplificación de los marcadores moleculares de este estudio

Marcador de ADN	Nombre de primers	Secuencia de primer 5'-3'	Condiciones de reacción de PCR	Tamaño medio del marcador (rango de tamaño) en bp	Referencia
<i>matK</i>	matK-3F_kim	ACCCAGTCCATCTG GAAATCTTGTTTC	95°C 4 min; 95°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 1.5 min por 40 ciclos; 72°C 10 min	862-910	(CBOL Plant Working Group, 2009)
	matK-1R_kim	CGTACAGTACTTTT GTGTTTACGAG			
<i>rbcL</i>	rbcL_F	ATGTCACCACAAA CAGAAACTAAAGC	95°C 2 min; 95°C 30 s, 60°C 1 min, 72°C 1.5 min por 38 ciclos; extensión final 72°C 10 min	654	(Kress et al., 2005)
	rbcL_R	GTAATAATCAAGTC CACCRG			
<i>nrITS1</i>	5a fwd	CCTTATCATTTAGA GGAAGGAG	95°C 4 min; 95°C 30 s, 56°C 1 min, 72°C 1.5 min por 41 ciclos; extensión final 72°C 10 min	707	(Schoch et al., 2012; White et al., 1990)
	4 rev	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC			
<i>nrITS2</i>	S2F	ATGCGATACTTGGT GTGAAT	95°C 4 min; 95°C 30 s, 50°C 1 min, 72°C 1.5 min por 41 ciclos; extensión final 72°C 10 min.	491	(Chen et al., 2010)
	S3R	GACGCTTCTCCAGA CTACAAT			

2.5. Extracción de antioxidantes por maceración con ultrasonificación asistida (UAE)

La biomasa fue sometida a técnicas físicas y químicas para extraer los bioproductos (Parniakov et al., 2015b). Los extractos fueron obtenidos mediante un ensayo aplicado en *Chlorella* por triplicado, empleando cuatro solventes de distinta polaridad, dos hidrofílicos para polifenoles y dos hidrofóbicos para carotenoides (Anexo 4). Los solventes fueron (i) EtOH:H₂O 50:50 (v/v), (ii) EtOH:H₂O 95:5 (v/v), (iii) DCM y (iv) n-hexano. El protocolo de extracción fue el mismo para compuestos hidrofílicos y lipofílicos (Sarker et al., 2006). En *N. oculata* se realizaron dos extracciones con los solventes de carácter polar y apolar que revelaron mayor actividad antioxidante en *Chlorella*. La extracción en *Chlorella* se realizó a partir de toda la biomasa obtenida, fraccionando 0.5 g para la extracción de compuestos hidrofílicos y 0.3 g para compuestos lipofílicos (balanza Mettler Toledo, modelo PB 1502-L, Alemania). La extracción en *N. oculata* se realizó de toda la biomasa, 0.41 g para una extracción hidrofílica y 0.41 g para una extracción lipofílica con los solventes seleccionados en *Chlorella* (EtOH:H₂O 95:5 y DCM). Se adicionó 20 ml de los respectivos solventes y se sometieron a maceración por 24 h a temperatura ambiente y en oscuridad en cabina de seguridad (Quimis®, modelo Q216-21, Brasil). Luego los extractos fueron sometidos a ultrasonificación directa (Ultrasonic Processor Sonics, modelo GEX500, USA) con sonda CV 334 (500 Watts, amplitud 20%, frecuencia 20 kHz), por 15 min a temperatura 10°C e intervalos de 5 min para una disrupción homogénea. Posteriormente los extractos fueron colocados en un baño de ultrasonido (Cole-Parmer, modelo 8893, México) por 5 h (frecuencia 40 kHz), controlando la temperatura del baño en 28°C. Transcurrido ese tiempo, los extractos fueron filtrados a través de papel filtro Whatman (tamaño de poro 11 µm) y el líquido colectado refrigerado a 5°C. En tanto, el remanente recuperado del papel fue sometido a nueva extracción con renovación de solvente fresco. La extracción fue repetida tres veces hasta una extracción exhaustiva del material microalgal. El solvente fue removido en un rotavapor (Heidolph, modelo Laborota 4000 efficient, Alemania) a 28°C y 60-120 rpm. Los extractos fueron rediseñados en el respectivo solvente de extracción y distribuidos en viales ámbar para desecación completa en el evaporador al vacío (LABCONCO™, modelo RapidVap™ Vacuum, USA) a condiciones iniciales de 500 mbares de presión, 14% de velocidad y 30°C de temperatura por 24 h, luego a 90% de velocidad hasta obtener los extractos

secos. El rendimiento de extracción para cada solvente fue calculado y expresado como mg extracto/g de peso seco, y como porcentaje de rendimiento (% *p/p*) con la ecuación (1):

$$\% \text{ Rendimiento extracción} = \left(\frac{\text{Peso extracto seco (g)}}{\text{Peso de biomasa para extracción (g)}} \right) (100) \quad (1)$$

2.6. Evaluación de la actividad antioxidante de *Chlorella* sp.

2.6.1. Método de captura de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Todos los extractos obtenidos fueron usados para evaluación de su potencial antioxidante. El método de DPPH mide la captura del radical libre estable de nitrógeno por parte de un antioxidante. Este radical en solución genera un color violeta que absorbe a 517 nm, el cual una vez mezclado con el antioxidante disminuye su absorbancia, lo que conlleva a una decoloración. El método es aplicable para antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos de acuerdo a Ben Ahmed et al. (2016). Las mediciones fueron corregidas con la absorbancia del extracto coloreado a 517 nm, preparando un blanco de muestra en metanol y con la ecuación (2) (Maadane et al., 2015).

$$A_{\text{blanco de muestra}} = \text{Absorbancia de muestra (con DPPH}^{\bullet}) - \text{Absorbancia de muestra (sin DPPH}^{\bullet}) \quad (2)$$

La solución de DPPH en metanol fue preparada a diario. Los extractos fueron disueltos en metanol a concentración de 0.25 y 0.10 mg/ml. Tras medir su absorbancia, se utilizó 1 ml de las soluciones con 1 ml de DPPH de concentración 6×10^{-5} mol/L (absorbancia 0.6-0.7). La mezcla fue agitada e incubada a temperatura ambiente por 30 min en oscuridad. La capacidad para atrapar el DPPH se evaluó por medio de la diferencia de absorbancia a 517 nm a 0 min y 30 min con un control (DPPH más metanol) y frente a un blanco (metanol) para encerrar el espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, modelo Genesys 10-S, USA). El ácido ascórbico se usó como referencia para la obtención de curvas de calibración a 7 concentraciones (1 a 8 $\mu\text{g/ml}$). La actividad antioxidante de los extractos fue determinada como % de captura de radicales DPPH (% RSA) con la ecuación (3) de Alam et al. (2013), y como capacidad antioxidante equivalente al ácido ascórbico (AAEAC) expresada como mg equivalentes de ácido ascórbico por g de peso seco con la ecuación (4) propuesta por Leong & Shui (2002) y modificada por Ben Ahmed et al. (2016). La actividad antioxidante del estándar fue además determinada por la concentración inhibitoria media (IC_{50}) calculada por regresión lineal.

$$\% \text{ RSA} = \left[\frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}})}{A_{\text{control}}} \right] (100\%) \quad (3)$$

A_{control} y A_{muestra} es la absorbancia del DPPH sin muestra y con muestra, respectivamente.

$$\text{AAEAC}_{(\text{mg AA/g})} = \left(\frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{control}}}{K} \right) (D) (V_{\text{extracto (ml)}}) \left(\frac{1}{W_{\text{muestra (g)}}} \right) \quad (4)$$

Donde A_{muestra} es la absorbancia del DPPH con muestra, A_{control} es la absorbancia del DPPH sin muestra, K es el valor de la pendiente de la curva estándar obtenido por estimación lineal, D es el factor de dilución del extracto (20 y 50), $V_{\text{extracto (ml)}}$ es el volumen de extracto usado en la reacción, y $W_{\text{muestra (g)}}$ es el peso de muestra usado para la extracción. Los ensayos se realizaron por triplicado y protegidos de la luz.

2.6.2. Método de poder reductor

El método mide la capacidad de un antioxidante para reducir un complejo férrico a un complejo ferroso azul oscuro por espectrofotometría, donde una absorbancia alta indica un alto poder reductor. Se evaluó la capacidad reductora de los extractos hidrofílicos con el método de

Alam et al. (2013). Se empleó un volumen de 2.5 ml de buffer fosfato de sodio 0.2 M (pH 6.6) y 2.5 ml de $K_3Fe(CN)_6$ 1% (p/v) añadidos a 1 ml de extracto en metanol a dos concentraciones (0.5 y 1 mg/ml). La mezcla fue incubada a 50°C en baño María (Mettler, modelo WNB 10, Alemania) por 20 min, seguido de la adición de 2.5 ml de ácido tricloroacético 10% (p/v). La mezcla fue centrifugada a 3000 rpm por 10 min (Sigma, modelo 2-6, rotor 11031, Alemania) para coleccionar 2.5 ml de la capa superior y mezclar con 2.5 ml de agua destilada y 0.5 ml de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.1% (p/v) preparado en el momento. Luego de incubar a temperatura ambiente por 10 min, se midió la absorbancia de la solución resultante a 700 nm contra un blanco de metanol, y usando un control de reactivo. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las curvas de calibración fueron construidas con ácido ascórbico en metanol a 6 concentraciones equidistantes (10 a 100 $\mu g/ml$). La actividad antioxidante fue determinada con la ecuación (4).

2.6.3. Método de blanqueamiento del β -caroteno

La actividad de los extractos lipofílicos fue determinada con el método de Velioglu et al. (1998). El ensayo se basa en la capacidad de los extractos para disminuir la decoloración del β -caroteno en una emulsión con ácido linoleico, el cual se oxida en agua saturada de O_2 y los radicales peróxidos generados oxidan también al β -caroteno. Se empleó 1 ml de β -caroteno (0.2 mg/ml en cloroformo) con 0.02 ml de ácido linoleico y 0.2 ml de Tween 20. Se evaporó el solvente bajo corriente de nitrógeno, se añadió 50 ml de agua destilada oxigenada (flujo 2 L/min por 2 min) y se agitó hasta formar una emulsión. Se tomó 2.5 ml de esta emulsión en tubos y se añadió: para el control 100 μl de metanol/diclorometano (MeOH:DCM) 90:10 (v/v), para las muestras 100 μl de extracto disuelto en el mismo solvente a dos concentraciones (1 y 2 mg/ml), y para el estándar 100 μl de BHT en MeOH:DCM 90:10 (v/v) usado para la curva de calibración a 5 concentraciones (6.25 a 100 $\mu g/ml$), frente a una emulsión sin β -caroteno como blanco de calibración. Las muestras, controles y estándares fueron sometidos a autooxidación térmica a 50°C en baño María (Mettler, modelo WNB 10, Alemania) por 1 h. La absorbancia fue leída a 470 nm al tiempo 0 y cada 15 min. Los ensayos se realizaron por triplicado y protegidos de la luz. La actividad antioxidante fue expresada como % de inhibición de blanqueamiento del β -caroteno (% AA), relativa al control aplicando la tasa de degradación de los extractos con las ecuaciones (5) y (6) de Saikhan et al. (1995):

$$\text{Tasa de degradación de muestra} = \ln(a/b) \left(\frac{1}{t} \right) \quad (5)$$

Donde, \ln = log natural, a = Abs inicial a 0 min (470 nm), b = Abs a 60 min (470 nm). A mayor concentración de extracto, menor es la degradación, y mayor la capacidad antioxidante. Se utilizó para la ecuación de AA%.

$$\% AA = \left(\frac{\text{Tasa de degradación}_{\text{control}} - \text{Tasa de degradación}_{\text{muestra}}}{\text{Tasa de degradación}_{\text{control}}} \right) (100) \quad (6)$$

Donde, *Tasa de degradación* (control y muestra) fueron las tasas de blanqueamiento de la mezcla sin y con antioxidante, respectivamente. Además, la actividad antioxidante se expresó como tasa de velocidad de oxidación (ORR) que es una medida de resistencia a la oxidación con la ecuación (7) de Marinova et al. (1994), donde R_{muestra} y R_{control} representan lo mismo que en ecuación (6). La ORR va de 0 a 1, valores cercanos a 1 indican mayor oxidación, y valores cercanos a 0, indican menor oxidación, y por ende mayor capacidad antioxidante.

$$ORR = \frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{control}}} \quad (7)$$

Finalmente se calculó el coeficiente de actividad antioxidante (AAC), que es una estimación del grado de oxidación relativa en presencia de un antioxidante, respecto al grado de oxidación

en su ausencia, con la ecuación (8) de Mallet et al. (1994). Donde $A_{s(120)}$ fue la absorbancia de la muestra a 120 min, $A_{c(0)}$ y $A_{c(120)}$ fueron la absorbancia del control a 0 y 120 min, respectivamente. Este coeficiente se estima de 0 a 1000.

$$AAC = \left(\frac{A_{s(120)} - A_{c(120)}}{A_{c(0)} - A_{c(120)}} \right) (1000) \quad (8)$$

2.7. Caracterización química por HPLC en ambas microalgas

2.7.1. Análisis, identificación y cuantificación de carotenoides

Se empleó el método adaptado de Armenta et al. (2006). Todos los extractos lipofílicos fueron analizados por RP-HPLC-DAD (Agilent Technologies, modelo 1200 Series, Alemania) equipado con desgasificador, bomba cuaternaria, automuestreador con termostato y arreglo de fotodiodos (DAD) para la detección de carotenoides a 410, 450 y 470 nm de longitud de onda, y conectado al software Agilent ChemStation para la identificación y cuantificación de los compuestos. La separación fue realizada en columna de fase reversa YMC™ C₃₀ (250 mm x 4.6 mm, 5 μm, Waters, USA) con una velocidad de flujo de 1 ml/min a 30°C de temperatura de la columna. Las fases móviles fueron A: metanol/acetonitrilo 9:1 (v/v) y B: acetato de etilo + 2.5% (v/v) de tri-etil-amina. Las fases móviles fueron filtradas con membranas de nylon (0.45 μm tamaño de poro, 47 mm diámetro, Aura, USA). El gradiente de elución utilizado fue: 0 min, 100% A, 0% B; 25 min 40% A, 60% B; 30 min, 40% A, 60% B; 35 min 100% A; 0% B; 40 min 100% A, 0% B con un período de equilibración de 10 min en las condiciones de inicio antes de cada inyección. Los extractos fueron disueltos en 1 ml de solvente 1:1 (v/v) de acetato de etilo:acetonitrilo/metanol (10:90). Las muestras fueron homogenizadas en vórtex y sonicadas en baño de ultrasonido (Branson, modelo 3510R-DHT, México) por 10 min a 20°C. Los extractos fueron filtrados con filtro de membrana PVDF (0.45 μm tamaño de poro, Whatman) y luego diluidos en fase móvil A (1/10). Se empleó un volumen de inyección de 25 μl para HPLC. Los carotenoides fueron identificados por comparación de tiempos de retención y espectros de absorción de los picos obtenidos con 5 estándares (α-caroteno, β-caroteno, β-criptoxantina, fucoxantina, luteína). Para la cuantificación se construyeron curvas de calibración con 7 concentraciones equidistantes de estándares (0.10 a 30 μg/ml) disueltos en DCM + BHT 0.1% y diluidos con fase móvil A. La cuantificación de carotenoides se realizó con las áreas obtenidas a la absorbancia de 450 y 410 nm. Las concentraciones de carotenoides fueron comparadas entre los solventes DCM y hexano, y entre las dos especies de microalgas.

2.7.2. Análisis, identificación y cuantificación de compuestos fenólicos

Se empleó el método RP-HPLC-DAD del Laboratorio de Alimentos y Nutrición del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca. Todos los extractos hidrofílicos fueron analizados para la detección de polifenoles a 254, 280 y 320 nm de longitud de onda. La separación fue realizada en columna de fase reversa ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 μm, Agilent, USA) con una velocidad de flujo de 1 ml/min a 30°C de temperatura de la columna. Las fases móviles fueron A: agua/ácido acético 0.3% (v/v); B: acetonitrilo/agua 50:50 (v/v) + ácido acético 0.3%; C: acetonitrilo. Las fases se filtraron igual como en carotenoides. El gradiente de elución usado fue: inicio 10% B hasta 2 min, seguido de un incremento al 55% B hasta los 37 min, luego disminuyó a 0% a los 39 min y finalmente regresó a las condiciones iniciales de 10% B a los 43 min, mantenidos por 0.5 min adicionales para equilibración antes de cada inyección. El solvente C se utilizó para lavado de la columna, incrementándose desde 0% a los 37 min a 100% a los 39 min, manteniéndose así hasta los 43 min. Los extractos fueron disueltos en 1 ml de metanol, homogenizados y sonicados en baño de ultrasonido por 10 min a 20°C. Luego fueron filtrados antes del análisis con filtro PVDF. Se preparó diluciones 1:10 en

metanol y se inyectó 10 µl de estas diluciones en el HPLC. Los compuestos fenólicos fueron identificados por comparación de tiempos de retención y espectros de absorción de los picos con nueve estándares, ácidos fenólicos (GA, clorogénico, ferúlico), flavonoides (epicatequina, apigenina, rutina, luteolina, quercetina) y xantonas (mangiferina). Se construyeron curvas de calibración con 5 concentraciones equidistantes (50 a 1000 µg/ml) con los estándares disueltos en metanol. La cuantificación de polifenoles se realizó con las áreas obtenidas a las absorbancias seleccionadas. Las concentraciones de polifenoles fueron comparadas entre los solventes EtOH:H₂O 95:5 y EtOH:H₂O 50:50, y entre las especies de microalgas.

2.8. Análisis estadístico

La comparación de la eficiencia de las extracciones se realizó mediante las condiciones experimentales del ensayo aplicado en *Chlorella*. Las mediciones de la actividad antioxidante por los tres métodos fueron las variables respuestas comparadas. Los resultados fueron expresados como promedio ± desviaciones estándar (SD). Se aplicó una prueba *t*-Student para evaluar las diferencias significativas de la capacidad antioxidante entre los solventes según el tipo de ensayo (hidrofílico y lipofílico) ($p < 0.05$). Y se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) como prueba general para la significancia de resultados de AAEAC y % RSA entre todos los solventes, con un nivel de significancia estadística del 5% ($p < 0.05$). Se aplicó el test de Bartlett para la homogeneidad de varianzas, y las pruebas post hoc, test de Scheffe y Tukey de comparaciones múltiples, para evaluar dichas diferencias significativas. El análisis estadístico se realizó con el programa STATA versión 10.0. El resto de análisis fueron descriptivos.

3. Resultados y discusión

3.1. Cultivo, obtención de biomasa y rendimiento de biomasa

Varias estrategias se han empleado para mejorar el crecimiento y producción de metabolitos secundarios en microalgas (Gris, Morosinotto, Giacometti, Bertucco, & Sforza, 2014; Goiris et al., 2015). *Chlorella* y *N. oculata* fueron cultivadas en condiciones optimizadas de crecimiento. El enriquecimiento del medio con nitrógeno influye en la producción de polifenoles y flavonoides, y el fósforo en la producción de carotenoides (Lucero & Siavichay, 2016). De manera análoga, Goiris et al. (2015) reportaron que el crecimiento es mayor en cultivos saturados de nutrientes, que inciden en el aumento de estos mismos compuestos, e incluso en mayor actividad antioxidante. Las condiciones utilizadas en este estudio generaron para *Chlorella*, un volumen de 55 ml de suspensión microalgal de 22 L de cultivo, una productividad de biomasa de 0.22 g/L y 4.85 g de biomasa liofilizada (15.9 % de rendimiento). Para *N. oculata* se obtuvo 39.5 ml de suspensión microalgal de 40 L de cultivo, productividad de 0.02 g/L y 0.84 g de biomasa liofilizada (6.9 % de rendimiento). Se ha reportado que los sistemas de cultivo abierto producen una densidad celular variable de 1 a 46 g/L de peso seco en *Chlorella* sp. (Doucha & Lívanský, 2006; Masojídek, Kopecký, & Giannelli, 2011), mientras que la productividad de biomasa disminuye en cultivos cerrados (Chisti, 2007). Para *N. oculata*, esta condición permitió la obtención de escasa biomasa, en contraste a la productividad de 0.57 g/L reportada por Reboloso et al. (2001), atribuible a la baja tasa de crecimiento y al pequeño tamaño celular de *Nannochloropsis*, que hace difícil su crecimiento y extracción (Rocha, García, & Henriques, 2003). Por otro lado, Wahidin et al. (2013), Krzemińska et al. (2015) y Gris et al. (2014) reportaron que el incremento de la intensidad de luz en cultivos de microalgas como *Nannochloropsis* sp., *C. protothecoides* y *Scenedesmus obliquus*, respectivamente, aumenta el crecimiento, productividad de biomasa y el contenido de metabolitos. Por ejemplo, *C. vulgaris* a 30°C de temperatura, 2000 luxes de iluminación y fotoperíodo de 12:12 h de luz/oscuridad generó un rendimiento de 0.39 g/L (Mohammadi, Arabian, & Khalilzadeh, 2016).

3.2. Análisis *Barcoding* e identificación genética

Hebert et al. (2003) propuso el uso de “código de barras de ADN” como herramienta para explorar pequeñas secuencias incrustadas en cada célula, constituyéndose en una alternativa a las limitaciones de los sistemas de identificación basados en morfología y al número reducido de taxonomistas para el reconocimiento de especies. La caracterización basada en marcadores moleculares en algas marinas permite estudiar y resolver estos problemas (Kazi et al., 2013; Leliaert et al., 2014). Por ello se llevó a cabo la secuenciación de ADN de *Chlorella* y *N. oculata* para contribuir a su caracterización. Se realizó la secuenciación de los loci *matK* y *rbcL* de cloroplastos y de las regiones *ITS1* e *ITS2* rADN nuclear. Los amplicones se obtuvieron por extracción de ADN de biomasa fresca. La concentración de ADN purificado fue de 79.6 a 121.6 ng/μl en *Chlorella* sp. y 182.7 a 400.7 ng/μl en *N. oculata*. De estos marcadores, *matK* no amplificó en ninguna de las muestras, y se corrobora su ausencia en microalgas, tal como se reporta en Lemieux et al. (2000) para algas verdes. Los restantes amplicones se obtuvieron con particularidades. *rbcL* amplificó a 60°C de temperatura de alineamiento. *ITS1* exhibió las bandas a 56°C de alineamiento y 41 ciclos de PCR. *ITS2* exhibió bandas a 50°C y 41 ciclos de PCR (Figura 1).

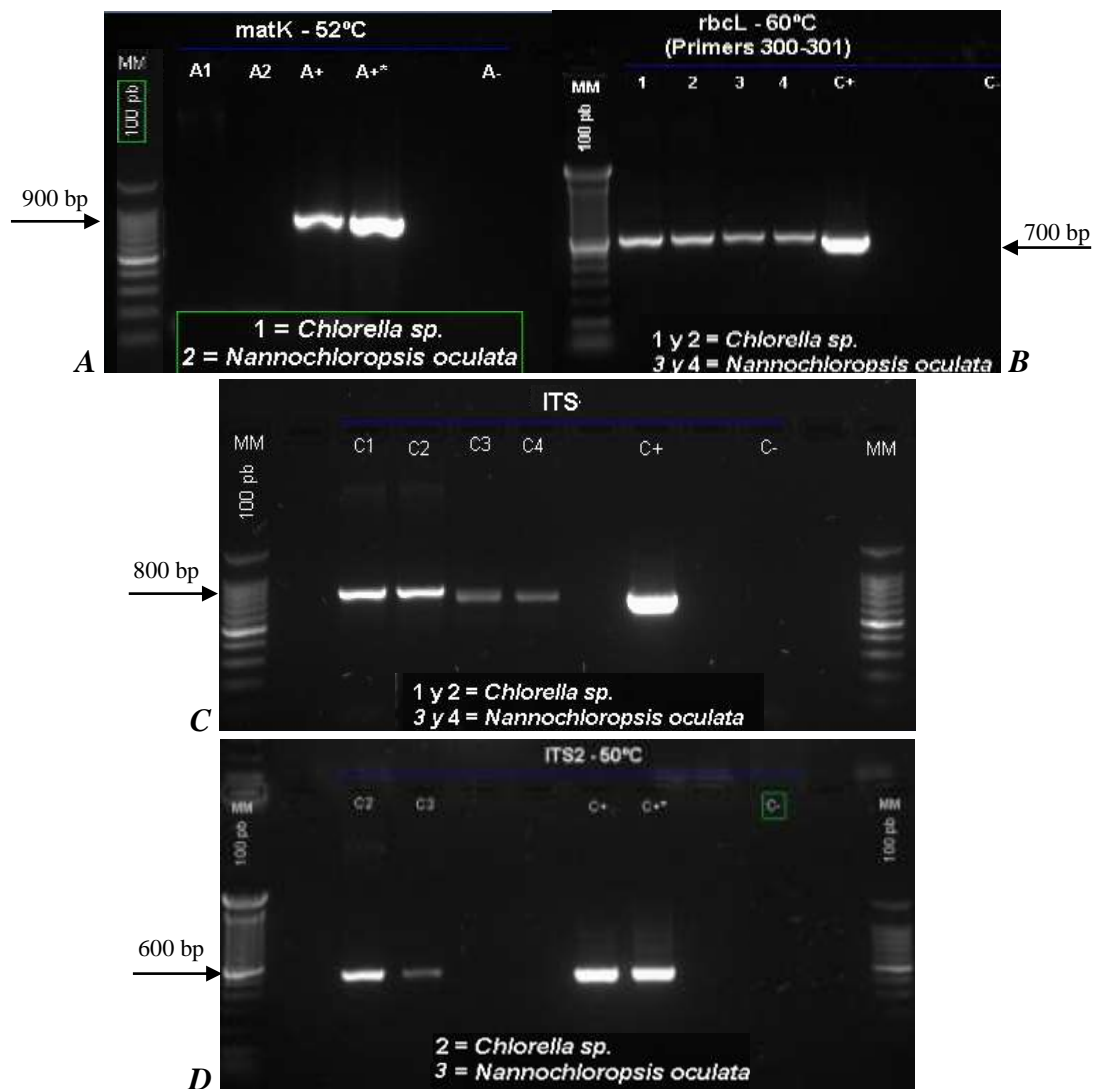


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR dirigidos a marcadores de interés de genes para *Chlorella* y *Nannochloropsis*. (A) No amplificación de *matK*. (B) Amplificación de *rbcL*. (C) Amplificación de la región *ITS1*. (D) Amplificación de la región *ITS2*. MM: marcador de peso molecular 100 bp

En el análisis de secuencias en el GenBank, se observaron similitudes para *Chlorella* con las secuencias *ITS*, pero no se encontraron secuencias altamente similares para *rbcL*. En tanto las secuencias de *N. oculata* para *rbcL*, *ITS1* e *ITS2* no pudieron ser alineadas ni comparadas, y fueron removidas del análisis. Las secuencias presentadas son las únicas de buena calidad con un hit de identidad con microalgas (Tabla 2), y fueron usadas para la secuencia consenso que también se analizó (Figura 2 y Tabla 3). Los porcentajes de identidad son próximos al ideal del BLASTN (99.9%) (NCBI Handbook, 2014). Esto probablemente debido a la calidad de las secuencias, o a una alta proporción de secuencias que no pueden asignarse a ninguna especie, a causa de la heterogeneidad morfológica y fisiológica de microalgas, atribuida al polimorfismo genético, al ambiente, a su complejidad microscópica (Leliaert et al., 2014; Saunders, 2005; Saunders & Le Gall, 2010). Además, dado que *matK* está ausente en algas, es vital elegir códigos de barras específicos, especialmente en microalgas (Zou et al., 2016). Los resultados del BLASTN mostraron la congruencia más alta de similitud con *Chlorella luteoviridis* para la región *ITS2*, que es más conservada que *ITS1*, por lo que es un amplicón más predecible para *Chlorella* según Chen et al. (2010) y Bock et al. (2011). De hecho, el linaje de *Chlorella* fue soportado más por estas secuencias que por las secuencias de cloroplastos como reporta Leliaert et al. (2012). Dada la diversidad y complejidad de *Chlorella* que forma un grupo heterogéneo de especies, y considerando que aún hay discusión en torno al fragmento de ADN conveniente a usar, resulta útil aplicar múltiples marcadores (Bock et al., 2011; Mann et al., 2010). No hay un barcoding oficial para algas, pero varios trabajos han planteado códigos moleculares como marcadores plástidos (*tufA*, *rbcL*), nucleares (*SSU* rDNA, *LSU* rDNA, *ITS* rDNA, *18S* rRNA) y mitocondriales (*COXI*) (Evans & Mann, 2009; Leliaert et al., 2014). Un estudio en *Chlorella* propone *tufA* como código de barras específico junto con *ITS* y *rbcL*, en macroalgas *rbcL* tiene bajo éxito de amplificación, pero por otro lado, los *ITS* tienen mayor poder discriminatorio sobre plastidios, como se lo demostró en el presente estudio (Zou et al., 2016). Protist Working Group recomienda trabajar con un código de barras universal en eucariotas para una identificación preliminar y un código de barras específico (Pawlowski et al., 2012).

Tabla 2. Resultados de similitudes de secuenciaciones en BLASTN

Marcador	Secuencia	Descripción	Accesión GenBank	Cubrimiento de la secuencia	Valor E	Identidad
<i>ITS1</i>	103_4_rev	<i>Chlorella</i> sp.	KF689555.1	67%	5e-68	87%
	105_4_rev	<i>Chlorella</i> sp.	KF689555.1	52%	3e-62	84%
<i>ITS2</i>	93_S2F	<i>Micractinium</i> sp.	JX889642.1	90%	5e-154	88%
	107_S3R	<i>Chlorella luteoviridis</i>	FR865678.1	57%	5e-114	94%

GTGCGGCTCACCCCTCGCCCTCCCTCCCCCTGTGGATGTGAGAGCGGATCTGGCCCTCCCGGCT
 CCTCTCCGACTTGTTCGGCGAGTCCGGGTCCGGCTGAAGTGTAGAGGCTTGAAGCATGGACCCCGT
 TTGTAGGGCAATGGCTTGGTAGGTAGCACCCGCTACACCGCCTGCCGTCGTCGAGGGGACTTT
 GCTGGCGGCCAGCAGGAATTCGGTTCGGCTTCTGTGACCGAATGCTTACACCTTCGACCTGA
 GCTCAGGCAAGACTACCCGCTGAAGTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACTA
 GGATGCCCTTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGCAAAGCCCAAC

Figura 2. Secuencia consenso utilizando las secuencias 93, 103, 105 y 107 correspondientes al *ITS1*, *ITS2*

Tabla 3. Análisis con BLASTN del consenso del *ITS1*, *ITS2*

Organismo	Accesión	Valor E	Identidad
<i>Micractinium</i> sp.	JX889642.1	1e-130	90%
<i>Chlorella vulgaris</i>	MF459966.1	1e-125	90%
<i>Chlorella luteoviridis</i>	FR865678.1	5e-124	90%
<i>Chlorellaceae</i> sp.	KP204586.1	2e-122	89%
<i>Chlorellaceae</i> sp.	KP204585.1	2e-122	89%

3.3. Eficiencia de la extracción de compuestos bioactivos

En este estudio se procuró optimizar la extracción de carotenoides y polifenoles, a través de extracción por ultrasonido y maceración con cuatro solventes, evaluando la influencia de su polaridad en la extracción. Se ha demostrado que la combinación de estas técnicas incrementa y acelera la extracción, y reduce la toxicidad del solvente (Armenta et al., 2006; Singh et al., 2015). Los rendimientos de extracción se presentan en la Tabla 4. El rendimiento de extracción de *Chlorella* sp. fue más alto que el de *N. oculata*. *Chlorella* sp. generó el rendimiento más alto con EtOH:H₂O 50:50 de 25.4%, seguido de EtOH:H₂O 95:5 de 22.1%. DCM y hexano produjeron 7.9% de rendimiento. *N. oculata* generó 3.5% de rendimiento con EtOH:H₂O 95:5 y 1.2% con DCM. En el estudio de Rodríguez & Guil (2008) se reporta 30% de rendimiento de extracción etanólica. En Cha et al. (2010) se reporta un rendimiento alto con etanol 90% (~30%) y bajo con etanol 50% (~12.5%), coincidiendo con Agregán et al. (2018) en que el etanol mejoró el rendimiento de extracción. Sin embargo, Sánchez et al. (2016) explica que el etanol al 100% proporciona usualmente rendimientos más bajos que cuando se usa en mezcla con agua, el etanol es más selectivo en extraer polifenoles y el agua en extraer material en bruto. Esto debido a que las algas contienen abundantes componentes solubles en agua (Wang et al., 2009). De forma similar, en Choochote et al. (2014) se describe que los rendimientos de extractos en agua caliente fueron más altos que los de extractos etanólicos, pero estos últimos mostraron mejor actividad antioxidante. En Zakaria et al. (2017) se reporta un rendimiento de extracción en *Chlorella* sp. con agua subcrítica de 25.6% a 100°C y de 50.1% a 200°C. Varios trabajos exhiben rendimientos de extracción en *C. vulgaris* que son más bajos a los del presente estudio, como por ejemplo: 77.8 mg/g y 97.3 mg/g de extracto hidroetanólico 50:50 con extracción ultrasónica (Agregán et al., 2018; Wang et al., 2010), 87.1 mg/g de extracto acuoso con extracción supercrítica (Wang et al., 2010), 47.9 mg/g y 6.7 mg/g de extracto etanólico y hexánico, respectivamente, con extracción ultrasónica (Plaza et al., 2012). extracción y solvente, y han identificado al etanol como el más eficiente en producir altos rendimientos de extracción de flavonoides y carotenoides de plantas y microalgas, aún con otros métodos de extracción (Bazykina, Nikolaevskii, Filippenko, & Kaloerova, 2002; Cha et al., 2010; Guedes et al., 2013; Koo et al., 2012). Los solventes alcohólicos incrementan la eficiencia

Este estudio concuerda con varios autores que reportaron haber optimizado el proceso de extracción de componentes polares y de polaridad media (Sarker et al., 2006). Generalmente los extractos etanólicos tienen alta actividad antioxidante y gran rendimiento de extracción, en tanto que los extractos acuosos exhiben baja actividad antioxidante y están sujetos a degradación (Bazykina et al., 2002). Por otro lado, este trabajo coincide con Koo et al. (2012), en que la extracción con hexano adecuado para extraer carotenoides hidrófobos debido a su naturaleza no polar, tiene una baja eficiencia de extracción conjuntamente con DCM, según las condiciones experimentales de este estudio.

Tabla 4. Evaluación del rendimiento de extracción de biocompuestos con los diferentes solventes

Microalga	Solvente	Rendimiento	
		(% p/p)	(mg/g)
<i>Chlorella</i> sp.	EtOH:H ₂ O 50:50 (v/v)	25.41 ± 1.21 ^a	254.13 ± 12.12
	EtOH:H ₂ O 95:5 (v/v)	22.07 ± 9.26 ^a	220.73 ± 92.58
	DCM	7.87 ± 0.94 ^a	78.67 ± 9.40
	n-Hexano	7.86 ± 2.23 ^a	78.56 ± 22.35
<i>N. oculata</i>	EtOH:H ₂ O 95:5 (v/v)	3.46 ^b	34.63
	DCM	1.20 ^b	11.95

^a Media ± SD de tres mediciones

^b Una sola medición

3.4. Capacidad antioxidante de los extractos microalgales

La actividad antioxidante resulta de la interacción entre los distintos compuestos presentes en los extractos naturales que contribuyen a ese efecto (Goiris et al., 2012; Rodríguez & Guil, 2008). Por ello es importante evaluar esta capacidad con varios métodos para generar un perfil antioxidante y distinguir el mecanismo dominante (Apak et al., 2013; Prior et al., 2005; Shahidi & Zhong, 2015b). Existen estudios que correlacionan capacidad antioxidante y su contenido. En Hajimahmoodi et al. (2010) se reportó una correlación significativa entre compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en *C. vulgaris*. En Safafar et al. (2015) se reportó que ambos compuestos contribuyeron a la captura de radicales DPPH en distintas microalgas. Otros estudios revelaron una correlación insignificante, sugiriendo que estos compuestos podrían no ser los principales contribuyentes a la actividad antioxidante (Goh, Yusoff, & Loh, 2010; Li et al., 2007; Maadane et al., 2015). En este estudio se utilizó tres ensayos de actividad antioxidante en *Chlorella*. Los extractos de *N. oculata* no fueron probados. *Chlorella* demostró importante actividad antioxidante, pero no fue comparable a la actividad de los estándares empleados.

3.4.1. Actividad antioxidante en *Chlorella* sp. con el ensayo de DPPH

Con este ensayo se comparó los resultados de todos los extractos de *Chlorella* sp. (Tabla 5). La curva de calibración del ácido ascórbico se usó para la estimación lineal de la pendiente en el cálculo de actividad antioxidante. Los coeficientes de determinación (R^2) fueron de 0.98 a $t=0$ min y 0.97 a $t=30$ min. El % RSA fue estadísticamente diferente entre la concentración alta y baja (t -test, $p<0.001$) de los solventes hidrofílicos y lipofílicos. Este incremento de actividad antioxidante consecuente al incremento de concentración se ha descrito también en Choochote et al. (2014) y Safafar et al. (2015). El % RSA fue estadísticamente diferente a concentración baja (ANOVA, $p<0.001$), a concentración alta (ANOVA, $p<0.001$) y entre solventes (ANOVA, $p<0.011$). A concentración alta, el DCM mostró la mayor actividad antioxidante (82.9% RSA), seguido de EtOH:H₂O 95:5 (79.6% RSA). A su vez, éstos fueron estadísticamente diferentes del EtOH:H₂O 50:50 y hexano. A concentración baja, el EtOH:H₂O 95:5 mostró la mayor actividad antioxidante (39% RSA), seguido de DCM (35.5% RSA), ambos estadísticamente diferentes del EtOH:H₂O 50:50 y hexano. Para la AAEC, expresada por gramo de peso seco, no se observó diferencia estadísticamente significativa en función de la concentración, pero se encontraron diferencias significativas entre solventes (ANOVA, $p<0.001$). El extracto de DCM mostró la mayor actividad antioxidante (29.1 mg AA/g), seguido de EtOH:H₂O 95:5 (24.4 mg AA/g), ambos estadísticamente diferentes del hexano y EtOH:H₂O 50:50. Por tanto, EtOH:H₂O 95:5 y DCM mostraron el mejor perfil antioxidante hidrofílico y lipofílico, respectivamente.

El ácido ascórbico mostró una capacidad superior a los extractos microalgales. Este compuesto es ampliamente usado como referencia en la evaluación comparativa, y reacciona muy rápido con el DPPH (1.15 min), a diferencia de polifenoles como curcumina (180 min) o rutina (104 min) (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995; Huang, Ou, & Prior, 2005; Mishra et al., 2012). De igual forma, se ha reportado que el BHT tiene una actividad superior, frente a una reconocida actividad antioxidante de extractos etanólicos de *Chlorella* (Choochote et al., 2014). Esto explica que los estándares muestren un potente efecto de barrido de radicales (Maadane et al., 2015; Molyneux, 2004).

La comparación de la capacidad antioxidante con resultados publicados para *Chlorella* es compleja, debido a las variantes en la metodología del DPPH como solvente, concentración de DPPH, longitud de onda y tiempo de reacción, además de los diversos cálculos que expresan la captura o barrido de radicales DPPH (Assunção et al., 2017; Molyneux, 2004). En general, se observa que los resultados de este estudio son similares e incluso superiores a los reportados en la literatura. En cuanto a extractos etanólicos, en Choochote et al. (2014) se reportó valores de

68.2% y 58.9% de inhibición de DPPH para *Chlorella* sp.E53 y sp.ED53, respectivamente (concentración 1.4 mg/ml); en Maadane et al. (2015) se reportó en *Chlorella* sp. un valor superior al 80% de inhibición (concentración 1 mg/ml); en Assunção et al. (2017) se reportó para *C. vulgaris* 13.9% de inhibición (concentración 10 mg/ml). En extractos acuosos, en Hajimahmoodi et al. (2010) se reportó para la fracción de agua extracelular de *C. vulgaris* 109% de inhibición y para la fracción de masa celular 6.2% (concentración 1 mg/ml); mientras que en Zakaria et al. (2017) se obtuvo 54.3% de inhibición en *Chlorella* sp. mediante extracción con agua subcrítica. En extractos metanólicos, en el estudio de Safafar et al. (2015) se reportó 34.1%, 26.2% y 11.7% de inhibición en *C. sorokiniana* a concentraciones de 1, 0.5, y 0.25 mg/ml, respectivamente; en Hemalatha et al. (2013) se reportó 23.1% de inhibición en *C. marina*; en Jayshree et al. (2016) se reportó 92.6% de inhibición en *C. vulgaris* (concentración de 1 mg/ml). Saranya et al. (2014) reportaron para el extracto metanólico de *C. salina* un valor aproximado de 17% de inhibición, y para el extracto hexánico 12%. Para extractos hidroetanólicos, en Agregán et al. (2018) se reportó 0.86 μmol equivalente Trolox (TE)/g peso seco para EtOH:H₂O 50:50 de *C. vulgaris*. En Wang et al. (2010) se demostró en extractos de *C. vulgaris* (concentración 0.83 mg/ml) con fluidos supercríticos un valor más alto de inhibición (47.3%) que con extracción ultrasónica (0.7%). En Hu et al. (2007) se reportó para casi todos los extractos de *C. pyrenoidosa* sometidos a distintas condiciones de extracción supercrítica, actividades antirradicales que variaban de 29.7% a 54.2% de inhibición, más altas que las referencias comerciales. Ahmed et al. (2014) registraron una inhibición de DPPH casi similar para cinco extractos fraccionados de *Chlorella* sp. 30.3% para cloroformo, 41% para hexano, 42% para etanol 70%, 42.3% para agua y 42.6% para etil acetato.

3.4.2. Actividad antioxidante en *Chlorella* sp. con el ensayo de poder reductor

Este ensayo permitió comparar los extractos hidrofílicos de *Chlorella* sp. (Tabla 5). La curva de calibración del ácido ascórbico se usó para la estimación lineal de la pendiente en el cálculo de AAEAC, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.99. La AAEAC se expresa por gramo de peso seco, corroborándose al observar que no hay diferencia estadísticamente significativa en función de la concentración, pero existe diferencia significativa dependiente del solvente (*t-test*, $p < 0.001$). EtOH:H₂O 95:5 (*v/v*) mostró la mayor AAEAC (52.9 mg AA/g) ($p < 0.001$), estableciéndose como el solvente polar con mejor actividad antioxidante. El poder reductor del ácido ascórbico fue superior al de los extractos microalgales reportados.

La actividad antioxidante con métodos basados en poder reductor ha sido reportada en *Chlorella* en varios trabajos. En extractos metanólicos, Safafar et al. (2015) reportaron en *C. sorokiniana* con el ensayo de poder antioxidante de reducción férrica FRAP (expresado como mg equivalentes de ácido ascórbico por gramo), valores de 0.32, 0.25 y 0.18 mg AA/g a concentraciones de 1, 0.5 y 0.25 mg/ml, respectivamente; en Hemalatha et al. (2013) se reportó en *C. marina* 0.73 mg AA/g; en Jayshree et al. (2016) se reportó en *C. vulgaris* un poder reductor en valores de absorbancia de 0.245 a 1 mg/ml, menor a 0.630 del ácido ascórbico; en Saranya et al. (2014) se reportó en *C. salina* para el metanol un poder aproximado de 0.75 mg AA/g y para el hexano un valor aproximado de 0.3 mg AA/g. En extractos acuosos, en Hajimahmoodi et al. (2010) se reportó en *C. vulgaris* un poder de 58.2 μmol TE/g para la fracción de agua extracelular y 31.1 μmol TE/g para la fracción de masa celular (1 mg/ml). Wang et al. (2010) evaluaron extractos de *C. vulgaris* (concentración 0.83 mg/ml) y obtuvieron con fluidos supercríticos un poder reductor (12.1 mg FeSO₄) mayor que con extracción ultrasónica (5.2 mg FeSO₄). En extractos hidroetanólicos, Agregán et al. (2018) reportaron en *C. vulgaris* un poder de 0.62 μmol TE/g peso seco para etanol/agua 50:50 (*v/v*) por extracción ultrasónica. En Goiris et al. (2012) se reportó para distintos lotes de *C. vulgaris* producidos en condiciones diferentes, valores de poder reductor de 6.37 a 64 μmol TE/g peso de extractos de etanol/agua 3:1 (*v/v*).

En general, estos hallazgos con distintos solventes son más bajos a los encontrados en el presente estudio. Si bien los compuestos fenólicos son capaces de reducir el hierro, es importante resaltar que este elemento podría ser reducido también por otros compuestos posiblemente presentes en los extractos que podrían generar sobreestimación. Compuestos como terpenoides, ácido ascórbico, carotenoides, ácidos grasos polinsaturados (PUFAs), taninos, azúcares, oligoelementos, aminoácidos, son efectivos antioxidantes y podrían influir en la actividad antioxidante (Abu-Serie, Habashy, & Attia, 2018; Safafar et al., 2015).

3.4.3. Actividad antioxidante en *Chlorella* sp. con el ensayo del blanqueamiento del β -caroteno

Este ensayo permitió comparar los extractos lipofílicos de *Chlorella* sp. (Tabla 5) expresados como % AA, ORR y AAC. Los coeficientes de determinación (R^2) de las curvas de calibración del BHT fueron 0.91 a $t=0$ min y 0.89 a $t=60$ min. Los resultados del % AA y ORR revelaron que existe diferencia estadísticamente significativa entre la concentración alta y baja (*t-test*, $p<0.0001$) independiente del solvente. Los resultados del AAC mostraron que no hay diferencia significativa a baja concentración, pero a alta concentración si la hay (*t-test*, $p<0.0108$), siendo mejor DCM a altas concentraciones en función del AAC, y a ambas concentraciones en función del % AA y ORR. A alta concentración el DCM mostró el % de inhibición oxidativa (63.9%) y el AAC (950.3) más altos que el hexano, y una ORR (0.36) más baja que el hexano. A baja concentración el DCM mostró una actividad (31.8%) mayor que el hexano, una ORR (0.68) y un AAC (213) más bajos que el hexano. El BHT usado mostró una actividad superior a la de los extractos. En función del AAC, es posible clasificar a los extractos como extractos más activos a aquellos con valores por encima de 400, y como menos activos, aquellos con valores por debajo de 400 (Mallet et al. 1994). De acuerdo con ello, ambos extractos se consideran activos, pero DCM tuvo la mayor actividad antioxidante. Es importante reconocer que el hexano (no polar), es más previsible en extraer carotenos, y el DCM (polaridad media) en extraer luteína, ambos carotenoides intracelulares, como lo reflejó el análisis de HPLC.

Existen pocos reportes donde evalúan la actividad antioxidante a través del ensayo de inhibición oxidativa de emulsiones de β -caroteno con ácido linoleico. En el trabajo de Rodríguez & Guil (2008), se evaluó el extracto etanólico de *C. vulgaris* con este ensayo y se reportó un AAC (~ 25000), más alto que el valor obtenido para los antioxidantes BHA y BHT, atribuyendo su actividad antioxidante a PUFAs. Se debe considerar que en presencia de carotenoides no solo hay disminución de la concentración de radicales libres, sino que también hay reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} (Rodríguez & Guil, 2008). La presencia de diferentes antioxidantes puede dificultar el grado de blanqueo del β -caroteno al neutralizar radicales libres de linoleato (Jayaprakasha, Singh, & Sakariah, 2001).

Tabla 5. Capacidad antioxidante por DPPH, poder reductor y blanqueamiento del β -caroteno de extractos hidrofílicos y lipofílicos de *Chlorella* sp. y de los estándares

Extracto	DPPH ^g		Poder reductor ^g	Blanqueamiento de β -caroteno ^g		
	% RSA	AAEAC	AAEAC	% AA	ORR	AAC
EtOH:H ₂ O (95:5) *	39.02 ± 2.55 ^a	24.42 ± 2.9	52.90 ± 1.03			
	79.61 ± 3.18 ^b					
EtOH:H ₂ O (50:50)	21.25 ± 2.85 ^a	16.59 ± 3.13	18.84 ± 2.03			
	65.32 ± 10.63 ^b					
DCM *	35.53 ± 3.04 ^a	29.08 ± 2.37		31.76 ± 6.66 ^c	0.68 ± 0.07 ^c	213.04 ± 53.18 ^c
	82.90 ± 5.01 ^b			63.91 ± 3.68 ^d	0.36 ± 0.04 ^d	950.25 ± 64.16 ^d
Hexano	13.29 ± 2.73 ^a	15.15 ± 4.99		17.12 ± 4.07 ^c	0.83 ± 0.04 ^c	254.06 ± 91.76 ^c
	61.67 ± 2.54 ^b			37.03 ± 3.86 ^d	0.63 ± 0.04 ^d	745.00 ± 203.57 ^d
Estándar	IC ₅₀ (µg/ml)	AAEAC	AAEAC	% AA	ORR	AAC
Ácido ascórbico	3.52 ^e	1155.19 ± 194.93	1009.85 ± 93.18			
BHT				71.26 ± 1.66 ^f	0.29 ± 0.02 ^f	439.65 ± 11.21 ^f
				75.76 ± 0.05	0.24 ± 0.00	505.92 ± 12.90
				82.19 ± 1.82	0.18 ± 0.02	614.77 ± 18.24
				89.47 ± 0.64	0.11 ± 0.01	747.19 ± 19.58
				93.52 ± 0.71	0.06 ± 0.01	859.54 ± 3.56

^a Ensayo probado a concentración de 0.10 mg/ml

^b Ensayo probado a concentración de 0.25 mg/ml

^c Ensayo probado a concentración de 1 mg/ml

^d Ensayo probado a concentración de 2 mg/ml

^e Ensayo probado a siete concentraciones equidistantes (1 a 8 µg/ml) para la determinación de IC₅₀

^f Ensayos probados a cinco concentraciones equidistantes (6.25 a 100 µg/ml)

^g Media ± SD de tres mediciones

* Para cada prueba el asterisco representa valores significativamente diferentes de los valores de los extractos EtOH:H₂O 50:50 y hexano ($p < 0.05$)

3.4.4. Comparación de actividad antioxidante entre solventes de extracción

El perfil antioxidante de un extracto varía con la solubilidad y polaridad de los compuestos, con el método de extracción y con el método de evaluación de su capacidad antioxidante. En el trabajo de Choochote et al. (2014) se reportó la actividad de extractos en agua caliente y en etanol de *Chlorococcum* sp. y *Chlorella* sp., demostrando para ambas cepas que el etanol tuvo el mejor porcentaje de captura de DPPH. Otro estudio evaluó hexano, acetato de etilo y agua caliente de *C. vulgaris*, revelando que el extracto acuoso mostró mayor poder reductor y mayor porcentaje de captura de DPPH (Hajimahmoodi et al., 2010). En el trabajo de Abu-Serie et al. (2018) se demostró para la misma microalga, que el extracto etanólico tuvo un potente efecto de barrido de radicales óxido nítrico y de anión superóxido, y fuerte efecto reductor de hierro, pero débil capacidad para DPPH e hidroxilo. En Safafar et al. (2015) se evaluó la extracción de carotenoides y compuestos fenólicos de *C. sorokiniana* con metanol, acetona, etil acetato y etanol, y se reportó que el metanol tuvo la más alta actividad, seguido del etanol. En el trabajo de Saranya et al. (2014) en *C. salina*, se evaluó metanol, acetona y hexano, y se demostró que el extracto metanólico tuvo la más alta actividad antioxidante, mientras que el extracto hexánico la más baja actividad para DPPH y poder reductor. En el trabajo de Hemalatha et al. (2013) se evaluó extractos de *C. marina* con metanol, acetona y hexano, revelándose la máxima actividad en el metanol. En el trabajo de Maadane et al. (2015) se evaluó etanol, etanol/agua y agua, y el extracto etanólico de varias microalgas exhibió la más alta actividad con DPPH. En extractos de diclorometano, hexano, cloroformo y metanol de *Nannochloropsis* sp., se ha reportado que el diclorometano usado para extraer carotenoides y tocoferoles, mostró la mayor capacidad de inhibición de DPPH y la mayor reducción de hierro con FRAP, seguido del metanol que tuvo el poder más alto de inhibición de superóxidos (Goh et al., 2010). Los hallazgos del presente estudio están acordes a los reportados, donde se señala que *Chlorella* tiene importante actividad antioxidante. Hay que destacar que en los estudios citados se usaron distintas cantidades de microalga liofilizada, desde 0.02 g hasta 10 g, distintos volúmenes de solventes para las extracciones y distintas concentraciones para la medición de la actividad antioxidante.

3.5. Perfil químico de antioxidantes de los extractos microalgales por HPLC

3.5.1. Carotenoides y polifenoles en *Chlorella* sp.

Se desconoce aún si los compuestos fenólicos son importantes en microalgas ya que existen menos estudios que publican sobre composición fenólica (Saranya, et al., 2014). Algunos indican un contenido bajo o igual al reportado en plantas (Abd El-Baky, El Baz, & El-Baroty, 2009). Otros muestran una amplia gama de flavonoides compatibles con los de plantas (Goiris et al., 2014). El perfil químico de *Chlorella* sp. se presenta en la Tabla 6. Para el análisis de polifenoles en extractos polares se valoró 9 estándares. El perfil cromatográfico reveló solo un compuesto en una de las tres réplicas de cada extracto hidroetanólico, que corresponde a la flavona luteolina (a 254 nm), un compuesto de polaridad media. El extracto EtOH:H₂O 95:5 mostró un contenido (0.62 µg/g) superior al obtenido con EtOH:H₂O 50:50 (0.25 µg/g). El perfil de polifenoles ha sido descrito en varias especies de *Chlorella*. En el estudio de Abu-Serie et al. (2018) se detectó solo ácido 2,5 dihidroxibenzoico (360 µg/g) y GA (160 µg/g) de varios ácidos fenólicos y flavonoides analizados en el extracto etanólico de *C. vulgaris*. En el trabajo de Safafar et al. (2015) se evaluó ácidos fenólicos en *C. sorokiniana*, destacando ácido cafeico (3.8 µg/g) y ferúlico (2.8 µg/g). Goiris et al. (2014) detectaron en *C. vulgaris* floroglucinol (74 µg/g), ácido *p*-coumárico (0.54 µg/g), ácido ferúlico (0.63 ng/g) y apigenina (9.9 ng/g).

Tabla 6. Cuantificación de carotenoides detectados por RP-HPLC-DAD en los extractos microalgales

N° Pico	Tiempo de retención (min)	λ max (nm)	Carotenoide	Extracto	<i>Chlorella sp.</i>
					Concentración (mg/g)
1	6.33	410	Fucoxantina	DCM	n.d. ^d
				Hexano	n.d.
2	11.86	450	Luteína	DCM	11.19 ± 0.96 ^a
				Hexano	4.64 ± 1.14 ^a
3	17.99	450	β -criptoxantina	DCM	n.d.
				Hexano	n.d.
4	20.45	450	α -caroteno	DCM	0.20 ± 0.02 ^a
				Hexano	0.31 ^c
5	22.80	450	β -caroteno	DCM	0.86 ± 0.20 ^a
				Hexano	1.08 ± 0.24 ^b
6	12.45	450	X	DCM	n.i. ^e
				Hexano	n.i.
7	13.68	450	Y	DCM	n.i.
				Hexano	n.d.

^a Media ± SD de tres mediciones

^b Media ± SD de dos mediciones

^c Una sola medición

^d n.d. = no detectado

^e n.i. = no identificado

Se evaluaron cinco carotenoides. Luteína, α - y β -caroteno fueron identificados en ambos extractos apolares. En DCM el más abundante fue luteína (11.19 mg/g) y el más escaso α -caroteno (0.20 mg/g). De igual manera en hexano, luteína fue el más abundante (4.64 mg/g) y α -caroteno el más escaso (0.31 mg/g). Cabe destacar que el hexano a pesar de su bajo rendimiento de extracción y escasa actividad antioxidante, resultó ser más efectivo en extraer α - y β -caroteno que el DCM, lo que explica la naturaleza no polar de esos compuestos. También se reportan dos picos no identificados a 450 nm en ambos extractos que podrían tratarse tentativamente de clorofilas, por sus espectros de absorción y tiempos de retención similares a los publicados en el estudio de Plaza et al. (2012). El orden en el que eluyen los carotenoides de la columna se relaciona directamente con el número de oxígenos presentes, así que las xantofilas eluyen primero (Armenta et al., 2006). Los hallazgos del presente estudio son similares a los reportados por Cha et al. (2010) y Safafar et al. (2015) donde luteína y β -caroteno resaltan en *C. vulgaris* y *C. sorokiniana*. En *C. vulgaris* se reportó 3.83 mg/g y 0.10 mg/g de luteína y β -caroteno, respectivamente, y en *C. sorokiniana* 3.22 mg/g y 1.04 mg/g de los mismos compuestos. Koo et al. (2012) resaltó en *C. ellipsoidea* zeaxantina con ultrasonificación (0.60 mg/g) y en mayor concentración con líquidos presurizados (4.26 mg/g). Plaza et al. (2012) encontró en *C. vulgaris* importantes carotenoides con UAE con diferentes solventes, destacándose luteína y β -caroteno en etanol (9.2 y 28.8 mg/g, respectivamente), y en mayor concentración, luteína y β -caroteno en hexano (17.7 y 237.9 mg/g, respectivamente). En el estudio de Cha et al. (2008) se determinó que el principal carotenoide en *C. ellipsoidea* fue violaxantina y en *C. vulgaris* fue luteína, lo que refleja la variabilidad de la composición entre especies. Es importante enfatizar que los carotenoides también pueden detectarse en extractos de etanol/agua porque pueden ser polares (xantofilas) y apolares (carotenos), y lo mismo ocurre con los compuestos fenólicos (Goiris et al., 2012). Los antioxidantes microalgales tienen una variedad de polaridades, siendo la mayoría no polares (Assunção et al., 2017). Los hallazgos del presente estudio evidencian contenidos más altos de luteína y carotenos en algunos casos que los reportados. Los compuestos predominantemente extraídos de *Chlorella sp.* fueron de polaridad media-baja, por la alta concentración de carotenoides y la escasa concentración del único compuesto fenólico. Los carotenoides encontrados aportarían a la actividad antioxidante de los extractos apolares, sin descartar la presencia de más compuestos en ambos extractos.



3.5.2. Carotenoides y polifenoles en *N. oculata*

El perfil químico de *N. oculata* no reflejó ninguno de los polifenoles estudiados en EtOH:H₂O 95:5, solvente que confirió mejor capacidad antioxidante en *Chlorella*. Algunos estudios han identificado antioxidantes en especies de *Nannochloropsis*, como el trabajo de Safafar et al. (2015), donde destaca ácido ferúlico y GA en *N. limnetica*, y ácido ferúlico y ácido 3,4 dihidroxibenzoico en *N. salina*. En el análisis de carotenoides, el perfil del DCM reveló únicamente una xantofila, fucoxantina (0.45 mg/g), resultado de una sola medición a 410 nm, compuesto que no estuvo presente en *Chlorella* sp. Además se evidenció el mismo compuesto no identificado a 450 nm que se halló en *Chlorella* sp., por lo que podría tratarse de clorofilas por su absorbancia y tiempo de retención similar al estudio de Plaza et al. (2012). Varios trabajos han reportado carotenoides en *Nannochloropsis*, como el estudio de Safafar et al. (2015), donde destaca β-caroteno y violaxantina en *N. salina*; violaxantina, neoxantina y también fucoxantina (0.18 mg/g) en *N. limnetica*. Para este último compuesto, es importante mencionar que el presente estudio mostró un contenido mayor en *N. oculata*. En el trabajo de El-Sheekh et al. (2016), se registró en *N. oculata* un contenido de β-caroteno de 0.11 mg/g y 0.14 mg/g en medio f/2 normal y f/2 optimizado, respectivamente. En Lubián et al. (2000) se reportó como principales carotenoides de *N. oculata*, violaxantina y vaucheraxantina. En el trabajo de Liau et al. (2010) se reportó en *N. oculata*, β-criptoxantina (0.06 mg/g), α-caroteno (2.95 mg/g), β-caroteno (0.15 mg/g), luteína (1.09 mg/g) y principalmente zeaxantina (19.30 mg/g). Por otra lado, en la diatomea *Phaeodactylum tricorutum*, la fucoxantina pudo ser extraída más fácilmente con etanol proporcionando un rendimiento más alto (Dewapriya & Kim, 2014), lo que concuerda con la polaridad relativamente alta de esta xantofila por contener múltiples oxígenos. Hubiese sido significativo en este estudio, evaluar fucoxantina en el extracto etanólico, pero sólo se analizó el extracto de DCM por ser el mejor extractante apolar.

3.5.3. Potencial nutricional de los antioxidantes encontrados

Se demostró que los carotenoides fueron los compuestos más destacados en estas microalgas, particularmente en *Chlorella*. En efecto, las algas clorofíceas contienen los mismos carotenoides primarios que las plantas superiores (Batista et al., 2013). En este estudio, la luteína fue la más relevante de la composición de pigmentos en *Chlorella*, comparable a lo reportado en otras microalgas y cianobacterias como *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Diacronema vlkianum*, *Isochrysis galbana* y *Spirulina máxima*, consideradas reconocidas y seguras por la Food and Drug Administration (FDA) (Batista et al., 2013; Cezare et al., 2019). En la revisión de Cezare et al. (2019), la luteína se destaca en alimentos como col, espinaca, brócoli, aguacate, kiwi, maíz amarillo, yema de huevo cocinada, con un contenido que fluctúa entre 2.93 µg/g en aguacate hasta 0.78 mg/g de peso en espinaca. Como se observa en el presente estudio, el alto contenido de luteína (11.19 mg/g) en *Chlorella*, la convierte en una potencial fuente nutricional, incluso por encima de las flores de caléndula (0.3 mg/g), que hasta el momento es la única fuente industrial de luteína (Cezare et al., 2019).

4. Conclusiones y recomendaciones

En este estudio se evaluó el potencial antioxidante de diferentes solventes extractantes en *Chlorella* sp. comparando la actividad antioxidante mediante tres ensayos, y se relacionó los resultados de su actividad con el perfil de carotenoides y polifenoles en *Chlorella* y *N. oculata*. De los solventes probados, EtOH:H₂O 95:5 y DCM proporcionaron la mayor capacidad antioxidante en todas las pruebas. EtOH:H₂O 95:5 fue el mejor solvente polar en la prueba de poder reductor y DCM fue el mejor solvente apolar en la prueba de blanqueamiento del β-caroteno. Ambos solventes fueron también los mejores en la prueba de DPPH, lo que supone

que sus compuestos extraídos tienen mecanismos de acción basados en transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrógeno.

El trabajo se enfocó en compuestos fenólicos y carotenoides, señalados como principales antioxidantes. *Chlorella* sp. produjo importantes concentraciones de carotenoides como luteína (en DCM), α - y β -caroteno (en hexano) y un compuesto fenólico luteolina (en EtOH:H₂O 95:5). En cambio, *N. oculata* produjo una importante concentración de fucoxantina (en DCM). La diferente respuesta entre *Chlorella* y *N. oculata* refleja la composición particular de cada microalga. Se observó que en el caso de polifenoles, no hubo un perfil importante de estos compuestos en el extracto polar en ambas microalgas, salvo luteolina. En el caso de carotenoides, efectivamente hubo una cantidad importante de estos compuestos en *Chlorella*, que demostraría la alta actividad antioxidante. La actividad antioxidante podría deberse también a la presencia de otros compuestos con similares mecanismos de acción, como aminoácidos, PUFAs, polisacáridos, tocoferoles, incluidos también otros carotenoides y polifenoles que no estuvieron contemplados en el estudio, debido a la escasa disponibilidad de estándares, que pudo haber limitado la búsqueda de compuestos y que podrían aportar a la actividad. Los carotenoides encontrados explicarían la actividad antioxidante del extracto apolar determinada por el ensayo de blanqueamiento del β -caroteno y de DPPH en *Chlorella*, ya que se conoce que estos compuestos poseen múltiples mecanismos antioxidantes, como quelar oxígeno, eliminar radicales mediante transferencia de átomos de hidrógeno o aceptando electrones de radicales, lo que podría dejar en evidencia la habilidad individual de estos compuestos, como la luteína que pudo haberse involucrado en cualquiera de las reacciones antioxidantes. Es indispensable en futuros estudios realizar pruebas antioxidantes y caracterización química en todos los tipos de extractos, para contrastar el potencial antioxidante y su contenido.

Complementando el estudio, en la evaluación del cultivo se percibió que el empleo de un cultivo optimizado generó posiblemente grandes concentraciones de antioxidantes que podrían escalarse. La evaluación molecular en la identidad de las microalgas fue discutida también, y se mostraron similitudes para *Chlorella* spp., pero no para *Nannochloropsis*. El barcoding realizado permitió generar información genética que pueda ser aportada al GenBank.

Finalmente, la alta producción de carotenoides en *Chlorella* ha sido demostrada en muchos estudios, especialmente de luteína, que denota un potencial interesante en el área nutricional. El estudio propone continuar la producción de luteína a partir de cultivos optimizados a gran escala como una interesante alternativa, en competencia con las fuentes tradicionales.

Conflicto de interés

Los autores declaran no poseer conflicto de interés.

Agradecimientos

La investigación se realizó en el marco de un programa conjunto de postgrados VLIR NETWORK.

Referencias

- Abd El Baky, H., & El-Baroty, G. (2013). Healthy benefit of microalgal bioactive substances. *Journal of Aquatic Science*, 1(1), 11-23. doi:10.12691/jas-1-1-3
- Abd El-Baky, H., El Baz, F., & El-Baroty, G. (2009). Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects. *African Journal of Biotechnology*, 8(24), 7059-7067. doi:http://www.academicjournals.org/AJB
- Abu-Serie, M., Habashy, N., & Attia, W. (2018). In vitro evaluation of the synergistic antioxidant and anti-inflammatory activities of the combined extracts from Malaysian *Ganoderma lucidum* and Egyptian *Chlorella vulgaris*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(154), 1-13. doi:10.1186/s12906-018-2218-5
- 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(33). doi:10.3390/medicines5020033
- Ahmed, F., Fanning, K., Netzel, M., Turner, W., Li, Y., & Schenk, P. (2014). Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *Food Chemistry*, 165, 300-306. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.107
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152. doi:10.1016/j.jsps.2012.05.002
- Andersen, R. (Ed.). (2005). *Algal Culturing Techniques*. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report)*. *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957-998. doi:10.1351/PAC-REP-12-07-15
- Armenta, R., Burja, A., Radianingtyas, H., & Barrow, C. (2006). Critical assessment of various techniques for the extraction of carotenoids and Co-enzyme Q10 from the *Thraustochyrid* strain ONC-T18. (A. C. Society, Ed.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9752-9758. doi:10.1021/jf061260o
- Assunção, M., Amaral, R., Martins, C., Ferreira, J., Ressurreição, S., Santos, S., . . . Santos, L. (2017). Screening microalgae as potential sources of antioxidants. *Journal of Applied Phycology*, 29(2), 865-877. doi:10.1007/s10811-016-0980-7
- Batista, A., Gouveia, L., Bandarra, N., Franco, J., & Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2(2), 164-173. doi:10.1016/j.algal.2013.01.004
- Bazykina, N., Nikolaevskii, A., Filippenko, T., & Kaloerova, V. (2002). Optimization of conditions for the extraction of natural antioxidants from raw plant materials. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 36(2), 46-49. doi:10.1023/a:1016024300843
- Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Mangelings, D., & Vander Heyden, Y. (2016). Antioxidant activities of *Pistacia atlantica* extracts modeled as a function of chromatographic fingerprints in order to identify antioxidant markers. *Microchemical Journal*, 128, 208-217. doi:10.1016/j.microc.2016.04.023
- Bock, C., Krienitz, L., & Pröschold, T. (2011). Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*, 11(2), 293-312. doi:10.5507/fot.2011.028
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28(1), 25-30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- CBOL Plant Working Group. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 106(31), 12794-12797. doi:10.1073/pnas.0905845106
- Cezare-Gomez, E., Mejia-da-Silva, L., Pérez-Mora, L., Matsudo, M., Ferreira-Camargo, L., Singh, A., & de Carvalho, J. (2019). Potential of microalgae carotenoids for industrial application. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-33. doi:10.1007/s12010-018-02945-4
- Cha, K. H., Koo, S. Y., & Lee, D. U. (2008). Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10521-10526. doi:10.1021/jf802111x CCC: \$40.75
- Cha, K., Lee, H., Koo, S., Song, D., Lee, D., & Pan, C. (2010). Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 793-797. doi:10.1021/jf902628j
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., . . . Ma, X. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA Barcode for identifying medicinal plant species. *PLOS ONE*, 5(1), e8613. doi:10.1371/journal.pone.0008613

- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- Choochote, W., Suklampoo, L., & Ochaikul, D. (2014). Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 43–48. doi:10.1007/s10811-013-0084-6
- de Moraes, M., Vaz, B., de Moraes, E., & Costa, J. (2015). Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *BioMed Research International*(Article ID 835761), 1–15. doi:10.1155/2015/835761
- Dewapriya, P., & Kim, S.-K. (2014). Marine microorganisms: An emerging avenue in modern nutraceuticals. *Food Research International*, 56, 115–125. doi:10.1016/j.foodres.2013.12.022
- Doucha, J., & Lívanský, K. (2006). Productivity, CO₂/O₂ exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. *Journal of Applied Phycology*, 18(6), 811–826. doi:10.1007/s10811-006-9100-4
- El-Sheekh, M. M., Khairy, H. M., Gheda, S. F., & El-Shenody, R. A. (2016). Application of Plackett–Burman design for the high production of some valuable metabolites in marine alga *Nannochloropsis oculata*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42(1), 57–64. doi:10.1016/j.ejar.2015.10.001
- Evans, K., & Mann, D. (2009). A proposed protocol for nomenclaturally effective DNA barcoding of microalgae. *Phycologia*, 48(1), 70–74. doi:10.2216/08-70.1
- Fernández-Sevilla, J., Fernández, F., & Grima, E. (2010). Biotechnological production of lutein and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(1), 27–40. doi:10.1007/s00253-009-2420-y
- Freitas, A., Dina, R., Rocha, T., Gomes, A., & Duarte, A. (2012). Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. (S. ScienceDirect, Ed.) *Biotechnology Advances*, 30(1), 1506–1515. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.03.006
- Gacheva, G., & Gigova, L. (2014). Biological activity of microalgae can be enhanced by manipulating the cultivation temperature and irradiance. *Central European Journal of Biology*, 9(12), 1168–1181. doi:10.2478/s11535-014-0350-x
- Goh, S., Yusoff, F., & Loh, S. (2010). A comparison of the antioxidant properties and total phenolic content in a diatom, *Chaetoceros* sp. and a green microalga, *Nannochloropsis* sp. *Journal of Agricultural Science*, 2(3), 123–130. doi:10.5539/jas.v2n3p123
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. (Springer, Ed.) *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1477–1486. doi:10.1007/s10811-012-9804-6
- Goiris, K., Muylaert, K., Voorspoels, S., Noten, B., De Paepe, D., Baart, G., & De Cooman, L. (2014). Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *Journal of Phycological Society of America*, 50(3), 483–492. doi: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. doi:10.1016/j.algal.2014.12.002
- Gouveia, L., & Oliveira, A. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(2), 269–274. doi:10.1007/s10295-008-0495-6
- Grimi, N., Dubois, A., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2014). Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis* sp. using different methods of cell disruption. *Bioresource Technology*, 153, 254–256. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.011
- Gris, B., Morosinotto, T., Giacometti, G., Bertucco, A., & Sforza, E. (2014). Cultivation of *Scenedesmus obliquus* in photobioreactors: Effects of light intensities and light–dark cycles on growth, productivity, and biochemical composition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), 377–2389. doi:10.1007/s12010-013-0679-z
- Guedes, A., Amaro, H., & Souza, I. (2014). Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources. En A. Guedes, A. H., I. Souza, F. Malcata, B. Hernández, & M. Herrero (Edits.), *Bioactive Carotenoids from Microalgae* (I ed.). John Wiley & Sons. doi:10.1002/9781118412893.ch7
- Guedes, A., Gião, M., Seabra, R., Ferreira, A., Tamagnini, P., Moradas-Ferreira, P., & Malcata, F. (2013). Evaluation of the antioxidant activity of cell extracts from microalgae. *Marine Drugs*, 11(4), 1256–1270. doi:10.3390/md11041256
- Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M., & Nafissi-Varcheh, N. (2010). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 22(1), 43–50. doi:10.1007/s10811-009-9424-y
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S., & deWaard, J. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, 313–321. doi:10.1098/rspb.2002.2218
- Hemalatha, A., Giriya, K., Parthiban, C., Saranya, C., & Anantharaman, P. (2013). Antioxidant properties and total phenolic content of a marine diatom, *Navicula clavata* and green microalgae, *Chlorella marina* and *Dunaliella salina*. *Advances in Applied Science Research*, 4(5), 151–157.

- Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2006). Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry*, *98*(1), 136-148. doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.058
- Hollingsworth, P., Graham, S., & Little, D. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PloS one*, *6*(5), e19254. doi:10.1371/journal.pone.0019254
- Hu, Q., Pan, B., Xu, J., Sheng, J., & Shi, Y. (2007). Effects of supercritical carbon dioxide extraction conditions on yields and antioxidant activity of *Chlorella pyrenoidosa* extracts. *Journal of Food Engineering*, *80*(4), 997-1001. doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.06.026
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 1841-1856. doi:10.1021/jf030723c
- Janczyk, P. (2006). *Evaluation of nutritional value and activity of green microalgae Chlorella vulgaris in rats and mice*. Doctoral dissertation, Freie Universität Berlin, Berlin.
- Jayaprakasha, G., Singh, R., & Sakariah, K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinefera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food chemistry*, *73*(3), 285-290. doi:10.1016/S0308-8146(00)00298-3
- Jayshree, A., Jayashree, S., & Thangaraju, N. (2016). *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*: effective antioxidant, antibacterial and anticancer mediators. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *78*(5), 575-581. doi: 10.4172/pharmaceutical-sciences.1000155
- Kazi, M. A., Reddy, C. R., & Jha, B. (2013). Molecular phylogeny and barcoding of *Caulerpa* (Bryopsidales) based on the tufA, rbcL, 18S rDNA and ITS rDNA genes. *Public Library of Science (PLOS ONE)*, *8*(12), e82438. doi:10.1371/journal.pone.0082438
- Klein, B., Walter, C., Lange, H., & Buchholz, R. (2012). Microalgae as natural sources for antioxidative compounds. *Journal of Applied Phycology*, *24*(5), 1133-1139. doi:10.1007/s10811-011-9743-7
- Koo, S., Cha, K., Song, D., Chung, D., & Pan, C. (2012). Optimization of pressurized liquid extraction of zeaxanthin from *Chlorella ellipsoidea*. *Journal of Applied Phycology*, *24*(4), 725-730. doi:10.1007/s10811-011-9691-2
- Kress, W., Wurdack, K., Zimmer, E., Weigt, L., & Janzen, D. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, *102*(23), 8369-8374. doi:10.1073/pnas.0503123102
- Krzemińska, I., Piasecka, A., Nosalewicz, A., Simionato, D., & Wawrzykowski, J. (2015). Alterations of the lipid content and fatty acid profile of *Chlorella protothecoides* under different light intensities. *Bioresource Technology*, *196*, 72-77. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.043
- Leliaert, F., Smith, D., Moreau, H., Herron, M., Verbruggen, H., Delwiche, C., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *31*(1), 1-46. doi:10.1080/07352689.2011.615705
- Leliaert, F., Verbruggen, H., Vanormelingen, P., Steen, F., López-Bautista, J., Zuccarello, G., & De Clerck, O. (2014). DNA-based species delimitation in algae. *European Journal of Phycology*, *49*(2), 179-196. doi:10.1080/09670262.2014.904524
- Lemieux, C., Otis, C., & Turmel, M. (2000). Ancestral chloroplast genome in *Mesostigma viride* reveals an early branch of green plant evolution. *Nature*, *403*(6770), 649-652. doi:10.1038/35001059
- Leong, L., & Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, *76*(1), 69-75. doi:10.1016/S0308-8146(01)00251-5
- Li, H., Cheng, K., Wong, C., Fan, K., Chen, F., & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, *102*(3), 771-776. doi:10.1016/j.foodchem.2006.06.022
- Liau, B., Shen, C., Liang, F., Hong, S., Hsu, S., Jong, T., & Chang, C. (2010). Supercritical fluids extraction and anti-solvent purification of carotenoids from microalgae and associated bioactivity. *The Journal of Supercritical Fluids*, *55*(1), 169-175. doi:10.1016/j.supflu.2010.07.002
- Lin, J.-H., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2015). Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. *Bioresource Technology*, *184*, 421-428. doi:10.1016/j.biortech.2014.09.099
- Liu, J., & Chen, F. (2014). Biology and industrial applications of *Chlorella*: Advances and Prospects. *Microalgae Biotechnology*, *153*, 1-35. doi:10.1007/10_2014_286
- Lubián, L., Montero, O., Moreno-Garrido, I., Huertas, E., Sobrino, C., González, M., & Parés, G. (2000). *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology*, *12*(3-5), 249-255. doi:10.1023/a:1008170915932
- Lucero, D., & Siavichay, L. (2016). *Análisis de la influencia de diferentes fotoperíodos y concentración de nutrientes sobre la síntesis de polifenoles y carotenoides en especies cultivadas de Chlorella y Nannochloropsis*. Tesis de pregrado, Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, Cuenca.
- 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. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.400

- Madden, T. (2013). The BLAST Sequence Analysis Tool. En *The NCBI Handbook [Internet]* (2nd. ed.). Bethesda (MD), USA: National Center for Biotechnology Information.
- Mallet, J., Cerrati, C., Ucciani, E., Gamisans, J., & Gruber, M. (1994). Antioxidant activity of plant leaves in relation to their alpha-tocopherol content. *Food Chemistry*, 49(1), 61-65. doi:10.1016/0308-8146(94)90233-x
- Mann, D., Sato, S., Trobajo, R., Vanormelingen, P., & Souffreau, C. (2010). DNA barcoding for species identification and discovery in diatoms. *Cryptogamie, Algologie*, 31(4), 557-577.
- Marinova, E., Yanishlieva, N., & Kostova, I. (1994). Antioxidative action of the ethanolic extract and some hydroxycoumarins of *Fraxinus ornus* bark. *Food Chemistry*, 51(2), 125-132. doi:10.1016/0308-8146(94)90245-3
- Masojídek, J., Kopecký, J., & Giannelli, L. (2011). Productivity correlated to photobiochemical performance of *Chlorella* mass cultures grown outdoors in thin-layer cascades. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(2), 307-317. doi:10.1007/s10295-010-0774-x
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036-1043. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.127
- Mohammadi, F., Arabian, D., & Khalilzadeh, D. (2016). Investigation of effective parameters on biomass and lipid productivity of *Chlorella vulgaris*. *Periodicum Biologorum*, 118(2), 123-129. doi:10.18054/pb.2016.118.2.3197
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- NCBI (US), Bethesda (MD). (2014). *The NCBI Handbook* (2nd edition ed.).
- Parniakov, O., Barba, F., Grimi, N., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2015a). Pulsed electric field and pH assisted selective extraction of intracellular components from microalgae *Nannochloropsis*. *Algal Research*, 8, 128-134. doi:10.1016/j.algal.2015.01.014
- Parniakov, O., Barba, F., Grimi, N., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2015b). Pulsed electric field assisted extraction of nutritionally valuable compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. using the binary mixture of organic solvents and water. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27(1), 79-85. doi:10.1016/j.ifset.2014.11.002
- Pawlowski, J., Audic, S., Adl, S., Bass, D., Belbahri, L., & et al. (2012). CBOL Protist Working Group: Barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. *Public Library of Science (PLOS Biology)*, 10(11), e1001419. doi:10.1371/journal.pbio.1001419
- Plaza, M., Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2009). Innovative natural functional ingredients from microalgae. (A. C. Society, Ed.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7159-7170. doi:10.1021/jf901070g
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Avalo, B., Cifuentes, A., Reglero, G., . . . Ibáñez, E. (2012). Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *LWT-Food Science and Technology*, 46(1), 245-253. doi:10.1016/j.lwt.2011.09.024
- Posten, C., & Chen, S. F. (Edits.). (2016). *Microalgae Biotechnology* (Vol. 153). Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-23808-1
- Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302. doi:10.1021/jf0502698
- Querci, M., Jermini, M., & Van den Eede, G. (2006). *The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms*. (E. Commission, Ed.) Joint Research Centre.
- Reboloso, M., Navarro, A., García, F., Ramos, J., & Guil, J. (2001). Biomass Nutrient Profiles of the Microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2966-2972. doi:10.1021/jf0010376
- Rocha, J., García, J., & Henriques, M. (2003). Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering*, 20(4), 237-242. doi:10.1016/S1389-0344(03)00061-3
- Rodríguez-García, I., & Guil-Guerrero, J. (2008). Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chemistry*, 108(3), 1023-1026. doi:10.1016/j.foodchem.2007.11.059
- Safar, H., van Wageningen, J., 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*, 13(12), 7339-7356. doi:10.3390/md13127069
- Saikhan, M., Howard, L., & Miller, J. (1995). Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum*, L.). *Journal of Food Science*, 60(2), 341-343.
- Samarakoon, K., & Jeon, Y.-J. (2012). Bio-functionalities of proteins derived from marine algae - A review. *Food Research International*, 48(1), 948-960. doi:10.1016/j.foodres.2012.03.013

- Sánchez, A., Montero, L., Stiger, V., Tanniou, A., Cifuentes, A., Herrero, M., & Ibáñez, E. (2016). Considerations on the use of enzyme-assisted extraction in combination with pressurized liquids to recover bioactive compounds from algae. *Food Chemistry*, *192*, 67-74. doi:10.1016/j.foodchem.2015.06.098
- 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. doi:http://www.ijcmas.com
- Sarker, S., Latif, Z., & Gray, A. (2006). *Natural Products Isolation* (Second Edition ed.). Totowa, New Jersey, USA: Humana Press Inc.
- Saunders, G. W. (2005). Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, *360*(1462), 1879–1888. doi:10.1098/rstb.2005.1719
- Saunders, G., & Le Gall, L. (2010). *Cryptogamie, Algologie* (Vol. 31). Canadá-Francia.
- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, A., . . . Consortium, F. B. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, *109*(16), 6241-6246. doi:10.1073/pnas.1117018109
- Sen Roy, S., & Pal, R. (2014). Microalgae in Aquaculture: A review with special references to nutritional value and fish dietetics. *Proceedings of the Zoological Society*, *68*(1). doi:10.1007/s12595-013-0089-9
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015a). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects: A review. *Journal of Functional Foods*, *18*, 820-897. doi:10.1016/j.jff.2015.06.018
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015b). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, *18*, 757-781. doi:10.1016/j.jff.2015.01.047
- Simionato, D., Sforza, E., Carpinelli, E., Bertucco, A., Giacometti, G., & Morosinotto, T. (2011). Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: Effects on lipids accumulation. *Bioresource Technology*, *102*(10), 6026–6032. doi:10.1016/j.biortech.2011.02.100
- Singh, D., Barrow, C., Mathur, A., Tuli, D., & Puri, M. (2015). Optimization of zeaxanthin and β -carotene extraction from *Chlorella saccharophila* isolated from New Zealand marine waters. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *4*(2), 166-173. doi:10.1016/j.bcab.2015.02.001
- Solana, M., Rizza, C., & Bertucco, A. (2014). Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *The Journal of Supercritical Fluids*, *92*(1), 311-318. doi:10.1016/j.supflu.2014.06.013
- Somma, M. (2006). Extraction and Purification of DNA. En M. Querci, M. Jermini, & G. Van den Eede (Edits.), *Training course on the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms (Session 4)*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- van den Hoek, C., Mann, D., & Jahns, H. (1995). *Algae. An introduction to phycology*. New York: Cambridge University Press.
- Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(10), 4113-4117. doi:10.1021/jf9801973
- Wahidin, S., Idris, A., & Shaleh, S. (2013). The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, *129*, 7-11. doi:10.1016/j.biortech.2012.11.032
- Wang, H. M., Pan, J. L., Chen, C. Y., Chiu, C. C., Yang, M. H., Chang, H. W., & Chang, J. S. (2010). Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. *Process Biochemistry*, *45*(12), 1865-1872. doi:10.1016/j.procbio.2010.05.023
- Wang, T., Jónsdóttir, R., & Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, *116*(1), 240–248. doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.041
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En *PCR Protocols: a guide to methods and amplifications* (págs. 315-322). New York: Academic.
- Zakaria, S., Kamal, S., Harun, M., Omar, R., & Siajam, S. (2017). Extraction of antioxidants from *Chlorella* sp. using subcritical water treatment. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, *206*(1), 012035. doi:10.1088/1757-899X/206/1/012035
- Zou, S., Fei, C., Song, J., Bao, Y., He, M., & Wang, C. (2016). Combining and comparing coalescent, distance and character-based approaches for barcoding microalgae: A test with *Chlorella*-like species (Chlorophyta). *PLOS ONE*, *11*(4), e0153833. doi:10.1371/journal.pone.0153833.

Anexo 1. Medios de cultivo de microalgas

A. Medio Wright's Cryptophyte (WC)

(Guillard and Lorenzen 1972)

Tabla 1. Fórmula de medio WC

Component	Stock Solution (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Quantity Used <i>Work solutions</i>	Concentration in Final Medium (M)
<i>Buffer (use one, not both)</i>			
Glycylglycine	—	500 mg	3.78×10^{-3}
Tris	—	500 mg	4.13×10^{-3}
NaNO ₃	85.01	1 mL	1.00×10^{-3}
CaCl ₂ · 2H ₂ O	36.76	1 mL	2.50×10^{-4}
MgSO ₄ · 7H ₂ O	36.97	1 mL	1.50×10^{-4}
NaHCO ₃	12.60	1 mL	1.50×10^{-4}
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	28.42	1 mL	1.00×10^{-4}
K ₂ HPO ₄	8.71	1 mL	5.00×10^{-5}
Trace metals solution	(See following recipe)	1 mL	—
Vitamins solution	(See following recipe)	1 mL	—

Tabla 2. Soluciones de metales

Component	I° Stock Solution (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Quantity Used <i>(Mother solution)</i>	Concentration in Final Medium (M)
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	—	4.36 g	1.17×10^{-5}
FeCl ₃ · 6H ₂ O	—	3.15 g	1.17×10^{-5}
CuSO ₄ · 5H ₂ O	10.0	1 mL	4.01×10^{-8}
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22.0	1 mL	7.65×10^{-8}
CoCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	1 mL	4.20×10^{-8}
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180.0	1 mL	9.10×10^{-7}
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	6.0	1 mL	2.48×10^{-8}
H ₃ BO ₃	—	1.00 g	1.62×10^{-5}

Tabla 3. Soluciones de vitaminas

Component	I° Stock Solution (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Quantity Used <i>(Mother solution)</i>	Concentration in Final Medium (M)
Thiamine · HCl (vitamin B ₁)	—	100 mg	2.96×10^{-7}
Biotin (vitamin H)	0.5	1 mL	2.05×10^{-9}
Cyanocobalamin (vitamin B ₁₂)	0.5	1 mL	3.69×10^{-10}

**B. Medio f/2**

(Guillard and Ryther 1962, Guillard 1975)

Tabla 4. Fórmula de medio f/2

Component	Stock Solution (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Quantity Used	Concentration in Final Medium (M)
NaNO ₃	75	1 mL	8.82 × 10 ⁻⁴
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5	1 mL	3.62 × 10 ⁻⁵
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	30	1 mL	1.06 × 10 ⁻⁴
Trace metals solution	(See following recipe)	1 mL	—
Vitamins solution	(See following recipe)	0.5 mL	—

Tabla 5. Solución de trazas de metales f/2

Component	1° Stock Solution (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Quantity Used	Concentration in Final Medium (M)
FeCl ₃ · 6H ₂ O	—	3.15 g	1.17 × 10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	—	4.36 g	1.17 × 10 ⁻⁵
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180.0	1 mL	9.10 × 10 ⁻⁷
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22.0	1 mL	7.65 × 10 ⁻⁸
CoCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	1 mL	4.20 × 10 ⁻⁸
CuSO ₄ · 5H ₂ O	9.8	1 mL	3.93 × 10 ⁻⁸
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	6.3	1 mL	2.60 × 10 ⁻⁸

Tabla 6. Solución de vitaminas f/2

Component	1° Stock Solution (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Quantity Used	Concentration in Final Medium (M)
Thiamine · HCl (vitamin B ₁)	—	200 mg	2.96 × 10 ⁻⁷
Biotin (vitamin H)	1.0	1 mL	2.05 × 10 ⁻⁹
Cyanocobalamin (vitamin B ₁₂)	1.0	1 mL	3.69 × 10 ⁻¹⁰

Tabla 7. Solución de agua de mar

Component	Stock Solution (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Quantity Used	Concentration in Final Medium (M)
Anhydrous Salts			
NaCl	—	24.540 g	4.20 × 10 ⁻¹
Na ₂ SO ₄	—	4.090 g	2.88 × 10 ⁻²
KCl	—	0.700 g	9.39 × 10 ⁻³
NaHCO ₃	—	0.200 g	2.38 × 10 ⁻³
KBr	—	0.100 g	8.40 × 10 ⁻⁴
H ₃ BO ₃	—	0.003 g	4.85 × 10 ⁻⁵
NaF	—	0.003 g	7.15 × 10 ⁻⁵
Hydrous Salts			
MgCl ₂ · 6H ₂ O	—	11.100 g	5.46 × 10 ⁻²
CaCl ₂ · 2H ₂ O	—	1.540 g	1.05 × 10 ⁻²
SrCl ₂ · 6H ₂ O	—	0.017 g	6.38 × 10 ⁻⁵

Anexo 2. Método del Bromuro de Cetil Trimetil Amonio (CTAB)

Buffer de extracción de ADN

Reactivos	C _i	C _f	V _i (1 ml)	V _f
CTAB	7%	2.8%	400 µl	1600 µl
NaCl	5 M	1.3 M	260 µl	1040 µl
EDTA (pH 8)	0.5 M	20 mM	40 µl	160 µl
Tris – HCl (pH 8)	1 M	100 mM	100 µl	400 mg
PVP (40000)	-	1%	10 mg	40 mg
β-mercaptoetanol	-	2%	20 µl	80 µl
dH ₂ O	-	Completar a 1 ml	170 µl	680 µl

C_i = concentración inicial; C_f = concentración final; V_i = volumen inicial; V_f = volumen final

EL ADN fue extraído en tubos eppendorf con 800 µl del buffer en cabina (Labconco, Sorbon, USA) y homogenizado intensamente. Se adicionó 15 µl de proteinasa K (20 µg/µl) y se incubó en baño María (VWR™, 89032-202, USA) a 65°C por 1 h, invirtiendo los tubos cada 10 min. Se enfrió a temperatura ambiente y se adicionó 700 µl de cloroformo-isoamil (24:1). Se centrifugó por 10 min a 14000 rpm a 4°C en centrifuga refrigerada (Eppendorf, 5810R, USA) y se utilizó 500 µl de sobrenadante. Se adicionó 6 µl ARNasa (40 µg/ml) y se incubó a 37°C por 15 min (Eppendorf, Thermomixer R, USA). Se adicionó 700 µl de cloroformo-isoamil (24:1) y se agitó por inversión. Se centrifugó por 10 min a 14000 rpm a 4°C y se usó 600 µl de sobrenadante. Se adicionó un volumen igual de isopropanol frío con inversión 5 min. Se congeló a -20°C por 30 min y se centrifugó por 20 min a 14000 rpm a 4°C eliminándose el sobrenadante. El pellet fue lavado con 200 µl de etanol 70% y centrifugado por 2 min, repitiéndose 2 veces. Las muestras fueron secadas al vacío (Eppendorf, Vacufuge plus, USA) por 10 min a 30°C y el ADN resuspendido en 50 µl de agua ultra pura.

Anexo 3. Procedimiento de PCR

Preparación del PCR para amplificación del código de barra molecular

Componentes de PCR	C _i	C _f	V _R (Amplicones)	V _R (Secuenciación)
GoTaq Green Master Mix	2 X	1 X	5 µl	25 µl
Pr F	10 µM	0.5 µM	0.5 µl	2.5 µl
Pr R	10 µM	0.5 µM	0.5 µl	2.5 µl
ADN	20 ng/µl	40 ng x R	2 µl	10 µl
dH ₂ O	-	-	2 µl	10 µl
TOTAL			10 µl	50 µl

C_i = concentración inicial; C_f = concentración final; V_R = volumen por reacción



Anexo 4. Ensayo aplicado en *Chlorella sp.*

