



**UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

“EFECTO DEL ESTRÉS CELULAR SOBRE LA  
PRODUCTIVIDAD DE LUTEÍNA EN LA MICROALGA  
CLORÓFITA MCH *Muriellopsis* sp., CULTIVADA EN  
DIFERENTES CONDICIONES DE IRRADIANCIA Y  
CONCENTRACIONES DE SALINIDAD”

TESIS DE GRADO PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA,  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD, PARA OPTAR AL GRADO  
ACADÉMICO DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS CON MENCIÓN EN  
MICROBIOLOGÍA APLICADA

Alumno: Victoria Patricia Cruz Balladares  
Profesor patrocinante: Dr. Carlos Riquelme Salamanca

ANTOFAGASTA - CHILE  
2018

**UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**INFORME DE APROBACION DE TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Jefatura del Programa de Post-Grado de la Facultad de Ciencias de la Salud, que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

**VICTORIA PATRICIA CRUZ BALLADARES**

Ha sido aprobada con nota ..... por la Comisión de Examen de Grado, como requisito para optar al Grado de Magíster en Ciencias Biomédicas, con Mención en Microbiología Aplicada, en Examen de Defensa de Tesis, rendida el 28 de marzo de 2019.

**Comisión informante de Tesis:**

Dra. Vitalia Henríquez Quezada .....

Dra. María Teresa Mata Contreras .....

Dra. Claudia Sepúlveda Vega .....

Dr. Jorge Araya Rojas .....

## **Agradecimientos**

El término de esta tesis significa cerrar un ciclo de mi vida, donde me demostré a mi misma que mis ganas de por seguir aprendiendo son infinitas.

Quiero agradecer en primer lugar a mi familia, mis padres Osvaldo y Marcela, que no dudaron un segundo en apoyarme cuando les comenté que quería seguir estudiando, a mi hermana Mariana, por ser siempre mi gran compañía. Gracias por ese apoyo incondicional, por ser mi pilar, los adoro.

A mi pareja Andrés, muchísimas gracias por tu paciencia infinita, por levantarme en los momentos de fracaso y celebrar mis logros como si fueran tuyos, gracias por eso y mucho mas, te amo.

A mi tutor Dr. Carlos Riquelme, gracias por la oportunidad y confianza para poder desarrollar este trabajo, ya que sin duda ayudó mucho a mi crecimiento profesional y por que no decirlo, personal.

Al Centro de Bioinnovación (CBIA), porque conocí grandes personas de las aprendí y seguiré aprendiendo, en todo ámbito, gracias a la Dr. Claudia Infante, por su apoyo y confianza, ya que gracias a eso no desistí como en algún momento pensé en hacerlo. Gracias a “ESE GRUPITO” que hizo mucho más agradable todos mis días de trabajo. A Paola Marticorena, ya que si algo he aprendido de microalgas es TODO gracias a ella.

## Índice

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>I</b>
<b>UNIDADES .....</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>III</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>IV</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 MICROALGAS .....	1
1.2 PIGMENTOS.....	2
1.2.1 <i>Clorofila</i> .....	2
1.2.2 <i>Ficobiliproteínas</i> .....	3
1.2.3 <i>Carotenoides</i> .....	3
1.3 APLICACIÓN DE CAROTENOIDES PRESENTES EN MICROALGAS .....	8
1.3.1 <i>Industria y Salud</i> .....	8
1.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....	9
1.4.1 <i>ROS</i> .....	10
1.4.2 <i>Estrés oxidativo</i> .....	10
1.4.3 <i>Antioxidante</i> .....	11
1.5 <i>MURIELLOPSIS SP.</i> , COMO FUENTE DE CAROTENOIDES.....	12
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1. HIPÓTESIS.....	14
2.2. OBJETIVO GENERAL .....	14
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1 CEPA MICROALGAL UTILIZADA .....	15
3.2 CULTIVO DE MICROALGAS .....	15
3.2.1 <i>Sistema de cultivo</i> .....	15
3.2.2 <i>Medio de cultivo</i> .....	16
3.2.3 <i>Tratamiento del agua para cultivo</i> .....	17

3.2.4	<i>Inoculación de microalgas</i> .....	17
3.3	SEGUIMIENTO DE LOS CULTIVOS .....	17
3.3.1	<i>Concentración celular</i> .....	17
3.3.2	<i>Concentración de biomasa</i> .....	17
3.3.3	<i>pH</i> .....	18
3.3.4	<i>Máxima Eficiencia Fotosintética (Fv/Fm) y Disipación No Fotoquímica (NPQ)</i> .....	18
3.3.5	<i>Viabilidad celular y estrés oxidativo</i> .....	19
3.4	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA .....	20
3.4.1	<i>Extracción de carotenoides</i> .....	20
3.4.2	<i>Separación de compuestos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)</i> .....	20
3.4.3	<i>Actividad antioxidante</i> .....	21
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y BIOINFOMÁTICO .....	22
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
4.1	OBSERVACIÓN DE CRECIMIENTO DE LA MICROALGA CLORÓFITA MCH <i>MURIELLOPSIS</i> SP. ....	23
4.2	SEGUIMIENTO DE LOS CULTIVOS .....	25
4.2.1	<i>Concentración celular</i> .....	25
4.2.2	<i>Concentración de biomasa</i> .....	26
4.2.3	<i>pH</i> .....	27
4.2.4	<i>Eficiencia cuántica máxima, Fv/Fm</i> .....	28
4.2.5	<i>Disipación No Fotoquímica, NPQ</i> .....	29
4.2.6	<i>Viabilidad celular y estrés oxidativo</i> .....	32
4.3	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA .....	40
4.3.1	<i>Extracción de carotenoides</i> .....	40
4.3.2	<i>Análisis por HPLC</i> .....	41
4.4	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....	43
4.4.1	<i>Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)</i> .....	43
4.4.2	<i>Ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)</i> .....	44

<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>60</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>61</b>

### **Índice de tablas**

<b>Tabla 1</b> UMA5 (f/2 Modificado) .....	<b>16</b>
<b>Tabla 2</b> Solución de metales traza .....	<b>16</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Estructura química de los carotenoides más estudiados en microalgas. .	5
<b>Figura 2</b> Ruta biosintética de los carotenoides en la mayoría de las especies de microalgas verdes.....	6
<b>Figura 3</b> Bidones de crecimiento de microalgas .....	24
<b>Figura 4</b> Cepa clorófito MCH <i>Muriellopsis</i> sp., en agua dulce (MCH-0) y agua de mar (MCH-SW). .....	25
<b>Figura 5</b> Concentración celular de MCH <i>Muriellopsis</i> sp., en los distintos días de cultivo.....	26
<b>Figura 6</b> Concentración de biomasa ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de MCH <i>Muriellopsis</i> sp.....	27
<b>Figura 7</b> Variación de pH en los distintos cultivos a lo largo de los días.. .....	28
<b>Figura 8</b> Valores de la eficiencia fotosintética de MCH <i>Muriellopsis</i> sp.....	29
<b>Figura 9</b> Análisis de Disipación no fotoquímica (NPQ) de MCH <i>Muriellopsis</i> sp. .	31
<b>Figura 10</b> Citometría de Flujo de MCH <i>Muriellopsis</i> sp. a distintos días de cultivo para determinar viabilidad celular en condiciones al exterior .....	33
<b>Figura 11</b> Análisis de porcentaje de viabilidad celular de MCH <i>Muriellopsis</i> sp., por medio de Citometría de Flujo en distintas condiciones de cultivos en condiciones al exterior. ....	34
<b>Figura 12</b> Microscopía confocal para determinar viabilidad y morfología celular de MCH <i>Muriellopsis</i> sp.....	35
<b>Figura 13</b> Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en MCH <i>Muriellopsis</i> sp., por Citometría de Flujo.....	37
<b>Figura 14</b> Análisis del porcentaje de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la microalgas MCH <i>Muriellopsis</i> sp., por medio de Citometría de Flujo en distintas condiciones de cultivo.....	38
<b>Figura 15</b> Microscopía confocal para determinar estrés oxidativo y morfología celular de MCH <i>Muriellopsis</i> sp. ....	39

<b>Figura 16</b> Porcentaje de luteína de MCH <i>Muriellopsis</i> sp .....	41
<b>Figura 17</b> Cromatograma de extractos microalgales .....	42
<b>Figura 18</b> Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de luteína de la microalga MCH <i>Muriellopsis</i> sp. con el método de DPPH.....	44
<b>Figura 19</b> Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de luteína de la microalga MCH <i>Muriellopsis</i> sp. con el método de FRAP .....	45



**ABREVIATURAS**

<b>MCH</b>	MCH <i>Muriellopsis</i> sp.
<b>%</b>	Porcentaje
<b>T°</b>	Temperatura
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
<b>FRAP</b>	Ferric Reducing Antioxidant Power
<b>NPQ</b>	Non Photochemist Quenching
<b>SST</b>	Solidos suspendidos totales
<b>Fv/Fm</b>	Eficiencia cuántica máxima
<b>DHE</b>	Dihidroetidio
<b>PI</b>	Yoduro de propidio
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficiencia
<b>TPTZ</b>	2,4,6-tripiridil-s-triazina
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogeno
<b>TEAC</b>	Capacidad antioxidante
<b>TE</b>	Equivalentes de Trolox
<b>PSII</b>	Fotosistema II
<b>PAR</b>	Radiación Fotosintéticamente Activa

## UNIDADES

<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>cm</b>	Centímetros
<b>mm</b>	Milímetro
<b>µm</b>	Micrómetro
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>g</b>	Gramos
<b>mg</b>	Miligramo
<b>µg</b>	Microgramo
<b>h</b>	Horas
<b>min</b>	Minutos
<b>seg</b>	Segundos
<b>L</b>	Litros
<b>mL</b>	Mililitros
<b>µL</b>	Microlitros
<b>v/v</b>	Volumen / volumen
<b>M</b>	Molar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup></b>	Micromol por metro cuadrado por segundo
<b>cel·L<sup>-1</sup></b>	Células por litro
<b>mg·L<sup>-1</sup></b>	Miligramos por litro
<b>g·L<sup>-1</sup></b>	Gramos por litro
<b>pg·cel<sup>-1</sup></b>	Picogramos por célula
<b>mg luteína·g<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup></b>	Miligramos de luteína por gramos por día
<b>mg Eq Trolox·g<sup>-1</sup> biomasa</b>	Miligramos equivalentes de Trolox por gramos de biomasa

**RESUMEN**

Las microalgas son especies muy abundantes en el mundo, creciendo en todo tipo de ambientes y condiciones. Estos organismos producen variados productos muy cotizados en el mercado, como lo son: aminoácidos, lípidos, carbohidratos y pigmentos. Estos últimos, principalmente los carotenoides, son utilizados en la industria alimentaria como preservantes o colorantes. Hoy en día se conocen los beneficios del consumo de variadas especies de microalgas debido a su alto contenido en carotenoides. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto en la capacidad antioxidante y producción de luteína al exponer y cultivar en mezclas de agua dulce y de mar en condiciones al interior y al exterior de la especie dulceacuícola clorófito MCH *Muriellopsis* sp., aprovechando las condiciones de alta irradiación del Norte chileno. Para lograr este objetivo, MCH fue cultivada en distintas concentraciones de salinidad, de manera de provocar estrés en la microalga; se evaluaron los siguientes tratamientos: agua dulce, agua de mar y una mezcla de éstas en proporción 50:50. Además de una cepa previamente adaptada en agua de mar, MCH-35. Se realizaron curvas de crecimiento, determinando la producción de luteína y la actividad antioxidante. Los resultados se compararon con curvas de crecimiento en sistemas al interior y exterior, evaluando la biomasa, la producción de luteína mediante HPLC y la actividad antioxidante utilizando los métodos DPPH y FRAP. Se evidenció que MCH en condiciones al exterior y en agua de mar presenta cambios en el aumento del número celular, concentración de biomasa, composición de carotenoides y actividad antioxidante. Al interior, MCH-SW obtuvo los valores más altos en productividad de luteína y actividad antioxidante. Sin embargo, MCH-35 obtuvo los resultados más prometedores en condiciones al exterior, ya que posee alta producción de luteína y alta actividad antioxidante, en comparación con las otras condiciones. Estas condiciones de salinidad y alta radiación activarán un mecanismo de protección en la microalga e incrementarán la carotenogénesis. Los resultados que se esperan apuntan a encontrar la mejor condición de cultivo donde MCH tenga una alta productividad de luteína en el menor tiempo posible, y que utilice recursos como el agua de mar, para que sea un proceso rentable para la producción de biomasa de microalga rica en luteína y su potencial utilización como suplemento alimenticio de consumo humano.

### **SUMMARY**

Microalgae are very abundant species in the world, growing in all kinds of environments and conditions. These organisms produce various products that are highly valued in the market, such as: amino acids, lipids, carbohydrates and pigments. The latter, mainly carotenoids, are used in the food industry as preservatives or dyes. Nowadays, the benefits of the consumption of various species of microalgae are known due to their high content of carotenoids. The objective of this work is to study the effect on the antioxidant capacity and production of lutein by exposing and cultivating in freshwater and seawater mixtures under indoor and outdoor conditions of the freshwater chlorophytic species MCH *Muriellopsis* sp., taking advantage of the conditions of high irradiation of the Chilean North. To achieve this goal, MCH was cultivated in different concentrations of salinity, in order to cause stress in the microalgae; The following treatments were evaluated: fresh water, seawater and a mixture of these in a 50:50 ratio. In addition to a strain previously adapted in seawater, MCH-35. Growth curves were made, determining the production of lutein and the antioxidant activity. The results were compared with growth curves in indoor and outdoor systems, evaluating biomass, lutein production by HPLC and antioxidant activity using the DPPH and FRAP methods. It was evidenced that MCH in outdoor conditions and in seawater presents changes in the increase of cell number, biomass concentration, carotenoid composition and antioxidant activity. Inside, MCH-SW obtained the highest values in lutein productivity and antioxidant activity. However, MCH-35 obtained the most promising results in outdoor conditions, since it has high lutein production and high antioxidant activity, in comparison with the other conditions. These conditions of salinity and high radiation will activate a mechanism of protection in the microalga and will increase carotenogenesis. The results that are expected aim to find the best culture condition where MCH has a high productivity of lutein in the shortest time possible, and that uses resources such as seawater, to be a profitable process for the production of microalgae biomass rich in lutein and its potential use as a food supplement for human consumption.

## **1. INTRODUCCIÓN**

En la actualidad una nutrición humana adecuada es un tema de gran importancia ya que en los últimos años ha aumentado el consumo de productos naturales dejando de lado los conservantes sintéticos, que se han relacionado con su presunto papel como promotores de carcinogénesis debido a componentes tóxicos que pueden contener (El-Baky y cols., 2008).

Los carotenoides se han utilizado tradicionalmente como alimentos para peces y aves de corral con el fin de mejorar el color rojizo de estos peces o el color amarillento de la yema de huevo. Dado los beneficios reportados en estas industrias, el uso de los carotenoides obtenidos a partir de microorganismos ha ido en aumento, transformándose en una práctica común, al utilizarse para la preservación de alimentos o como colorantes (Guedes y cols., 2014). Además, el caroteno ha experimentado una demanda creciente en preparados multivitamínicos debido a su capacidad para convertirse en vitamina A (retinol), por lo que se incluye frecuentemente en la formulación de alimentos saludables. Los carotenoides más estudiados son el  $\beta$ -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina, debido a sus conocidos beneficios para la salud disminuyendo el riesgo de varias enfermedades, particularmente ciertos cánceres y enfermedades degenerativas del ojo; además, poseen efectos hiperlipidémicos y antihipercolesterolémicos, condiciones relacionadas con enfermedades coronarias (Krinsky and Johnson 2005; Murthy y cols. 2005)

### **1.1 Microalgas**

Las microalgas pueden tener diferentes características, entre ellas formar colonias, ser unicelulares, filamentosas o sifónicas, están distribuidas en más de 13 phylas y son capaces de realizar fotosíntesis. Las microalgas clorófitas se encuentran principalmente en agua dulce, mientras que las criptófitas ampliamente

distribuidas tanto en agua dulce como en ambientes marinos. Por otro lado, los dinofitos son organismos unicelulares con dos flagelos diferentes y la mayoría se distribuyen en ambientes marinos (Begum y cols., 2016).

Estos organismos producen varios productos que son de gran valor comercial como aminoácidos, lípidos, carbohidratos y pigmentos (Osanai y cols., 2017). El mercado de biomasa de microalgas posee un tamaño de aproximadamente 5.000 t/año de materia seca y genera una ganancia aproximada de US\$  $1,25 \cdot 10^9$ /año. El éxito en la biotecnología de algas depende principalmente en elegir la cepa correcta con propiedades relevantes y productos específicos. Por lo tanto, el conocimiento básico de la fisiología, ecología y taxonomía de las algas es importante (Pulz & Gross, 2004).

### **1.2 Pigmentos**

Las microalgas están compuestas por tres principales clases de pigmentos fotosintéticos: clorofilas, ficobilinas y carotenoides. Las clorofilas y los carotenoides son generalmente moléculas solubles en grasa, mientras que las ficobilinas son hidrosolubles (Begum y cols., 2016).

#### **1.2.1 Clorofila**

Existen tres clases de clorofilas a, b y c. Su estructura es un macrociclo de porfirina que consiste en anillos de tetrapirrol. Cada anillo de pirrol contiene cuatro átomos de carbono y un átomo de nitrógeno. Posee un agujero central que le permiten a los átomos de nitrógeno mirar hacia el interior y de esta manera se pueda unir fácilmente un ion metálico  $Mg^{2+}$ . El grupo formilo en el anillo II de la clorofila b se intercambia por un grupo metilo en la clorofila. Debido a estas diferencias estructurales, la clorofila a tiene un pigmento azul/verde con una absorbancia máxima de 660 a 665 nm y la clorofila b tiene un pigmento

verde/amarillo con una absorbancia máxima de 642 a 652 nm. Numerosos productos de degradación se forman debido a la exposición de moléculas de clorofila a ácidos débiles, oxígeno o luz y, en consecuencia, acelerar su oxidación (Wrolstad, 2004).

### **1.2.2 Ficobiliproteínas**

Las ficobiliproteínas son proteínas oligoméricas, formadas por polipéptidos portadores de cromóforos, componentes de colores brillantes y altamente fluorescentes de los complejos de antenas fotosintéticas captadoras de luz de cianobacterias (algas verdeazuladas), algas rojas y criptomonas. Estas se pueden dividir en tres clases, según sus secuencias aminoacídicas y propiedades espectroscópicas: ficoeritrina de color rojo, ficocianina y aloficocianina ambas de color azul. Se ensamblan en ficobilisomas y se unen a la superficie de los tilacoides para la fotosíntesis. Las ficobiliproteínas tienen diversas propiedades espectrales debido a las bilinas que tienen espectros de absorción individuales (Glazer, 1994).

### **1.2.3 Carotenoides**

Los carotenoides con isoprenoides lipofílicos que son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos, también algunas bacterias y hongos. Los animales no pueden sintetizarlos, por lo que deben ser incluidos en su dieta para utilizarlos como provitina, antioxidante o colorante. Por lo general son de color amarillo, naranja o rojo (Varela y cols., 2015).

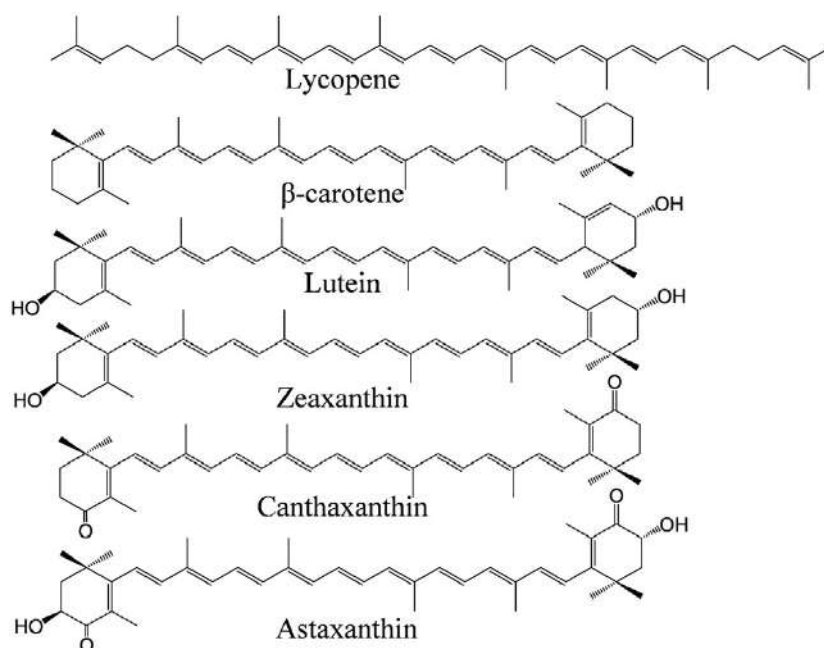
Los carotenoides poseen una estructura de 40 carbonos, y se dividen en dos grandes grupos: carotenos y xantofilas. Cada caroteno posee isómeros *trans* y *cis*. Las xantófilas son derivados de oxigenados de carotenos (hidrocarburos) y

son levemente hidrofílicos debido a la presencia de grupos hidroxilos y cetos en sus anillos extremos (Gong & Bassi, 2016).

Los carotenoides utilizados en la fotosíntesis son menos de 30, la mayoría se encuentra en las membranas tilacoidales, son indispensables en la recolección de la luz y transferencia de energía durante la fotosíntesis y en la protección del aparato fotosintético contra el daño foto-oxidativo ya que poseen propiedad antioxidante, protegen a las células de radicales libres y previenen la peroxidación de los lípidos. Puede mejorar la fluidez de la membrana celular en condiciones de alta temperatura o alta iluminación. Además, el exceso de energía generado dentro de la célula se puede disipar en forma de calor mediante disipación no fotoquímica (NPQ). La disipación de energía es para proteger del daño celular por las especies químicas reactivas, y se logra mediante el cruce entre sistemas desde los carotenoides de estado triplete al estado fundamental (Begum y cols., 2016; Gong & Bassi, 2016).

Algunos carotenoides primarios como la luteína, funcionan como pigmentos accesorios que pueden transferir energía absorbida a las clorofilas a y de este modo, expandir el espectro absorbente de luz de las algas o las plantas. Por otro lado, algunos carotenoides secundarios como la astaxantina y la cantaxantina que se encuentran en vesículas lipídicas, se relacionan con los mecanismos de protección de las células, forman una capa protectora cuando las células están expuestas a condiciones estresantes y proporcionan el característico color rosado/rojo de algunas algas estresadas. La mayoría de los carotenoides se encuentran en forma de éster o diéster, por lo que se necesita saponificación después de la extracción de los pigmentos. Como antioxidantes, los carotenoides son en general sensibles a la luz, oxígeno y calor, lo que puede conducir a dificultades en el almacenamiento y la manipulación (Begum y cols., 2016; Gong & Bassi, 2016; Varela y cols., 2015).



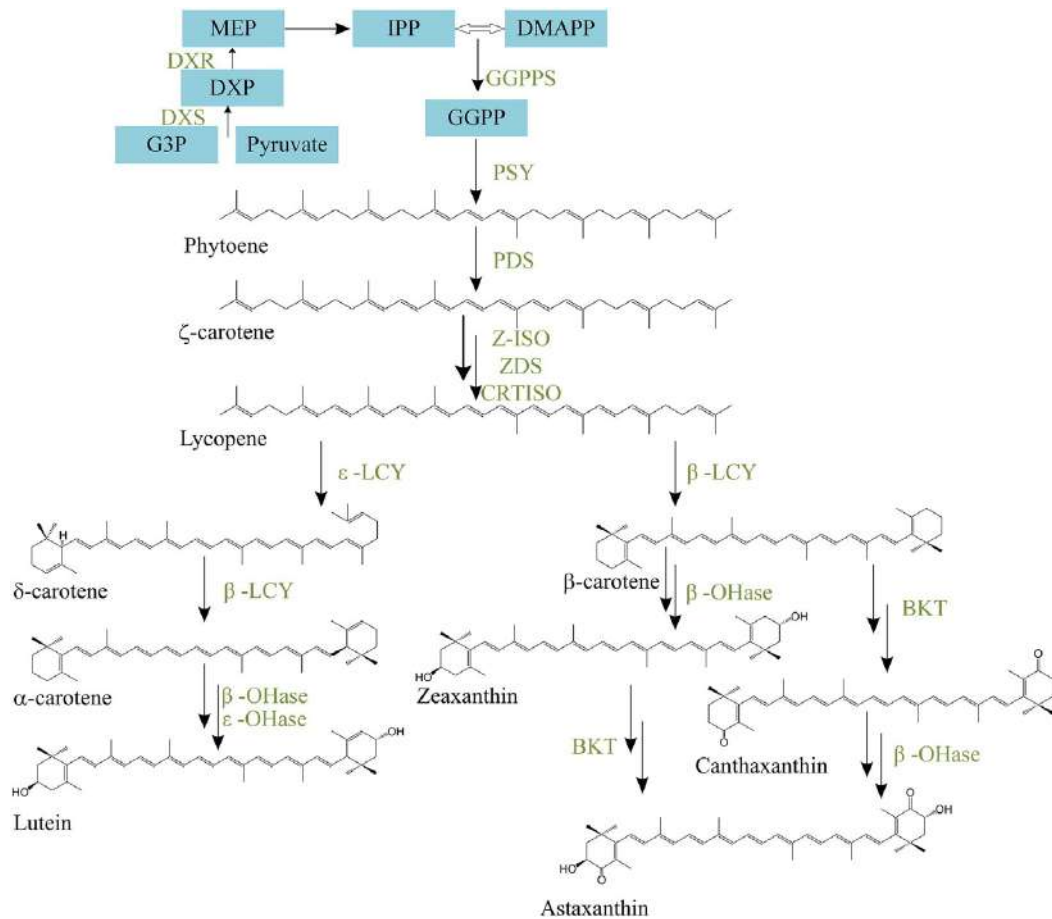


**Figura 1** Estructura química de los carotenoides más estudiados en microalgas (Gong & Bassi, 2016).

### 1.2.3.1 Biosíntesis de carotenoides

La biosíntesis de los carotenoides tiene lugar en el cloroplasto, aunque incluye algunos pasos específicos en el citoplasma, esta acción es regulada por el estrés ambiental. La biosíntesis de carotenoides difiere de una especie a otra. La vía inicia con isopentenil pirofosfato (IPP) o su isómero, dimetilalil difosfato (DMAPP) ambos de 5 carbonos, producto de la ruta del piruvato y gliceraldehído 3-fosfato (G3P), luego ocurre un proceso de elongación sucesiva mediante enzimas, posterior condensación y se forma el primer carotenoide de 40 carbonos, fitoeno, luego en presencia de una enzima denaturasa se forma el  $\zeta$ -caroteno, luego se forma licopeno, el primer carotenoide coloreado. Además, mediante dos tipos de reacciones de ciclación, se producen las estructuras de  $\alpha$ -caroteno o  $\beta$ -caroteno. Que pueden formar diversos carotenoides si ocurren transformaciones de cadena adicionales como hidroxilación, epoxidación, cetolación, glicosilación y

escisión de oxígeno. Carotenoides como la astaxantina se pueden sintetizar en microalgas fotosintéticas a partir de la cantaxantina o la zeaxantina (Gong & Bassi, 2016).



**Figura 2** Ruta biosintética de los carotenoides en la mayoría de las especies de microalgas verdes. IPP y DMAPP son la base de todos los carotenoides, las xantofilas oxigenadas se derivan de  $\alpha$ - o  $\beta$ -caroteno. Las enzimas involucradas se muestran:  $\beta$ -LCY,  $\beta$ -ciclasa;  $\beta$ -OHase,  $\beta$ -caroteno hidroxilasa; CRTISO, carotenoide isomerasa; DMAPP, dimetilalil difosfato; DXP, desoxi-D-xilulosa 5-fosfato; DXS, DXP sintasa;  $\epsilon$ -LCY,  $\epsilon$ -ciclasa;  $\epsilon$ -OHase,  $\epsilon$ -caroteno hidroxilasa; G3P, gliceraldehído-3-fosfato; GGPP, geranilgeranil difosfato; GGPPS, GGPP sintasa; IPP, isopentenil pirofosfato; MEP, 4-fosfato de metileritritol; PDS, fitoeno desaturasa; PSY, fitoeno sintasa; ZDS,  $\zeta$ -caroteno desaturasa; Z-ISO,  $\zeta$ -caroteno isomerasa (Gong & Bassi, 2016).

### 1.2.3.1.1 Luteína

La luteína posee una estructura de cadena larga de 40 carbonos con enlaces carbonados simples y dobles con grupos laterales de metilo en ambos extremos que contienen una estructura de hexenilo cíclica con un grupo hidroxilo. Es de color amarillo o naranja, dependiendo de su concentración y absorbe luz azul. La luteína posee isómeros trans, cis y epoxi, en la naturaleza a menudo esta presente como un éster graso, lo que significa que uno o dos de los residuos hidroxilo están unidos a un ácido graso, es por ello que para la purificación de esta se lleva a cabo mediante saponificación, para obtener la luteína no esterificada de forma libre (Kijlstra y cols., 2012).

La luteína es un importante carotenoide que se puede encontrar naturalmente en algas, se ha utilizado para la pigmentación de tejidos y productos animales y se considera importante para la coloración natural de los alimentos, drogas y cosméticos. Una fuente común de luteína son las plantas, principalmente las flores de caléndula, sin embargo, dentro de las ventajas de la producción de este carotenoide a partir de microalgas se puede encontrar: una tasa de crecimiento 5-10 veces superior a las plantas, con alta fijación de CO<sub>2</sub> se han propuesto como una alternativa para la producción de luteína libre, como fuentes para la producción de combustibles o productos. Además, pueden ser cultivadas en agua de mar o agua salobre y en tierras no cultivables, por lo que las microalgas no compiten por los recursos con la agricultura convencional (Guldhe y cols., 2017; Lin y cols., 2015).

Aunque todavía no existe un sistema comercial establecido para la producción de luteína a partir de microalgas, la capacidad de crecimiento heterotrófico en fermentadores de cepas como *Muriellopsis* sp., *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp., es un potencial recurso alternativo (Lin y cols., 2015; Yaakob y cols., 2014).

### **1.3 Aplicación de carotenoides presentes en microalgas**

En la nutrición humana el consumo de biomasa de microalgas está restringido a unas pocas especies, entre las que se encuentran *Dunaliella* sp., *Spirulina* sp. y *Chlorella* sp., siendo estas últimas las especies que dominan el mercado de microalgas, donde su biomasa se utiliza para alimentos saludables, con más del 75% de la producción anual utilizada para la fabricación de polvos, cápsulas o pastillas. Se espera que los alimentos saludables sean el futuro mercado, donde los llamados alimentos funcionales o nutraceuticos son productos enriquecidos con carotenoides de microalgas. En países como Alemania, Francia, Japón, Estados Unidos, China y Tailandia se está buscando comercializar alimentos funcionales con microalgas y cianobacterias en forma de pastas, pan, yogur y refrescos debido a los beneficios que poseen, los cuales se han evidenciado gracias a varios estudios (Ibañez & Guerrero, 2017; Matos y cols., 2017; Pulz & Gross, 2004).

#### **1.3.1 Industria y Salud**

El mercado global de carotenoides esta creciendo año tras año y se espera que en 2022 alcance los US \$ 2,0 mil millones, con una tasa de crecimiento anual de 5,7% (BCC Research, 2018), esto se debe al aumento de la demanda de carotenoides como productos naturales, utilizados en industrias de alimentos, farmacéutica y cosméticos entre otros. Los más requeridos y valiosos son;  $\beta$ -caroteno, astaxantina, cantaxantina, licopeno y luteína (Jha y cols. 2017; Lin y cols., 2015).

##### **1.3.1.1 Salud**

Los pigmentos extraídos de especies de microalgas como *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp., *Haematococcus* sp. y *Spirulina* sp., se consumen frecuentemente

en el continente asiático y se utilizan carotenoides rojos como colorantes para el vino, carne, queso de soya roja y algunos pescados (Cardoso y cols., 2017). En Rusia se utiliza como suplemento alimenticio para enriquecer fórmulas infantiles con carotenoides como luteína, para mejorar la salud de los infantes (Kon y cols., 2014). En Japón e India utilizan una alga comestible llamada *Undaria pinnatifida* (wakame), que es rica en fucoxantina, esta se usa como ingrediente aplicado en pastas y pan (Kadam & Prabhasankar, 2010; Prabhasankar y cols., 2009).

Algunos carotenoides como  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y criptoxantina son precursores de vitamina A, que se involucra con funciones biológicas, incluida la visión, reproducción e inmunidad. Los carotenoides presentan actividades como antiinflamatorio, antioxidante, inmunomodulador, anticancerígeno, para terapia cardiovascular, antiobesidad y enfermedades neurodegenerativas. Asociado a varios procesos celulares específicamente tumorales interfiere por ejemplo en las conexiones en hendidura o GAP (Cardoso y cols. 2017; Krinsky & Johnson, 2005)

### **1.4 Actividad antioxidante**

Algunos de los beneficios que poseen las microalgas son sus componentes con capacidad antioxidante contra los radicales libres y el oxígeno singlete formados en los tejidos. Sin embargo, primero se debe entender que es un proceso de oxidación. Éste ocurre cuando los electrones se eliminan de un átomo o un grupo de átomos y pueden implicar la adición de átomos de oxígeno, o la eliminación de átomos de hidrógeno a partir del compuesto que se somete a oxidación. Simultáneamente, existe una reducción correspondiente que implica la adición de electrones a un átomo o grupo de átomos distintos (Gião y cols., 2011).

### **1.4.1 ROS**

Los compuestos químicos capaces de generar especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés Reactive Oxygen Species) denominadas "pro-oxidantes", poseen un solo electrón desapareado en una órbita externa, son productos normales del metabolismo aeróbico implicado en procesos bioquímicos como lo son: señales de traducción y transcripción, expresión genética y activación de cascadas de señalización celular. En una célula normal, los pro-oxidantes y los antioxidantes están en equilibrio, pero este equilibrio puede verse afectado desplazándose hacia los pro-oxidantes cuando la producción de ROS aumenta debido a, por ejemplo, la ingesta de ciertos compuestos químicos o fármacos, mientras que los niveles de antioxidantes se reducen. Este desequilibrio es denominado "estrés oxidativo" (Somogyi y cols., 2007; Zuluaga y cols. 2017).

### **1.4.2 Estrés oxidativo**

Las microalgas son filogenéticamente los organismos fotosintéticos más antiguos y se han adaptado a hábitats extremos durante miles de millones de años de evolución. Son organismos fototróficos que han desarrollado sistemas eficaces de protección contra los factores de estrés oxidativos y radicales, contrarrestando así el daño celular. En cultivos de microalgas se puede observar una saturación de oxígeno, formándose radicales libres (anión superóxido, radical hidroxilo) que causan daño celular, pero estos microorganismos promueven el proceso endógeno de destoxificación hacia el ataque oxidativo mediante una acumulación de complejos antioxidantes altamente eficaces. Un ejemplo de esto es *Spirulina* sp., que posee un potencial antioxidante, por lo que se ha utilizado para aplicación en cosméticos como preservante y protector del producto, con fines alimentarios en bebidas y para terapia de enfermedades asociadas a la oxidación, como inflamaciones (Pulz & Gross, 2004).

Estas respuestas adaptativas al estrés oxidativo de las microalgas se presentan a través de la estimulación de su sistema de defensa antioxidante que consiste en mecanismos enzimáticos y no enzimáticos: la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa y ascorbato peroxidasa son enzimas clave en el mecanismo enzimático, la contraparte no enzimática incluye compuestos mediadores tales como ácido ascórbico, glutatión reducido, tocoferoles, carotenoides y ficocianina (Guedes y cols., 2013; Hong y cols., 2008).

### **1.4.3 Antioxidante**

Un antioxidante se podría definir como "cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo a una molécula diana" (Halliwell, 2015). Los antioxidantes se dividen generalmente en dos grupos, dependiendo de su mecanismo de acción: antioxidantes de rotura de cadena y antioxidantes preventivos. Estos últimos reducen la velocidad de iniciación de la cadena, mientras que los primeros, que incluyen los carotenoides, interfieren con la propagación de la cadena. Por otra parte, los antioxidantes se pueden clasificar como compuestos donadores de hidrógeno, inhibidores de oxígeno singlete, enzimas, quelantes metálicos o depuradores de oxígeno. Los extinguidores de oxígeno singulares incluyen carotenoides, tocoferol y ácido ascórbico. Pueden reaccionar con el oxígeno antes que otras estructuras esenciales (Gião y cols., 2011).

Dado que los carotenoides son potentes antioxidantes biológicos, son capaces de absorber la energía de excitación de ROS en su compleja cadena anillada, promoviendo así la disipación de energía mientras protegen los tejidos de posibles daños químicos. Su capacidad de barrido radical reduce la desintegración tisular al reducir la descomposición de moléculas tales como ADN, proteínas y lípidos de membrana (Somogyi y cols., 2007). Algunos procesos provocados por ROS también se han relacionado con el proceso de envejecimiento, así como con

la patogénesis de varias enfermedades, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, artritis reumatoide, distrofia muscular, cataratas y varios trastornos neurológicos (Bai y cols. 2005; Kim y cols. 2008; Palozza y cols. 2003).

Los efectos antioxidantes de los carotenoides dependen del número de dobles enlaces conjugados, de la estructura de la cadena y de los grupos funcionales específicos (Subagio y cols., 1999). La luteína y la zeaxantina son estereoisómeros que pertenecen a la familia de las xantofilas (Granado-Lorencio y cols., 2009). Estudios han revelado que el consumo de estos compuestos previene la aparición de cáncer de próstata y la degeneración macular del ojo, además se ha demostrado que una dieta rica en luteína reduce el crecimiento de tumores y mejora la proliferación de linfocitos. Ha sido recomendada para mejorar la capacidad cognitiva en la enfermedad de Alzheimer, que es aparentemente causada por el estrés oxidativo persistente en el cerebro (Fennema, 1996; Lakshminarayana y cols., 2010; Olasehinde y cols., 2017).

### **1.5 *Muriellopsis* sp., como fuente de carotenoides**

*Muriellopsis* sp., acumula altos niveles de luteína, 35 mg·L<sup>-1</sup> de cultivo, además de obtener altos valores de biomasa celular (hasta 8·10<sup>10</sup> células·L<sup>-1</sup> de cultivo), en cultivo discontinuo fotoautótrofo (Van Bergeijk y cols., 2013).

La composición bioquímica microalgal está relacionada estrechamente al estrés nutricional (Ej. inanición) o ambiental (Ej. exposición a metales o radiación ultravioleta). Es bien sabido que el estrés nutricional puede inducir la acumulación de carotenoides en varias especies de microalgas (Goiris y cols., 2015).

En el caso de *Muriellopsis* sp., ésta microalga posee un alto contenido de carotenoides totales, llegando aproximadamente 1% en peso seco (Blanco y cols., 2007). La luteína es el carotenoide principal, representando alrededor del 50% del



total, y está presente en forma libre. Otros carotenoides presentes en esta microalga son  $\beta$ -caroteno, neoxantina y violaxantina. La tasa de crecimiento y producción de luteína se basa principalmente en su capacidad para tolerar salinidad moderada, alta irradiación y un amplio rango de pH. En sistemas de cultivos abiertos expuestos a la luz natural del sol, existe un aumento significativo del contenido de luteína que se produce en respuesta a niveles de irradiación muy altos, donde la biomasa seca puede acumular entre 0,4 y 0,6% de luteína. Se ha propuesto que este pigmento contribuye a la disipación del exceso de energía luminosa, teniendo un papel activo en la fotoprotección contra el estrés provocado por alta intensidad lumínica. Las condiciones de pH también pueden afectar la producción de biomasa y estimulación de carotenogénesis por separado, obteniéndose hasta 0,8% en peso seco a pH 9.5, sin embargo, en estas condiciones se ve afectada la viabilidad de los cultivos a largo plazo. *Muriellopsis* sp., es una cepa moderadamente halotolerante y la productividad de la biomasa se mantiene en respuesta al aumento de NaCl en el medio de 2 mM hasta 200 mM. Un aumento moderado en la concentración de cloruro de sodio (de 2 mM hasta 75 mM de NaCl) aumentó al menos en un 40% la productividad de la luteína. Sin embargo, con concentraciones de NaCl hasta 200 mM se observó que afecta negativamente al crecimiento de la microalga, además de una baja productividad de luteína (Blanco y cols., 2007; Del Campo y cols., 2000).

Los antecedentes conocidos hasta ahora permiten proponer que el cultivo de la cepa clorófito MCH *Muriellopsis* sp. sp., en sistemas de biorreactores es adecuado en condiciones exteriores (Blanco y cols., 2007; Sánchez y cols., 2008). Este cultivo no sería afectado por fotoinhibición debida a la alta irradiancia de la región de Antofagasta que alcanza valores sobre los  $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y los cambios de temperatura existentes no inhibirían el crecimiento de la microalga.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Hipótesis**

La exposición de la cepa nativa MCH *Muriellopsis* sp. aislada de un sistema dulceacuícola, a un aumento de salinidad y alta irradiancia (condiciones ambientales al exterior) desarrollarán condiciones de estrés en la microalga lo cual afectará la actividad antioxidante e incrementará la producción de luteína.

### **2.2. Objetivo General**

Determinar el efecto del aumento de salinidad y alta irradiancia sobre la microalga MCH *Muriellopsis* sp. en la producción de luteína en condiciones de cultivo al interior y exterior e identificar la actividad antioxidante.

### **2.3 Objetivos Específicos**

1. Evaluar el efecto del agua de mar sobre el crecimiento de la microalga MCH *Muriellopsis* sp. en cultivo al interior y exterior.
2. Evaluar el efecto de la irradiancia sobre el crecimiento de la microalga MCH *Muriellopsis* sp. en cultivo al interior y exterior.
3. Determinar la productividad de luteína y su actividad antioxidante en cultivos de la microalga MCH *Muriellopsis* sp. en condiciones de cultivo al interior y exterior.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Cepa microalgal utilizada**

Se utilizó la cepa microalgal clorófito MCH *Muriellopsis* sp. disponible en el cepario de la Unidad de Microbiología Aplicada de la Universidad de Antofagasta, donde fueron mantenidas en matraces con medio UMA5 (sección 3.2.2). Esta cepa fue aislada de un residuo acuoso de un macetero en la ciudad de Antofagasta. Se realizó tres condiciones de cultivo, en agua dulce (MCH-0), una mezcla de agua dulce y agua de mar en una proporción 50:50 (MCH-50:50) y en agua de mar natural (MCH-SW, del inglés Sea Water). Además se utilizó una cepa microalgal de la misma especie y origen previamente adaptada en agua de mar denominada MCH-35.

#### **3.2 Cultivo de microalgas**

##### **3.2.1 Sistema de cultivo**

Las microalgas fueron cultivadas en bolones de vidrio de fondo plano de 1 L hasta alcanzar su fase exponencial de crecimiento. Los cultivos fueron transferidos a botellones de policarbonato de 20 L con medio UMA5 (Riveros y cols., 2018), e incubados por 21 días. Para el sistema al interior, los parámetros físicos fueron: temperatura de 20°C, con intensidad lumínica constante de 183,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  (2 tubos fluorescentes OSRAM Universal) y agitación por burbujeo de aire (0,2 vv/min). En cuanto al sistema al exterior, los parámetros fueron: temperaturas entre 10 y 25 °C, con variaciones de intensidad lumínica que puede superar los 2000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  y agitación constante.

### 3.2.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo UMA5 corresponde a una modificación del medio f/2 de Guillard & Ryther, (1962) (Tabla 1 y 2). Cada uno de los reactivos fue pesado en balanza analítica (RADWAG, AS22OC2, España) y diluidos con agua desmineralizada de acuerdo a lo indicado. Posteriormente fueron esterilizados a 121 °C por 15 minutos en autoclave.

Tabla 1. UMA5 (f/2 Modificado)

Componente	Solución stock (g·L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Cantidad utilizada	Concentración final en el medio (M)
NaNO <sub>3</sub>	191,25	2 mL	0,0045
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	33,12	1 mL	0,00024
NaHCO <sub>3</sub>	84	2 mL	0,002
Solución de metales traza	(ver Tabla 2)	1 mL	

Tabla 2. Solución de metales traza

Componente	Solución stock (g·L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Cantidad utilizada	Concentración final en el medio (M)
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	–	3,15 g	1,17 × 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	–	4,36 g	1,17 × 10 <sup>-5</sup>
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	180,0	1 mL	9,10 × 10 <sup>-7</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22,00	1 mL	7,65 × 10 <sup>-8</sup>
CoSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10,0	1 mL	4,20 × 10 <sup>-8</sup>
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	9,8	1 mL	3,93 × 10 <sup>-8</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	6,3	1 mL	2,60 × 10 <sup>-8</sup>

\* En 950 mL de dH<sub>2</sub>O, disolver el EDTA y luego agregar los componentes. Llevar a un volumen final de 1 litro, usando dH<sub>2</sub>O.

### **3.2.3 Tratamiento del agua para cultivo**

Los medios de cultivo fueron preparados con agua dulce y agua de mar, ambas filtradas a 10, 5, 1 y 0,5  $\mu\text{m}$  y desinfectadas con 0,1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de hipoclorito de sodio comercial ( $\text{NaClO}$ ) en polvo por 24 horas. El hipoclorito fue neutralizado con 0,3  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) por 20 L de agua por un tiempo mínimo de 2 horas.

### **3.2.4 Inoculación de microalgas**

Se utilizó un inóculo de  $10^5 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  en fase exponencial, para los medios de cultivo preparados en el agua desinfectada y neutralizada.

## **3.3 Seguimiento de los cultivos**

### **3.3.1 Concentración celular**

En cada monitoreo se realizó recuento celular de 3 réplicas, el cual se llevó a cabo en una cámara de recuento Neubauer, observado en un microscopio OPTIKA (B-800/B100 Series, Italia).

### **3.3.2 Concentración de biomasa**

Para determinar el peso seco de las muestras, se deben medir los sólidos suspendidos totales (SST), para ello se filtraron 100 mL de cultivo a través de membranas de fibra de vidrio de (0,2  $\mu\text{m}$ ). Los filtros fueron secados en estufa (MEMMERT, UM 600- 2400W, Alemania) a 105 °C por 24 horas.

La concentración de biomasa se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{(P2-P1)}{V} = \text{SST} (\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$$

Donde:

P1: peso filtro seco, g

P2: peso filtro + microalga seca, g

V: volumen de cultivo filtrado, L  
SST: sólidos suspendidos totales, g·L<sup>-1</sup>

### 3.3.3 pH

Se monitoreó la variación de pH durante todo el experimento con un sensor de pH (Crison, Serie 53 42 T, España).

### 3.3.4 Máxima Eficiencia Fotosintética (Fv/Fm) y Disipación No Fotoquímica (NPQ)

Con el objetivo de conocer el estado fotosintético de las microalgas en los cultivos, se midió la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) con un fluorómetro (Junior-PAM, Chlorophyll Fluorometer, Walz; Alemania). Este dispositivo está equipado con luces de excitación azul y roja y permite medir la fluorescencia de la clorofila a asociada al fotosistema II (PSII). Para la medición se procedió a llenar una cubeta de plástico con el cultivo microalgal sin diluir, se incubó por 15 minutos en oscuridad e inmediatamente se determinó el valor de Fv/Fm, que fue obtenida automáticamente basándose en el cálculo que emplea la fluorescencia máxima (Fm) y mínima de clorofila según la ecuación:

$$Fv/Fm = \frac{Fm - Fo}{Fm}$$

La medición de NPQ, del inglés Non Photochemist Quenching, se realizó con un fluorómetro (Junior-PAM, Chlorophyll Fluorometer, Walz; Alemania), una cubeta de plástico con el cultivo microalgal sin diluir, se incubó por 15 minutos en oscuridad e inmediatamente se midió NPQ.

$$NPQ = \frac{Fm - F'm}{F'm}$$

### **3.3.5 Viabilidad celular y estrés oxidativo**

#### **3.3.5.1 Viabilidad celular**

Para evaluar la viabilidad celular, se identificó a las células muertas durante la etapa experimental, bajo las distintas condiciones de cultivo. Para este procedimiento, se utilizó la tinción fluorescente Yoduro de Propidio (PI). Esta tinción se adhiere al DNA de las células con membrana plasmática dañada, emitiendo fluorescencia de color rojo. La tinción fue analizada mediante la técnica de Microscopia láser Confocal (Leica, TCS SP8, Alemania) y la técnica de Citometría de Flujo (FACS*Jazz*, USA, BD Bioscience Proyecto FONDEQUIP EQM120137). Para este procedimiento se prepararon suspensiones microalgales a una concentración de  $10^6$  células·mL<sup>-1</sup> y se le agregó 6 µL de PI 1.0 mg·mL<sup>-1</sup>, se incubó 1 h a T° ambiente protegido de la luz. Luego se leyó en el citómetro de flujo en canal 585/42 nm con 488 nm de excitación. Como control positivo para el fluorocromo se incubó previamente la microalga a 95 °C por mínimo 3 h y luego se continuo con el protocolo de tinción.

#### **3.3.5.2 Estrés oxidativo**

Para evaluar la integridad celular, se identificó el contenido de radicales libres (producción de anión superóxido O<sup>2-</sup>) durante la etapa experimental, bajo las distintas condiciones de cultivo. Para este procedimiento, se utilizó la tinción fluorescente Dihydroethidium (DHE). Esta tinción se adhiere al ADN de las células al reaccionar con el oxígeno y formar un producto fluorescente 2-hydroxyethidium, emitiendo fluorescencia de color rojo. La tinción fue analizada mediante la técnica de Microscopia láser Confocal (Leica, TCS SP8, Alemania) y la técnica de Citometría de Flujo (FACS*Jazz*, USA, BD Bioscience Proyecto FONDEQUIP EQM120137). Para proceder con el análisis se prepararon suspensiones microalgales a una concentración de  $10^6$  células·mL<sup>-1</sup>, y se les agregó 1 µL de DHE 8 mM, se incubó 1 h a T° ambiente protegido de la luz. Luego se leyó en

citómetro de flujo en canal 585/42 nm con 488 nm de excitación. Como control positivo para la tinción se incubó previamente la microalga con 3 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, se incubó 1 hora a T° ambiente. Se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos, se eliminó sobrenadante, se resuspendió en medio de cultivo de la microalga, luego se agregó DHE y se continuó con protocolo descrito.

### **3.4 Análisis de la composición de la biomasa**

#### **3.4.1 Extracción de carotenoides**

Se pesaron 200 mg de biomasa de microalga liofilizada, se le añadió la misma cantidad de alúmina (óxido de aluminio – Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) y la mezcla se molturó fuertemente por 5 minutos. Posteriormente se saponificó con 15 ml de una solución tricomponente que contiene agua (6 ml), etanol (77 ml), hexano (17 ml) y KOH (0,2 g). Se realizó ruptura celular utilizando UltraTurrax y se dejó incubando por 30 min. Luego se centrifugó durante 3 minutos a 3500 rpm, quedando un pellet blanco en el fondo (alúmina y restos de biomasa), se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se concentró mediante rotavapor (Buchi, R-210, Suiza), quedando un pegote verdoso en el tubo, ahí quedan los carotenoides los cuales deben ser resuspendidos y disueltos para medir al espectrofotómetro.

Posteriormente se agregó 10 mL de acetona, se agitó y recuperó la acetona en un tubo nuevo, quedando un líquido amarillo. La muestra quedó lista para ser analizada mediante HPLC, previo a su filtración con el filtro de nylon de 0,22 µm, la muestra filtrada se guardó en un vial ambar, a -20 °C hasta su análisis.

#### **3.4.2 Separación de compuestos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

Para identificar luteína de los extractos de microalgas. Se utilizó un equipo HPLC (Jasco, Japón), equipado con una bomba cuaternaria (Jasco, PU-2089s Plus), detector de arreglo de diodos, y sistema de inyección automática (Jasco,



AS-2055 Plus). Las muestras y estándares se disolvieron en metanol. Se empleó una columna en fase reversa, columna Lichrosphere RP-18 (4:6 × 150 mm, 5 μm) y como fase móvil, una mezcla de agua/metanol (2:8, v/v) (solvente A) y acetona/metanol (1:1, v/v) (solvente B). Se utilizó el siguiente gradiente: 0 a 8 minutos A: 75 % y B: 25 %, de 8 a 18 minutos se mantuvo en A: 25% y B: 75%, el flujo será de 1 mL·min<sup>-1</sup>. La columna se mantuvo a 20 °C y las muestras (30 μL) fueron inyectadas automáticamente. La detección fue monitoreada a 450 nm para carotenoides. La identificación del carotenoide luteína se llevó a cabo por comparación de sus tiempos de retención, curva de calibración y su espectro de absorción en el UV-Vis, con un estándar de luteína (Sigma).

### **3.4.3 Actividad antioxidante**

#### **3.4.3.1 Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)**

Se disolvió 0,2 mM de DPPH (Sigma) en metanol, luego se agregaron 150 μL de esta solución con 100 μL de extracto con una concentración de 200 μg·mL<sup>-1</sup>. Se utilizó Trolox (Sigma) como antioxidante de referencia en las mismas concentraciones utilizadas anteriormente. La reacción se incubó por 30 minutos en oscuridad y luego se midió su absorbancia a 517 nm. (Charioui y cols., 2017)

$$\text{Porcentaje (\%)} \text{ de inhibición de actividad DPPH} = \frac{[(\text{Absorbancia blanco} - \text{Absorbancia extracto})]}{\text{Absorbancia blanco}} \times 100$$

#### **3.4.3.2 Ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)**

El ensayo para la detección de antioxidantes FRAP, es un complejo amarillo de Fe<sup>3+</sup>-TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) (Sigma) que al ser reducido forma un complejo azul de Fe<sup>2+</sup>-TPTZ por el electrón que dona una sustancia, en medio ácido. El reactivo FRAP es una mezcla de 300 mM de buffer acetato de sodio (pH

3,6), 10 mM de TPTZ en solución con 40 mM de ácido clorhídrico y 20 mM de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , solución acuosa 10:1:1 (v/v). Una vez mezcladas, se agregaron 70  $\mu\text{l}$  de la disolución FRAP y 10  $\mu\text{l}$  de muestra a la microplaca de 96 pocillos, los extractos microalgales fueron preparados a una concentración de  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , estos se incubaron a 37 °C por 30 min. Las absorbancias fueron leídas a 593 nm. La absorbancia final de las muestras, fueron comparadas con una curva estándar de trolox ( $6,25 - 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Los resultados fueron expresados como mg de equivalente Trolox por gramo de muestra.

### **3.5 Análisis estadístico y bioinformático**

Los análisis estadísticos fueron realizados con el software estadístico GraphPad Prism© v.6.0. para Mac (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Se empleó ANOVA y test de Dunnet para la comparación de las muestras, con un  $p$ -valor de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Observación de crecimiento de la microalga clorófito MCH *Muriellopsis* sp.

Se observó la cepa clorófito MCH *Muriellopsis* sp., aislada desde la ciudad de Antofagasta, en tres condiciones de cultivo, en agua dulce (MCH-0), una mezcla de agua dulce y agua de mar en una proporción 50:50 (MCH-50:50) y en agua de mar natural (MCH-SW, del inglés Sea Water). Además se utilizó una microalga previamente adaptada en agua de mar que se denominó MCH-35. Para este estudio se realizó una observación de los cultivos, tanto en condiciones interiores como exteriores.

Se tomaron muestras a distintos días de cultivo. En la Figura 3A y 3B, se observa que las microalgas lograron división celular, mayor en condiciones exteriores, ya que se observa una mayor coloración del caldo de cultivo. En la Figura 3C y 3D se observa el crecimiento de la microalga en las distintas concentraciones de salinidad a distintos días de cultivo, condiciones al interior y al exterior respectivamente. Durante el ensayo se observa a lo largo del tiempo que los cultivos que poseen diferentes coloraciones dependiendo de la condición a la cual se encuentran sometidas, lo que nos indicaría que se están generando diferentes compuestos para adaptarse.

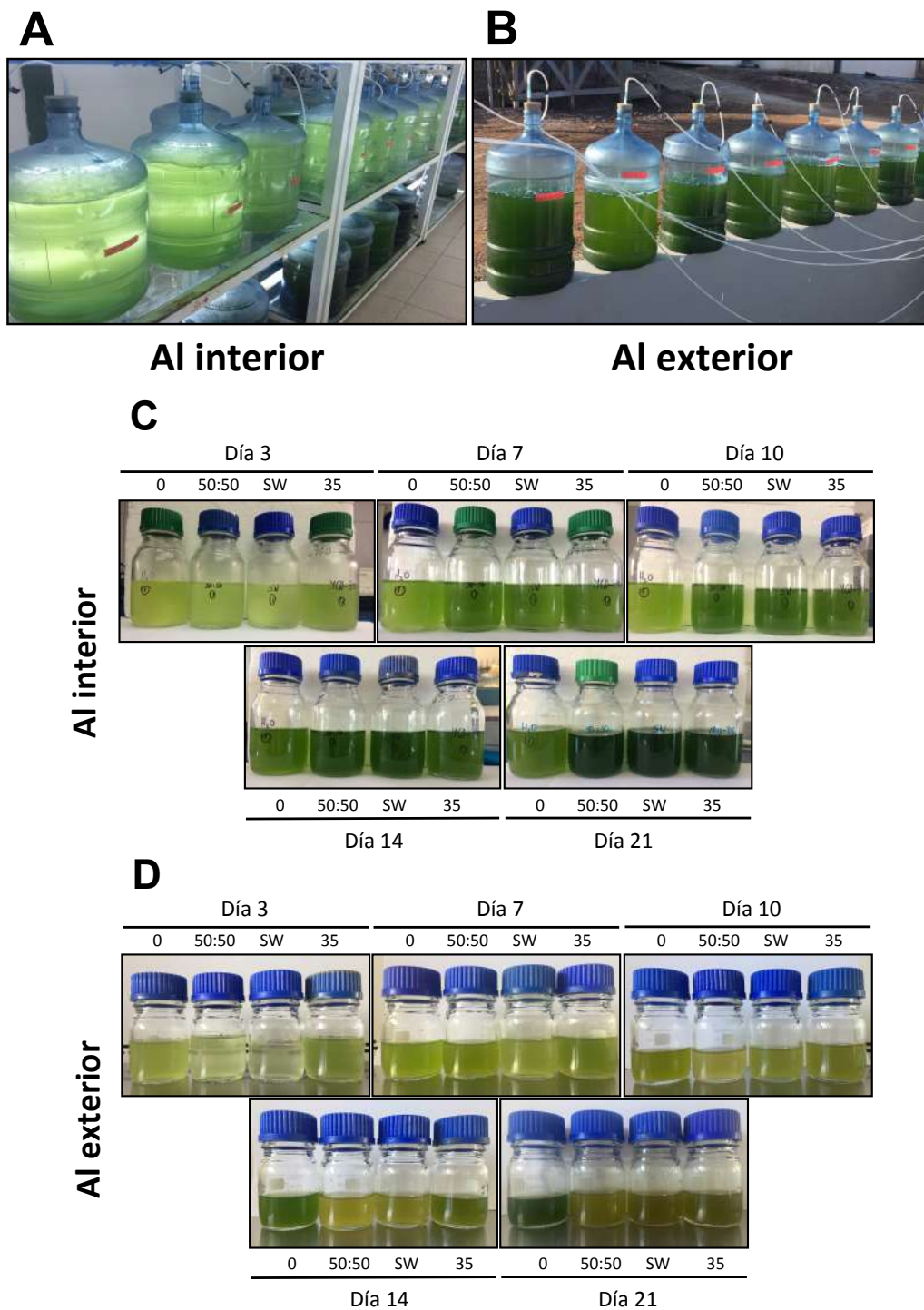


Figura 3: Bidones de crecimiento de microalgas A) al interior y B) al exterior, C) toma de muestra de crecimiento a distintos días de cultivo al interior y D) al exterior.

La microalga cambia su morfología al exponerse a mayores niveles de salinidad, ésta aumenta su tamaño y peso celular, además de tomar una forma circular, lo que se muestra en la Figura 4, donde se evidencia las diferencias de tamaño de la microalga dependiendo de la salinidad del medio de cultivo que se encuentre, MCH-0 posee un diámetro aproximado de 0,010 mm y un peso celular de  $0,1 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ , tamaño superado por MCH-SW que puede llegar a medir 0,019 mm de diámetro llegando a un peso celular de  $0,4 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ .

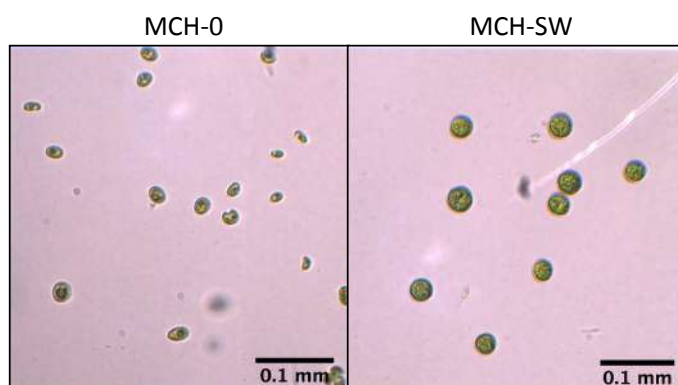
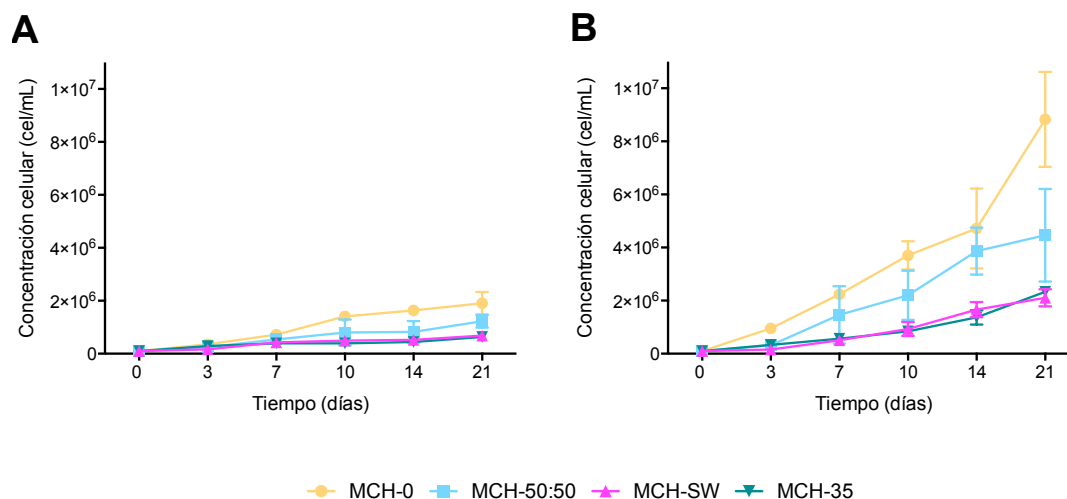


Figura 4: Cepa clorófito MCH *Muriellopsis* sp., en agua dulce (MCH-0) y agua de mar (MCH-SW).

## 4.2 Seguimiento de los cultivos

### 4.2.1 Concentración celular

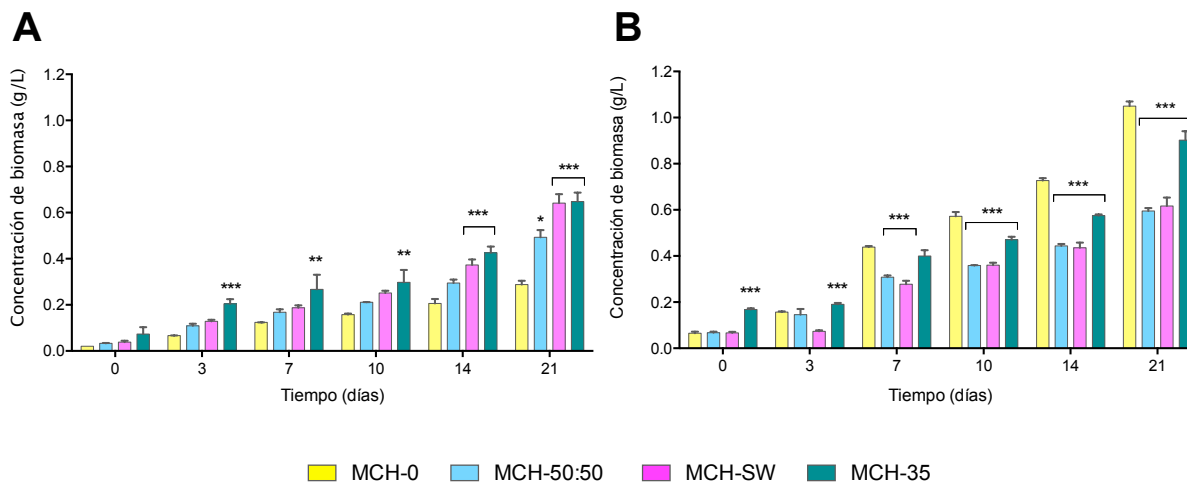
La concentración celular de la microalga a lo largo del cultivo analizado (Figura 5). Se observa un mayor número de células MCH-0 en ambas condiciones de cultivo a los 21 días, con  $2\cdot 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  en cultivos al interior y  $9\cdot 10^6 \text{ ce}\cdot\text{mL}^{-1}$  en cultivos al exterior. Por otro lado el menor recuento lo presentó MCH-SW y MCH-35, en ambos casos, no superando los  $5\cdot 10^5 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  a los 21 días de cultivo en el caso del cultivo al interior y  $2\cdot 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  en cultivo al exterior.



**Figura 5** Concentración celular de MCH *Muriellopsis* sp., en los distintos días de cultivo. A) al interior y B) al exterior en sistemas de cultivos de 20 L.

#### 4.2.2 Concentración de biomasa

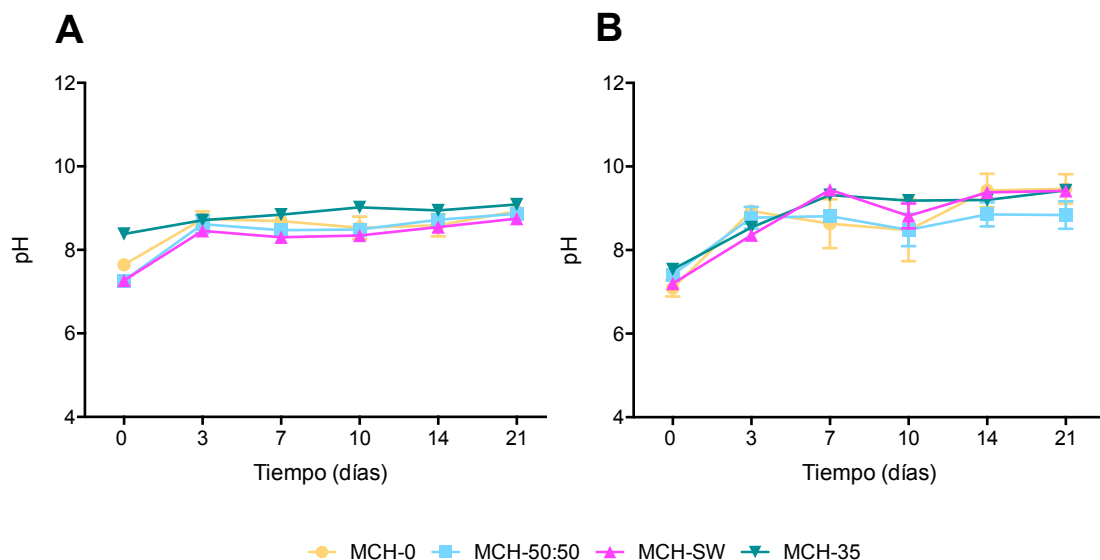
Se determinó el peso seco, con el fin de cuantificar la biomasa generada por la microalga a lo largo de los días de cultivo. En la Figura 6, el cultivo en el que se observan diferencias significativas fue la cepa MCH-35, en condiciones interiores, los días 3 al 14, generando una concentración de biomasa final sobre los  $0,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  a los 21 días de cultivo, lo que concuerda con la coloración del medio de cultivo mostrado anteriormente en la Figura 3C. Por otro parte, en sistemas al exterior, los valores más altos los obtuvo MCH-0 fue la que condición con mayor concentración de biomasa, llegando sobre  $1,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  a los 21 días de cultivo, luego le sigue MCH-35 con una concentración sobre los  $0,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .



**Figura 6** Concentración de biomasa ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de MCH *Muriellopsis* sp., A) cultivos al interior y B) al exterior.

### 4.2.3 pH

En cuanto al monitoreo el pH, se puede observar que los cultivos mantienen sus pH en un rango de 7,00 y 9,00 (Figura 7A) en el caso del sistema al interior, en cultivo al exterior el rango de pH varia entre 7,00 y 10,00 (Figura 7B). Los valores de pH aumentan gradualmente, esto se debe a que el proceso fotosintético de fijación de  $\text{CO}_2$  provoca un aumento del pH.

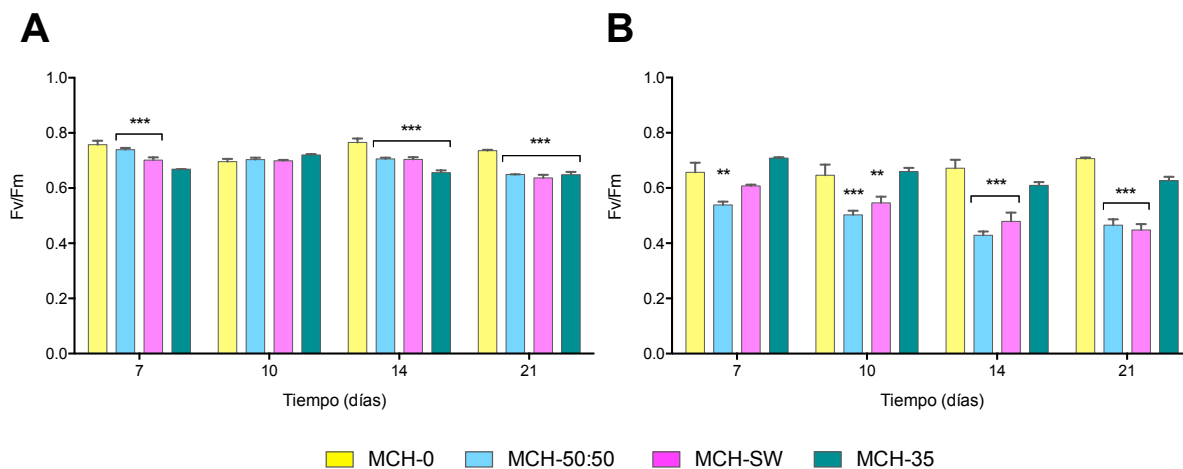


**Figura 7: Variación de pH en los distintos cultivos a lo largo de los días. A) al interior y B) al exterior.**

#### 4.2.4 Eficiencia cuántica máxima, Fv/Fm

En la Figura 8A se observan los valores de eficiencia fotosintética en los distintos días de cultivo al interior, todos poseen valores dentro del rango esperado: 0,6 – 0,8. En cuanto a los cultivos al exterior, estos presentan más variaciones de Fv/Fm, y están en un rango 0,5 – 0,8, los valores más bajos los presentan las condiciones MCH-50:50 y MCH-SW, lo que indicaría que son las condiciones en que las microalgas están presentando un claro estrés.





**Figura 8** Valores de la eficiencia fotosintética de MCH *Muriellopsis* sp., A) al interior y B) al exterior ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.2.5 Disipación No Fotoquímica, NPQ

En condiciones normales, la fotosíntesis predomina sobre los otros procesos metabólicos, pero en condiciones de estrés, la microalga no puede trabajar a pleno rendimiento y el exceso de energía debe disiparse. Como consecuencia, los procesos no fotoquímicos aumentan (“quenching no fotoquímico”, NPQ). Estos procesos están relacionados con la disipación de calor, y su escala varía desde 0 hasta el infinito. El NPQ tiene varios componentes, pero el más importante es el denominado qN (coeficiente del quenching no fotoquímico). Este parámetro varía en una escala desde 0 a 1 y está relacionado con la disipación de calor mediante el ciclo de los carotenoides. NPQ y qN son indicadores de estrés y han demostrado ser parámetros muy sensibles para la detección temprana de condiciones de estrés mediante imagen de fluorescencia<sup>57</sup>. En la Figura 9A, se observa que a los 7 días de cultivo al interior MCH no muestra grandes cambios al ir aumentando los pulsos de Radiación

Fotosintéticamente Activa (PAR), que se mide en  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , si se observan indicios de estrés al día 14 y 21 (Figura 9E, G), donde MCH-SW dispara sus valores hasta 1,5. En cuanto a los valores de NPQ en los cultivos al exterior, estos presentan una escala distinta que tienden a ser más elevados. Al día 7 de cultivo (Figura 9B) se observa un estrés en MCH-35 ya que sus valores superan los 4 a los  $845 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Se debe tener en cuenta que en condiciones al exterior los valores de PAR pueden superar los  $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , esta tendencia se mantiene por el resto del cultivo. Siendo MCH-0 que tuvo los valores más bajos, demostrando que su nivel de estrés no es tan alto en comparación con las otras concentraciones de salinidad.

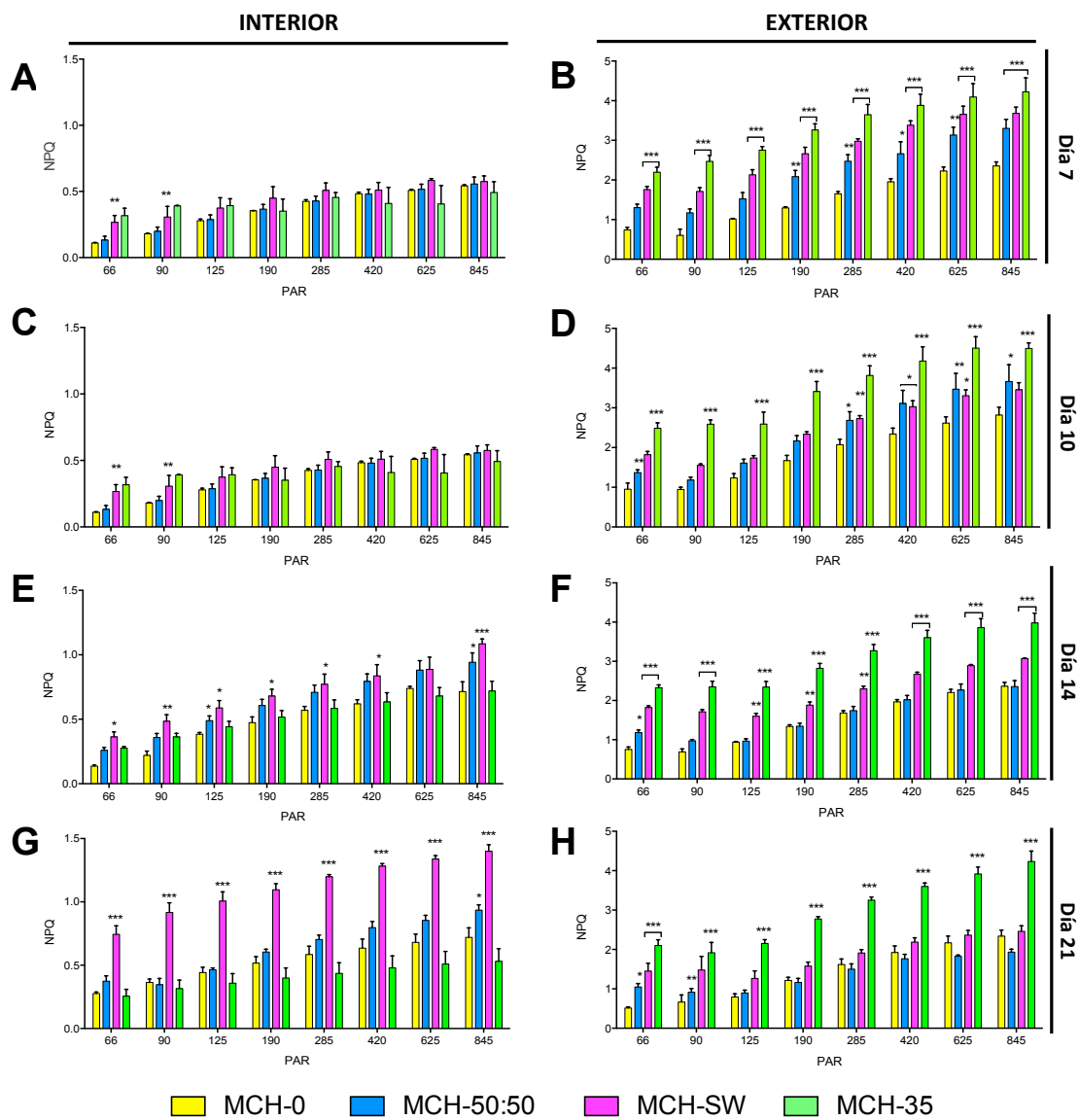


Figura 9 Análisis de Disipación no fotoquímica (NPQ) de MCH *Muriellopsis sp.* A), C), E), G) al interior, y B), D) F) H) al exterior, días 7, 10, 14 y 21 respectivamente.

## **4.2.6 Viabilidad celular y estrés oxidativo**

### **4.2.6.1 Viabilidad celular**

Para determinar la viabilidad celular de las microalgas expuestas a diversas condiciones de estrés, en este caso, variaciones de salinidad e irradiancia, se evaluaron mediante citometría de flujo, con el marcador fluorescente Yoduro de Propidio (PI), el cual ingresa a la célula cuando ésta muere. Para este procedimiento se analizaron los cultivos MCH-0, MCH-SW y MCH-35, a los días de cultivo 0, 7, 14 y 21 en condiciones al exterior. En la Figura 10 se observan las microalgas en las distintas condiciones de cultivo. Podemos observar un control de la microalga sin tinción, bajo los parámetros Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) donde se selecciona la población de células que se analizaron. Un control positivo para la tinción, donde se observan todas las células desplazadas hacia en el cuadrante inferior derecho (células muertas). Finalmente las microalgas bajo distintas condiciones de cultivo (MCH-0, MCH-SW y MCH-35), se observa que la población microalgal se ubica entre los cuadrantes inferiores tanto derecho (muertas) como izquierdo (vivas). Otra forma de analizar las células vivas o muertas es a través de un gráfico de barras (Figura 11). Al inicio del cultivo se tiene un 95% de células vivas en las 3 condiciones de cultivo (MCH-0, MCH-SW y MCH-35) (Figura 10A, 11). Transcurrido 7 días de cultivo, se evidencia un leve aumento de mortalidad llegando al 20% en MCH-0 (Figura 10B, 11), a los 14 días de cultivo la mortalidad se mantiene en las 3 condiciones de cultivo (Figura 10C, 11). Finalmente al día 21, MCH-0 se recupera llegando solo al 10% de mortalidad. En cuanto a MCH-SW y MCH-35 aumenta la mortalidad celular llegando al 20% (Figura 10D, 11). Entonces se puede deducir que los porcentajes de mortalidad más altos se obtuvieron en MCH-0 al día 7 y MCH-SW al día 21.

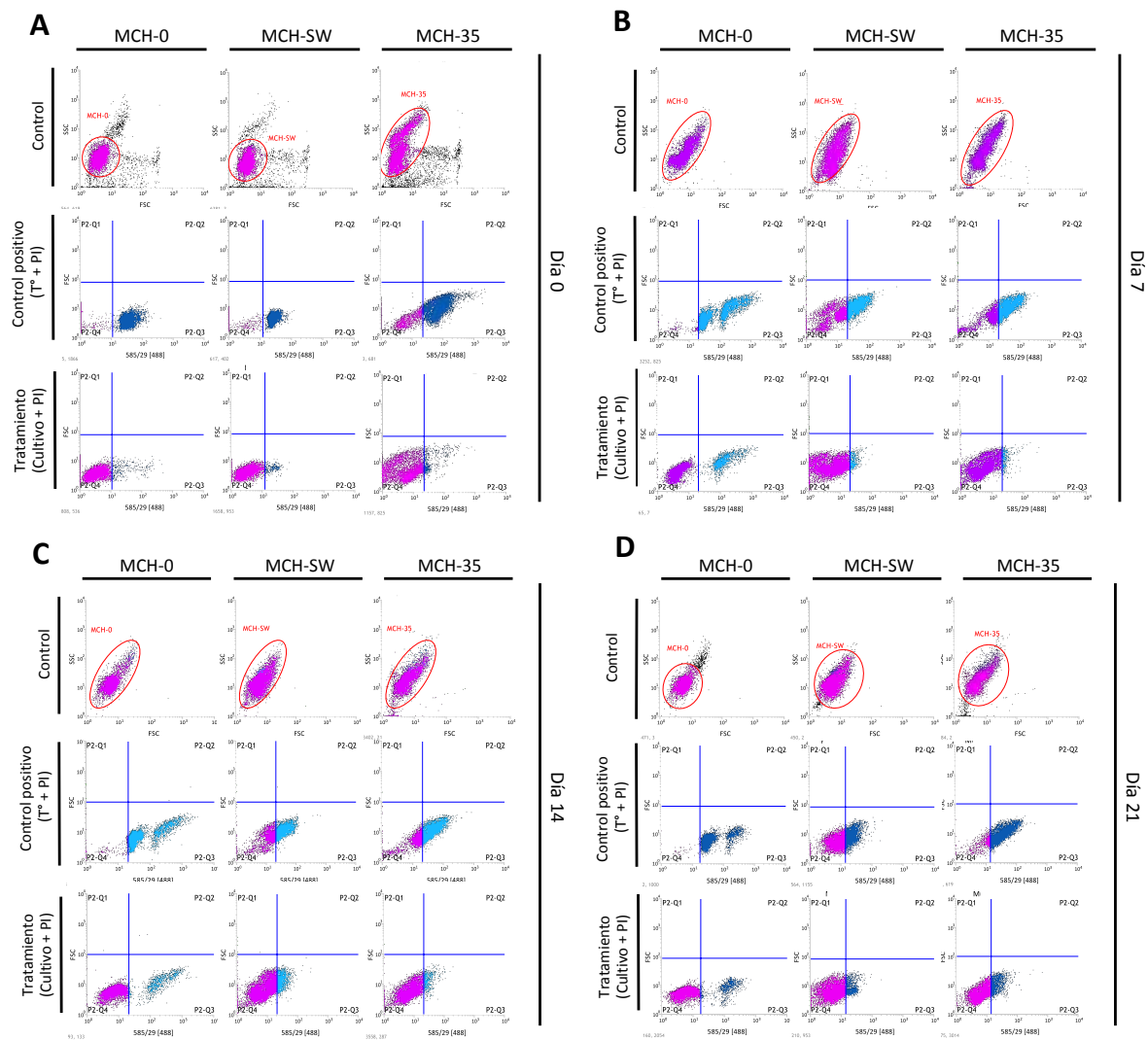
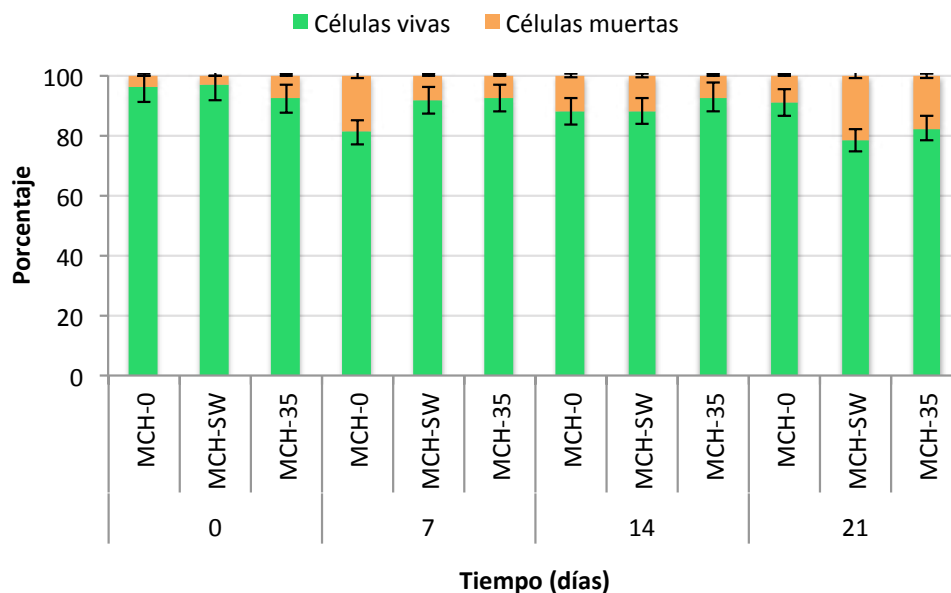


Figura 10 Citometría de Flujo de MCH *Muriellopsis* sp. a distintos días de cultivo para determinar viabilidad celular en condiciones al exterior. A) comienzo de la curva, día 0, B) día 7 C) día 14 y D) día 21.



**Figura 11** Análisis de porcentaje de viabilidad celular de MCH *Muriellopsis* sp., por medio de Citometría de Flujo en distintas condiciones de cultivos MCH-0, MCH-SW y MCH-35 a los días 0, 7 14 y 21 en condiciones al exterior.

Además, se realizó un análisis mediante microscopia confocal. En la Figura 12 se observa el control positivo que son las microalgas muertas, expuestas a temperatura y teñidas con Yoduro de Propidio que emiten fluorescencia de color rojo, al ser excitado por el láser azul (488 nm). Por otra parte, el tratamiento evidencia la viabilidad celular que posee el cultivo, debido que se tiñen de color rojo las células que están muertas, aquí se puede observar la interacción de células vivas con muertas en el mismo plano.

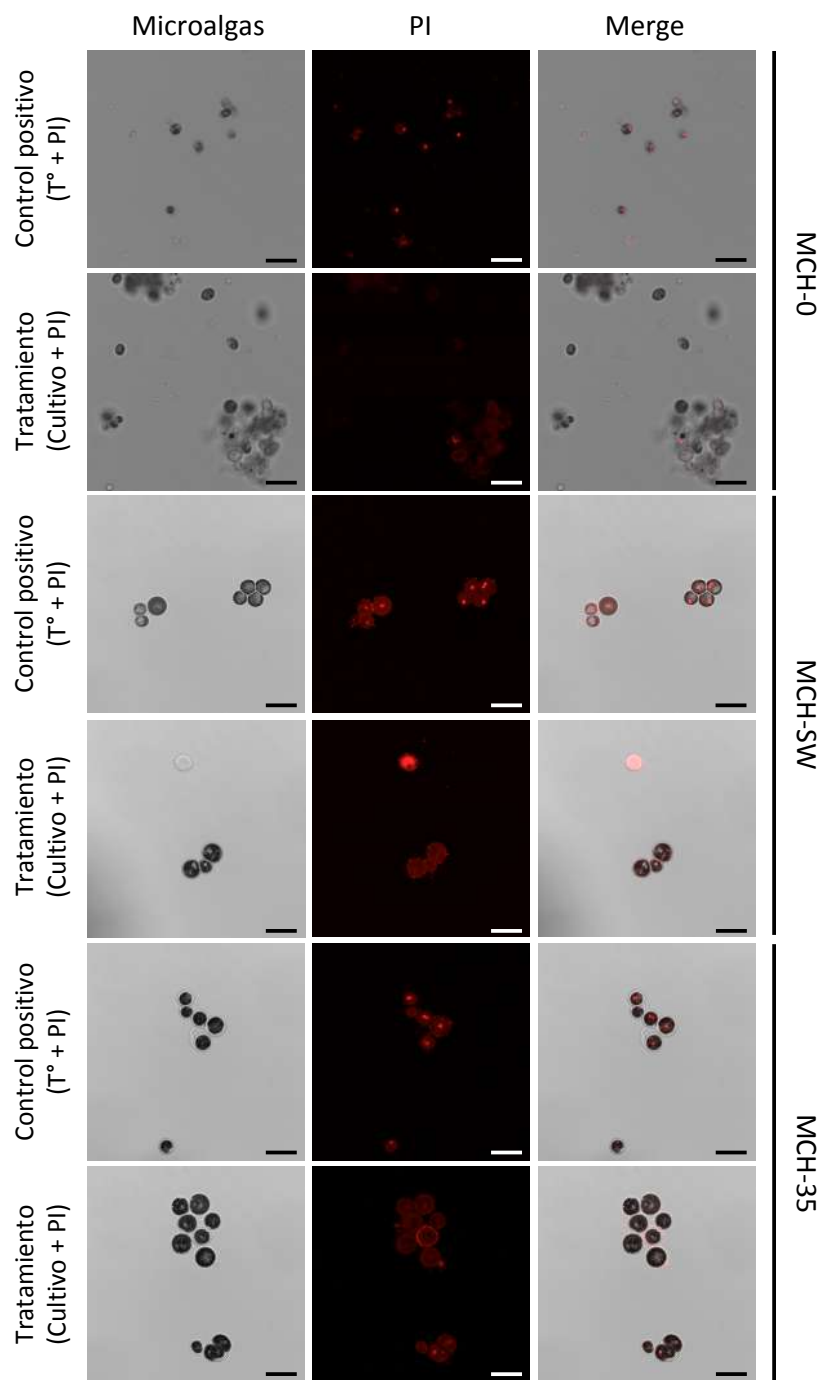


Figura 12 Microscopía confocal para determinar viabilidad y morfología celular de MCH *Muriellopsis* sp., MCH-0, MCH-SW y MCH-35 en condiciones al exterior. (Barra de escala: 25  $\mu$ m). T°: temperatura, PI: yoduro de propidio, Merge: superposición de imágenes.

#### 4.2.6.2 Estrés oxidativo

Para evidenciar la integridad celular, se identificó la presencia de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) para así poder identificar estrés celular con la tinción Dihydroethidium (DHE). En la Figura 13 se observa la presencia de ROS en los cultivos MCH-0, MCH-SW y MCH-35, donde el control sin tinción bajo los parámetros Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) se utiliza para determinar la población que se analizará, que se encuentra demarcada en un círculo de color rojo. En el control positivo se observa que la microalga se ubica espacialmente en el cuadrante inferior derecho de cada gráfica, indicando la población productora de ROS. Y finalmente el tratamiento, donde las microalgas están ubicadas espacialmente en ambos cuadrantes inferiores, tanto las generadora de ROS (derecho) como no generadora de ROS (izquierdo), por lo tanto, se puede analizar el tratamiento en que la microalga producirá más ROS. Para evidenciar mejor estos datos se realizó un gráfico con los valores entregados mediante citometría para exterior. Se debe tener en cuenta que se tomó como 100% el control positivo y con respecto a esto se realizan los análisis de porcentajes. En la Figura 14 se observa que al día 0 (Figura 13A, 14), los cultivos poseen un bajo porcentaje de ROS, lo que indica que están en buenas condiciones al comienzo, a los 7 días de cultivo se observa un alza de la producción de ROS, que llega al 10%, 30% y 40%, en MCH-0, MCH-SW y MCH-35, respectivamente (Figura 13B, 14). Al día 14 MCH-0 y MCH-SW mantienen sus valores, pero MCH-35 aumenta aún más, superando el 50% de producción (Figura 13C, 14). Finalmente el último día de cultivo MCH-0, sigue constante, MCH-SW incrementa sus valores llegando al 50% y MCH-35 supera el 70% de producción de ROS, siendo la condición de cultivo más afectada según indica este análisis (Figura 13D, 14).



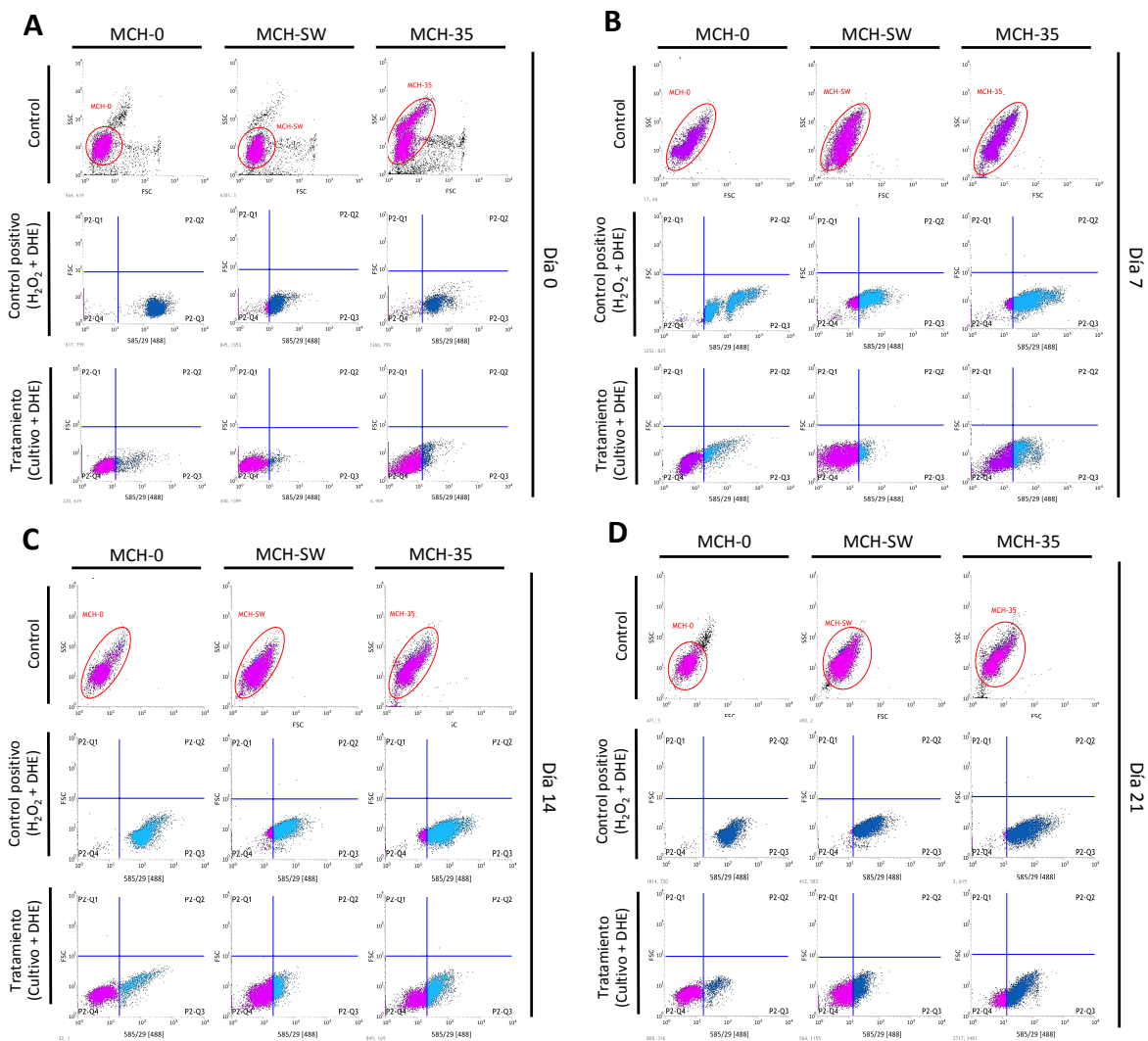
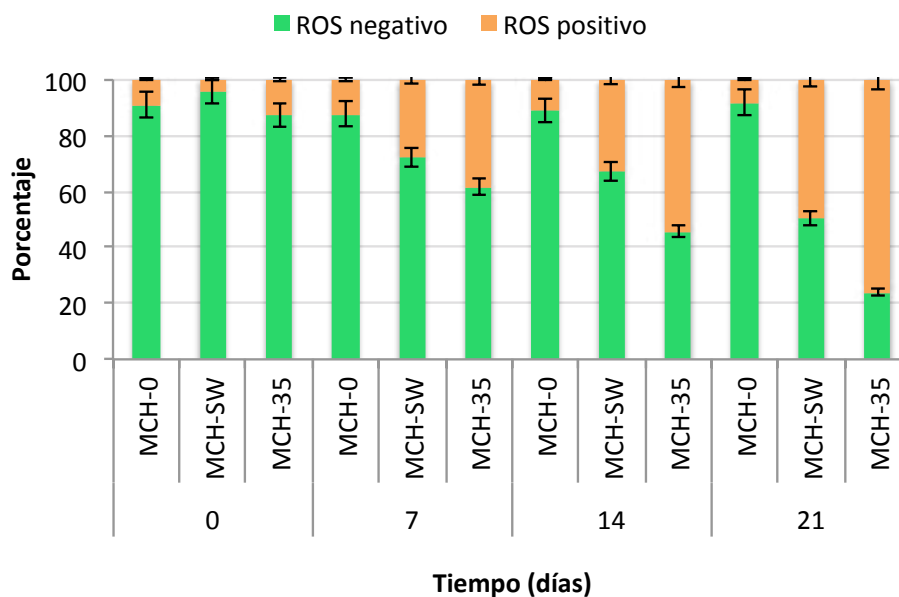


Figura 13 Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en MCH *Muriellopsis* sp., por Citometría de Flujo. A) comienzo de la curva, día 0, B) día 7, C) día 14 y D) día 21.



**Figura 14** Análisis del porcentaje de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la microalga *MCH Muriellopsis sp.*, por medio de Citometría de Flujo en distintas condiciones de cultivo. MCH-0, MCH-SW y MCH-35 a los días 0, 7 14 y 21 en condiciones al exterior.

En la Figura 15, se muestran las células teñidas y se observa que la microalga produjo especies reactivas de oxígeno al ser expuesta a los distintos condiciones de cultivo e irradiancia, emitiendo fluorescencia de color rojo cuando son excitados con el láser 488 nm. Se observa el control positivo, en el cual las células fueron expuestas a  $H_2O_2$  con el fin de inducir ROS en el cultivo, por lo que se encuentran las células en su totalidad teñidas. También se tiene el tratamiento que es la microalga directamente desde el medio de cultivo, por lo tanto, indica los valores de producción de ROS en cada uno de los cultivos. Al igual que en el análisis anterior, se puede observar conjuntamente células productoras de ROS y células que no lo producen. En conjunto con los análisis de citometría se pudo determinar que MCH-35 es el cultivo que produce mayor porcentaje de ROS en comparación con los otros cultivos, lo cual significa que se encuentra más estresada en comparación con las otras concentraciones de salinidad.

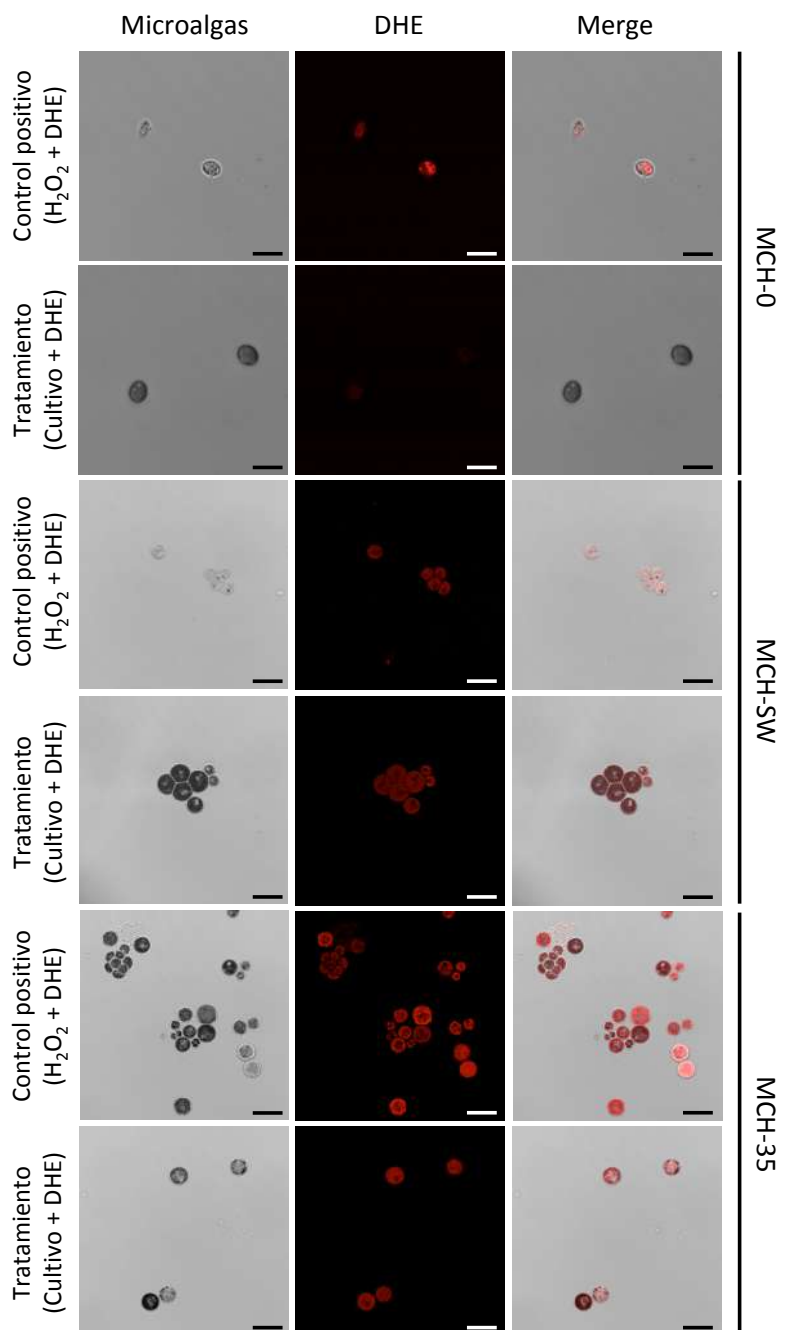


Figura 15 Microscopía confocal para determinar estrés oxidativo y morfología celular de MCH *Muriellopsis* sp., MCH-0, MCH-SW y MCH-35 en condiciones al exterior. (Barra de escala: 25  $\mu$ m). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de oxígeno, DHE: Dihydroethidium, Merge: superposición de imágenes.

### 4.3 Análisis de la composición de la biomasa

#### 4.3.1 Extracción de carotenoides

Para identificar actividad antioxidante en las diferentes condiciones de cultivos analizadas, el primer paso fue realizar una extracción de carotenoides totales y posteriormente luteína.

Los resultados obtenidos fueron para los tratamientos de condiciones de interior (Figura 16A), el valor más alto se obtuvo en el tratamiento MCH-50:50 llegando hasta 0,55 % de luteína al día 7. Al día 10, el valor significativo más alto fue de MCH-SW con 0,43 %. En los días 14 y 21 se observa un descenso llegando sólo al 0,1 % en los 4 tratamientos. En el sistema de exterior, los porcentaje de luteína fueron más bajos comparados con el sistema de interior. Al inicio del cultivo, el valor más alto se obtuvo MCH-35 con 0,20 % de luteína (Figura 16B), luego se mantienen bajo el 0,1 % a lo largo del cultivo, teniendo un aumento el día 14, produciendo 0,28 % por la cepa MCH-35. A los 21 días de cultivo el mayor valor se obtuvo en el tratamiento MCH-0 con 0,34 %, siendo el porcentaje más alto a lo largo del cultivo de exterior, no superando en ningún momento el cultivo en condiciones interiores.

Ahora, si se relaciona la biomasa con el porcentaje de luteína, se obtiene la productividad de luteína que genera la microalga por día. En los cultivos al interior (Figura 16C) se observa que al tercer día el valor más significativo lo presenta MCH-SW con una productividad de  $0,16 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . A la semana de cultivo MCH-50:50 se mantiene en 0,11. Durante todos los días de cultivos, el tratamiento MCH-SW fue el que obtuvo una mayor productividad en condiciones interiores. En condiciones de cultivo al exterior (Figura 16D), la mayor productividad de luteína, se alcanzó en MCH-0 con un 0,17 al día 21, luego le sigue MCH-35 con 0,09, a los 14 días de cultivo, observándose un aumento de productividad en el transcurso del cultivo, siendo una característica única para el tratamiento MCH-0.

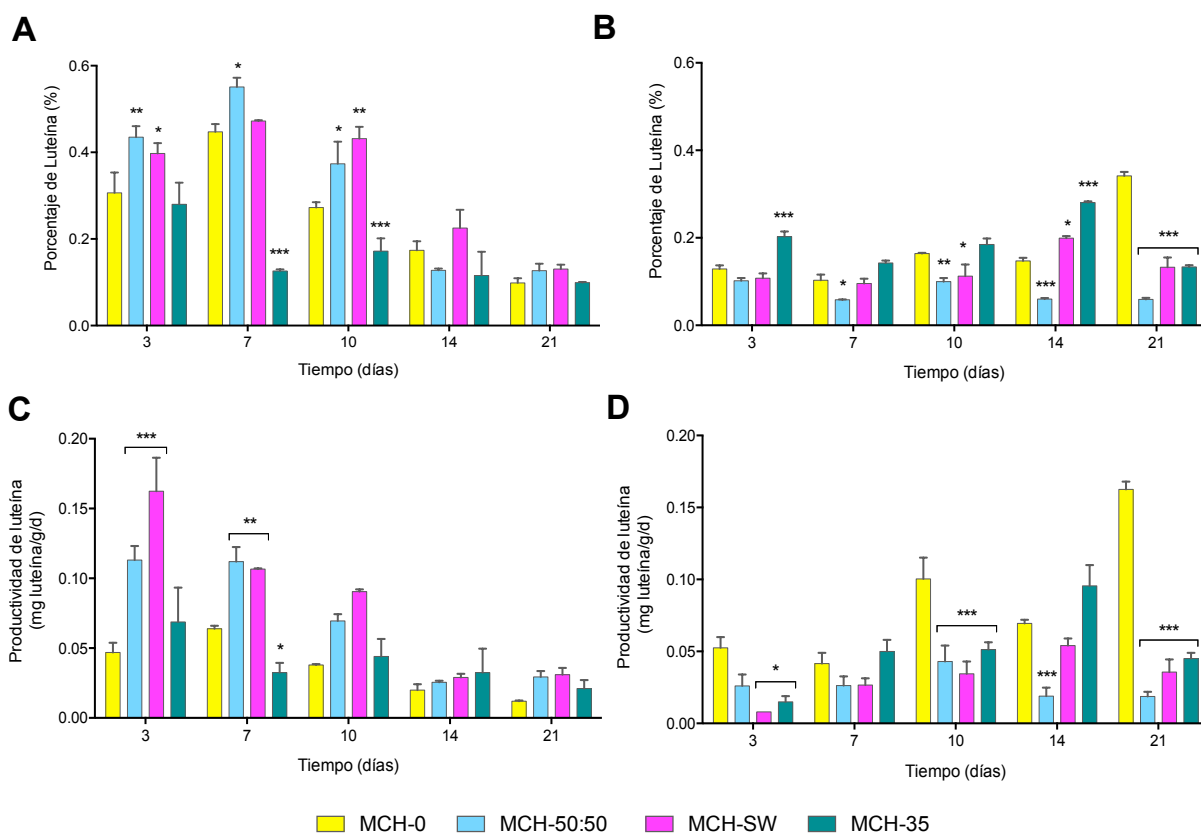
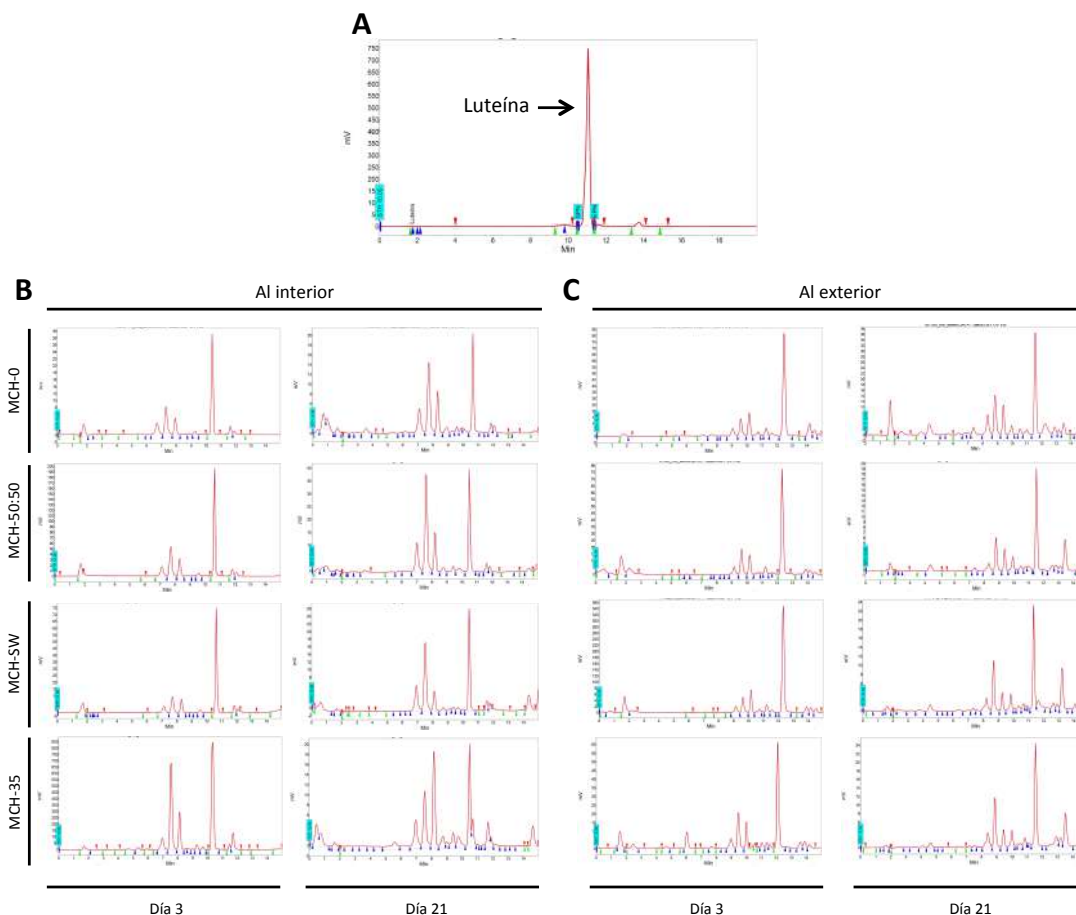


Figura 16 Porcentaje de luteína de *MCH Muriellopsis sp.* A) al interior y B) exterior y productividad de luteína C) al interior y D) exterior ( $p \leq 0,05$ ).

### 4.3.2 Análisis por HPLC

Al analizar el extracto microalgal por una columna de HPLC, se observa un peak entre el minuto 10 y 12 de retención (Figura 17), mismo peak que se observa en el estándar de luteína utilizado como control y para realizar la curva de calibrado (Figura 17A). Este patrón se repite en las 4 concentraciones de salinidad y en ambas condiciones de cultivo, al interior y exterior, con variaciones con respecto al área del peak solamente, también existen otros peak con menor área, los cuales aumentan al final del cultivo y con mayor presencia en los cultivos al

interior, estos peak se deben analizar posteriormente con más patrones para determinar a que tipo de carotenoides corresponden. Estos cromatogramas indican que la composición de carotenoides varía al estar la microalga expuesta a distintos tipos de estrés.



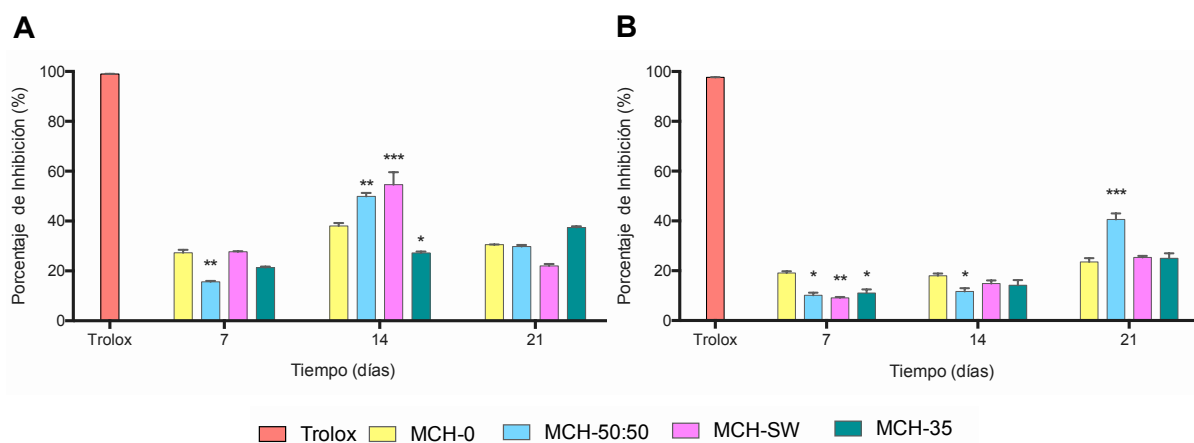
**Figura 17** Cromatograma de extractos microalgales. A) estándar de luteína B) extractos microalgales cultivos al interior y C) exterior, ambos en las 4 condiciones para los días 3 y 21.

#### 4.4 Actividad antioxidante

##### 4.4.1 Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

La determinación de la capacidad antioxidante de la cepa clorófitas MCH *Muriellopsis* sp., fue realizada por medio del método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH); este método mide la inhibición de radicales libres (a mayor porcentaje de inhibición, mayor actividad antioxidante presenta la muestra). Se utiliza como control positivo Trolox que es un análogo de la vitamina E. Este reactivo se utiliza como referencia para la medición, capacidad antioxidante equivalentes al Trolox (TEAC), que tiene como medida unidades equivalente de Trolox (TE), por lo que los resultados obtenidos se comparan con este compuesto. En la Figura 18A, se puede observar la actividad antioxidante de la microalga en las distintas concentraciones de salinidad y condiciones de cultivo a distintos días. Se utilizó una concentración de Trolox de  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , que superó el 98% de inhibición, en cuanto a los cultivos la concentración fue la misma. En condiciones al interior, los valores más altos de actividad antioxidante fueron obtenidos al día 14, por MCH-SW con 54%, le sigue MCH-50:50 con 49%.

Ahora si se analiza el cultivo en condiciones al exterior (Figura 18B), este posee valores más bajos en comparación con los cultivos al interior, la actividad antioxidante más alta se produjo al día 21 de cultivo, donde MCH-50:50 posee el porcentaje de inhibición de radicales significativamente más alto que los demás llegando a un 40%. Luego le siguen las demás concentraciones de salinidad con una inhibición sobre 25%.

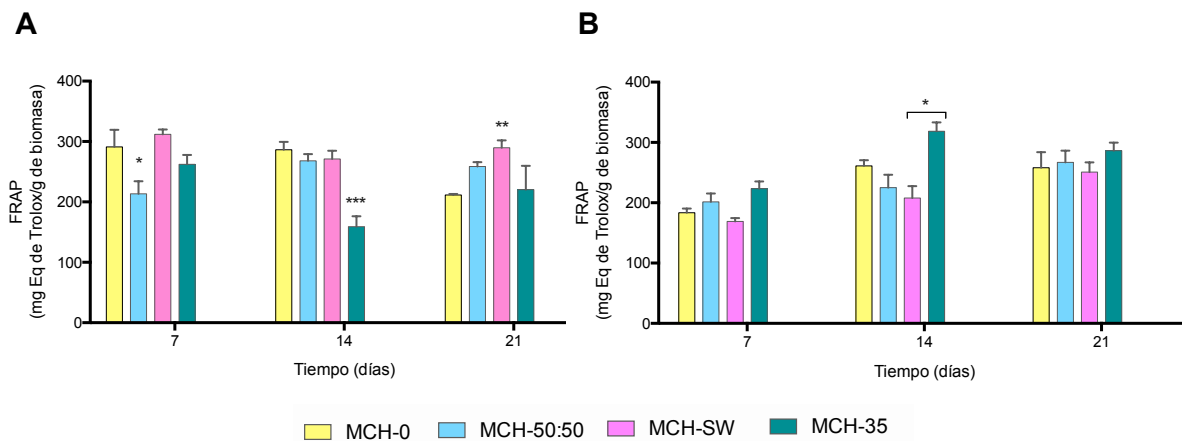


**Figura 18** Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de luteína de la microalga *MCH Muriellopsis* sp. con el método de DPPH. A) Al interior, B) Al exterior, ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4.2 Ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Para la medición de reducción del ion férrico, en primer lugar se realizó una curva con Trolox, con la cual se comparan los valores obtenidos, y se expresan los resultados en miligramos equivalentes de Trolox por gramo de muestra. Se observa en la Figura 19A al día 7 en condiciones al interior, MCH-50:50 posee diferencias significativas, con  $213 \text{ mg Eq Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$  siendo el más bajo de ese día en comparación a las otras concentraciones de salinidad, al día 14 el resultado que presenta diferencias es MCH-35 con  $158 \text{ mg Eq Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$ , valor más bajo de actividad antioxidante en condiciones al interior. Por otro lado, la mayor reducción de ion férrico lo obtuvo MCH-SW con  $311 \text{ mg Eq Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$  al día 7 de cultivo. En cuanto a las condiciones al exterior (Figura 19B), presenta solo una diferencia significativa al día 14 con  $318 \text{ mg Eq Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$ , valor más alto de todo el experimento, luego le sigue MCH-0 con  $261 \text{ mg Eq Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$ .





**Figura 19** Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de luteína de la microalga *MCH Muriellopsis* sp. con el método de FRAP. A) Al interior, B) Al exterior, ( $p \leq 0,05$ ).

## 5. DISCUSIÓN

Las microalgas son los organismos autótrofos con crecimiento más rápido sobre el planeta Tierra, y solo requiere de luz solar, CO<sub>2</sub>, sales y agua. Estos organismos son capaces de producir variados productos de forma natural, entre los que se incluyen proteínas, enzimas, ácidos grasos, carbohidratos, vitaminas y pigmentos (Blanco y cols., 2007). Entre los que encontramos a los carotenoides, que son una clase de pigmentos liposolubles que pueden ser sintetizados por otros organismos como bacterias fotosintéticas, plantas y algas (Varela y cols., 2015; Faraloni & Torzillo, 2017).

Los pigmentos están relacionados con la fotosíntesis y funcionan como complejos captadores de luz o como fotoprotectores, es decir reduciendo el efecto dañado por exceso de radiación. Las microalgas al estar expuestas a situaciones de estrés, generan un sistema de protección contra especies reactivas de oxígeno (ROS) para ello producen altas cantidades de sustancias tales como: compuestos fenólicos, ácidos grasos poliinsaturados y carotenoides antioxidantes que contrarrestan los efectos del daño causado por un exceso de luz y protegen a las células del daño oxidativo (Faraloni & Torzillo, 2017).

Se ha propuesto a las microalgas como fuente de luteína, por su rápida producción y entre los ejemplares estudiados están *Chlorella zofingensis* o *Chlorella protothecoides* y *Muriellopsis* sp. Ésta última es la misma cepa que fue estudiada en este trabajo (Sánchez y cols., 2008).

Lo primero fue buscar antecedentes sobre esta cepa dulceacuícola y si había sido cultivada en condiciones de alta salinidad, con esto se sabía que la microalga toleraba la salinidad (Blanco y cols., 2007) por lo que se decidió cultivar en 3 condiciones distintas, MCH-0 en agua dulce, MCH-50:50 agua dulce y de mar

(en proporción 50:50 v/v) y MCH-SW en agua de mar, además se agregó al estudio otra cepa MCH-35, previamente adaptada al agua de mar y se realizaron cultivos al interior y exterior. En ambas condiciones hubo un crecimiento exponencial de MCH-0, lo que concuerda con su naturaleza dulceacuícola, luego le sigue MCH-50:50 y finalmente MCH-SW y MCH-35 presentan un crecimiento mucho más lento pero también de manera exponencial. La concentración de biomasa en las microalgas cultivadas al interior los valores más altos se obtuvieron en los tratamientos MCH-SW y MCH-35 superando los  $0,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a los 21 días de cultivo, por otro lado, en el cultivo al exterior, los valores más altos los presentó MCH-0 con  $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y luego le sigue MCH-35 con  $0,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . La poca relación que existe entre el recuento celular con la biomasa puede deberse a que la microalga al encontrarse en un medio con mayor salinidad esta modifica su forma y tamaño, se vuelve más grande y con forma redonda, lo que se podría explicar por un proceso de homeostasis interna, incrementando algunos componentes, ya sea carotenoides, lípidos o proteínas, aumentando así su volumen citoplasmático y tamaño celular (Cobos Ruiz y cols., 2016; Hitchcock, 1982). Si comparamos los pesos celulares MCH-SW tiene una biomasa 4 veces mayor que MCH-0 y su tamaño es el doble. Además esto explicaría el cambio de coloración de los cultivos que se vuelve verde más intenso a medida que pasan los días.

Al momento de monitorear el pH, se observa un alza en ambas condiciones del cultivo tanto al interior como al exterior, esto se debe a la captación de nutrientes que esta ocurriendo y a la fijación de  $\text{CO}_2$  mediante fotosíntesis. Mientras más alcalinos sean los valores mayor actividad fotosintética. La explicación química a este proceso se debe en gran parte al consumo de iones de  $\text{HCO}_3^-$ , al disociarse proporciona el  $\text{CO}_2$  necesario para el crecimiento de la microalga y a su vez ocurre una acumulación de  $\text{OH}^-$  que será responsable de aumentar gradualmente el pH. Por otra parte, el pH mantiene influencia sobre una

gran cantidad de procesos bioquímicos asociados al crecimiento y el metabolismo de las microalgas, incluyendo la ionización de metabolitos, solubilidad, además de la biodisponibilidad de CO<sub>2</sub> y nutrientes (Beltrán-Rocha y cols., 2017).

La eficiencia fotosintética es una medición que indica el flujo de electrones no-cíclicos a través del fotosistema II (PSII) durante la fotosíntesis. En condiciones normales los valores oscilan entre 0,5 – 0,8, rango en el que se encuentran los resultados obtenidos en los cultivos al interior, lo que indicaría que esta funcionando correctamente la maquinaria fotosintética, que si bien esta sometido a estrés, este no afecta el PSII de la microalga. Por otro lado, los cultivos al exterior mostraron cambios importantes, los cultivos MCH-50:50 y MCH-SW fueron los más afectados, obteniéndose valores entre 0,4 y 0,5; esta disminución se puede deber a que los cultivos están en proceso de adaptación lo que podría estar provocando una pérdida gradual de los centros de reacción de P<sub>680</sub> (Lee y cols., 2018; Pinilla, 2006).

La fotosíntesis es proceso primordial para plantas, algas, microalgas y algunas bacterias ya que proporciona la energía que estos necesitan para vivir. Pero también ocurre un efecto adverso cuando hay exceso de luz, ya que se excede la capacidad fotosintética, provocando daños a nivel celular, específicamente en los centros de reacción del PSII. Este punto es importante, ya que los organismos han debido evolucionar generando mecanismos de protección contra estos daños, entre estos mecanismos están: minimizar la absorción de luz, eliminar ROS generadas o bien disipar el exceso de energía lumínica en forma de calor. Y aquí es donde entra el concepto de NPQ, que significa Disipación No Fotoquímica o No-Photochemical Quenching, el cual es un indicador del grado de fotoprotección, generalmente se refiere tanto a procesos de protección como a daños donde se activa el ciclo de las xantofilas, por el cual la luz excesiva se disipa como calor para evitar impactos negativos en la cadena de electrones o

fotoinhibición a nivel molecular (Lambrev y cols., 2012; Lee y cols., 2018; Malnoë, 2018). Según los resultados obtenidos, estos indican que en condición al interior el valor más alto fue de 1 en el cultivo MCH-SW, medida a una irradiancia máxima de  $845 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , cabe mencionar que la irradiancia que están expuestos los cultivos es tan solo  $183,5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . En condiciones al exterior el cultivo donde los valores de NPQ fueron más altos MCH-35 llegando a 4, luego le sigue MCH-SW. Al igual que los cultivos al interior, la medición de máxima irradiancia es a  $845 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , sin embargo las condiciones reales puede llegar a  $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , de igual forma esta dando un indicio que estos cultivos poseen mayor estrés fotoquímico. Y que sus maquinarias de protección están siendo estimuladas para protegerse y sobrevivir.

En la actualidad las microalgas son utilizadas como fuente de productos biotecnológicos. Para obtener mayor cantidad de estos productos se deben optimizar los métodos de producción y acondicionar bien la microalga con la que se esta trabajando. Para tener una mejor visión del estado en que se encuentran las microalgas se utiliza Citometría de Flujo, este método se utiliza tanto para estudios ambientales como toxicológicos, o bien para analizar el estado fisiológico de la microalga. Los puede clasificar mediante características como fluorescencia o tamaño celular, con o sin tinción fluorescente. Entre los análisis que se realizan en Citometría de Flujo encontramos: análisis de composición química de la biomasa, monitorear actividad enzimática y viabilidad celular. Este último monitoreo tiene gran relevancia al momento de comenzar una investigación y optimizar la producción, ya que son las células vivas las relacionadas con la producción celular y crecimiento, y las muertas pueden afectar estas condiciones positivas de cultivo. Las células al morir reducen su actividad enzimática y se degrada su integridad celular, es por esta razón que se pueden identificar, ya que los colorantes ingresan a la célula, cuando su pared se encuentra dañada, no lo hacen cuando la célula esta intacta (da Silva y cols., 2009; Hyka, Lickova,y cols.,

2013; Mazalová y cols., 2011; Sato y cols., 2004). Una de las tinciones más utilizada es Yoduro de Propidio (PI), aunque se ha reportado interferencia con la autofluorescencia de la microalga, estudios aseguran que no hay problemas con utilizarlo (Hyka y cols., 2013), esta tinción ingresa a la microalga cuando esta tiene dañada su membrana (da Silva y cols., 2009). En los resultados obtenidos en los cultivos al exterior se observa que existe un bajo porcentaje de células muertas, al comienzo todas están sobre el 90 % de viabilidad, a los 7 días MCH-0 tiene un alza de mortalidad que llega hasta el 20%, luego se recupera, en tanto que al día 21 de cultivo se observa la mayor mortalidad llegando su valor a 25% en MCH-SW. Esto puede deberse a que la microalga esta en proceso de adaptación a la concentración de sal con un estrés adicional que sería la alta irradiancia (da Silva y cols., 2009; Hyka y cols., 2013; Mazalová y cols., 2011; Sato y cols., 2004).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) dan un indicio del estrés oxidativo celular que puede generar la microalga durante condiciones de estrés, ya sea por concentraciones de salinidad, algún químico o por alta intensidad lumínica. ROS son subproductos de metabolismo de oxígeno en cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. En condiciones normales ROS y antioxidantes celulares se encuentran en equilibrio, sin embargo al someter a las células a un estrés biótico o abiótico este desencadena la excesiva producción de ROS. En el caso de las microalgas cuando el estrés es generado por alta irradiancia ésta tenderá a protegerse aumentando la producción de pigmentos antioxidantes. En este estudio se utilizó dihidroetidio (DHE) una tinción que sirve para detectar aniones de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), superóxido ( $O^{2-}$ ) o hidroxilo ( $OH_2$ ) intracelular, estos ingresan a la célula donde se oxida selectivamente por superóxidos, uniéndose al ADN y emitiendo una señal de fluorescencia. En los resultados obtenidos, MCH-35 siempre mostró valores elevados, comenzó con 15% al día 0, luego esto fue incrementando gradualmente hasta llegar sobre el 70% al día 21 de cultivo, esto indica que la cepa esta adaptada o aclimatada a crecer en agua de mar, por lo

cual ya no se produce un estrés en esta condición de cultivo, pero si la alta irradiancia, la alta concentración de oxígeno del cloroplasto garantiza la rápida reoxidación de los radicales en la microalga, que regenera y promueve la formación continua de  $O^{2-}$ , esto explicaría los elevados valores de porcentaje de ROS. Luego le sigue MCH-SW y finalmente MCH-0, valores que no superan el 50% de producción de ROS, esto se relaciona con mecanismos antioxidantes celulares que aún son capaces de abordar la sobreproducción de ROS. Se sabe que la producción de ROS resultante de diversos factores de estrés afecta a casi todos los procesos celulares, por ejemplo la estabilidad estructural de las macromoléculas funcionales, incluido el ADN, las proteínas y los lípidos estructurales. Dado que el ciclo de vida de las algas verdes depende de su actividad fotosintética e integridad celular, es crucial proteger contra el estrés oxidativo (Hyka y cols., 2013; Prado y cols., 2012; Yilancioglu y cols., 2014).

Las microalgas son organismos más productivos que las plantas, en términos de biomasa, debido a que su conversión fotosintética es de 6 a 12 veces más eficiente, además las microalgas tienen la ventaja de poder adaptarse rápidamente a variadas condiciones de cultivo y sistemas de cosecha, por esta razón también es muy fácil manipular sus vías biosintéticas para la producción de bioproductos. En este caso, el producto de interés es la luteína, carotenoide que se obtiene principalmente de plantas, específicamente una flor llamada Marigold (clavel Chino o *Tagetes erecta*). Sin embargo, esta posee algunas desventajas, como el tiempo de cosecha y la baja productividad de luteína, llegando solo al 0,03% de su peso total (D'Alessandro y cols., 2018; Ingkasupart y cols., 2015; Sánchez y cols., 2008).

Cada especie de microalga posee su propia composición de pigmentos, como también la proporción de estos. Al exponer a la microalga a estrés estas características comienzan a cambiar de tal manera que se alcance una

composición y concentración óptima para proteger a la microalga de estrés por condiciones ambientales. En el caso del aumento de irradiancia, la microalga generará mecanismos de fotoprotección que involucran principalmente carotenoides como luteína,  $\beta$ - caroteno, aloxantina y zeaxantina (Stoń-Egiert y cols., 2018).

Los valores obtenidos en el porcentaje y productividad en luteína, indica que los cultivos al interior presentan valores más altos, especialmente MCH-50:50 y MCH-SW, que presentan porcentaje y productividad mayores a los 7 días de cultivo, alcanzando 0,55% para MCH-50:50 de luteína, datos comparables con la microalga *Scenedesmus almeriensis* que posee un 0,53 % (Sánchez y cols., 2008). Este patrón se mantiene los primeros días, esto podría estar indicando que los altos niveles de salinidad están provocando cambios en la conformación de bioproductos de MCH, también se debe tener presente que mientras más disponibilidad de nutrientes esten presentes en el medio de cultivo, mayor será el porcentaje de luteína producido (D'Alessandro y cols., 2018; Gong & Bassi, 2016; Rearte y cols., 2018).

Con los antecedentes de que MCH posee tolerancia a salinidad moderada (100 mM NaCl) y alta irradiancia, se analizó su porcentaje y productividad de luteína. Si bien, los resultados al exterior con alta irradiancia fueron más bajos de los esperados, en comparación con los cultivos al interior, MCH-0 tuvo el mayor porcentaje y productividad de luteína a lo largo del cultivo alcanzando 0,12 mg luteína·g<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> a los 21 días, luego le sigue MCH-35 alcanzando los 0,09, valor obtenido a los 14 días. Esto puede ocurrir, debido a que la microalga es naturalmente dulceacuícola, y al estar en condiciones óptimas puede producir mayor contenido de luteína. Por otra parte, la baja productividad en las demás tratamientos, se puede deber a la alta irradiancia a la que se expone la microalga, promoviendo la producción de otros carotenoides como astaxantina o  $\beta$ -caroteno,



y en algunas ocasiones los niveles de luteína pueden disminuir. Otro factor que puede afectar la productividad es la inestabilidad que posee la luteína, debido a que ésta se puede degradar al estar bajo condiciones de estrés (Blanco y cols., 2007; Gong & Bassi, 2016; Sun y cols., 2018).

La composición de carotenoides presentes en MCH *Muriellopsis* sp., se determinó mediante HPLC para evaluar si la microalga sufre cambios en su contenido de carotenoides al exponerla a distintos tipos de tratamientos de estrés. Al analizar las cepas cultivadas al interior, se determina que todas contienen luteína, que se demuestra con un peak pasado el minuto 10 de tiempo de retención, pero también se observan unos pequeños peak no identificados pasados los 6 minutos de tiempo de retención, que incrementan a medida que transcurren los días, teniendo un área que esta cercana al peak de luteína en los 4 casos. En los cultivos al exterior, presentan el mismo patrón que los cultivos interiores y al finalizar el cultivo presentan otro peak al minuto 13 de retención que aumenta en las cepas con mayor concentración de salinidad. Estos podrían ser carotenoides como astaxantina, zeaxantina, violaxantina, entre otros, que podrían en aumento con el estrés al que están siendo sometidas. Esto debe ser analizado con los patrones de estos carotenoides correspondientes, para corroborar la información (Casal y cols., 2011; Lakshminarayana y cols., 2010; Rearte y cols., 2018).

En las células ocurren reacciones químicas que incluyen la oxidación y reducción de moléculas, esta reacción esta en constante equilibrio, sin embargo, si éste se pierde ocurre la formación de radicales libres, tales como  $\text{OH}^-$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{NO}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , los cuales reaccionan con sustratos orgánicos como lípidos, proteínas y ADN, pudiendo tener efectos nocivos para la salud humana. Se han relacionado con muchas enfermedades y afecciones como cáncer, diabetes, la enfermedad de Alzheimer y Parkinson, también con enfermedades cardiovasculares,

envejecimiento prematuro y varias enfermedades inmunológicas. Es por esto la necesidad de encontrar nuevos compuestos con capacidad antioxidante, si bien existen enzimas endógenas que realizan esta función como la catalasa, la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, hay veces que no son suficientes y se requiere de otra fuente exógena de apoyo para la neutralización de radicales libres ya sea de fuentes naturales o sintéticas. Es por esta razón que se ha buscado evaluar el efecto antioxidante de diferentes compuestos a través de distintos métodos, uno de ellos es el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), un radical libre que permite la evaluación de la eliminación o neutralización de radicales libres (Otohinoyi y cols., 2014; Somogyi y cols., 2007).

MCH *Muriellopsis* sp., contiene luteína que actúa como antioxidante, es decir, puede inhibir radicales libres, este carotenoide se extrajo en un medio metanólico ya que se tiene antecedentes que se obtienen mejores resultados para este análisis (Shalaby & Shanab, 2013). El valor de porcentaje de inhibición de radicales libres más bajo lo obtuvo MCH-50:50 con un 15% a los 7 días de cultivo. Aumentando a los 14 días a un 50% en conjunto con MCH-SW que alcanzó un 54% en condiciones al interior. Por otro lado, los cultivos al exterior poseen valores que no superan el 40% de inhibición, siendo el más alto obtenido en MCH-50:50 al final del cultivo. Estos valores al parecer no tienen directa relación con la productividad de luteína, si bien en condiciones al interior ambos presentan un aumento en la misma condición y mismo día, en los cultivos al exterior esto no es así, lo que nos podría indicar que no es solo la luteína la que está actuando como antioxidante, sino que deben estar presentes otros compuestos que poseen esta actividad también.

Ahora, si se hace una comparación de la actividad antioxidante de otras microalgas, *Muriellopsis* sp., posee mayor actividad que *Dunaliella* spp. debido a que en esta se realiza la determinación con el extracto total, en cambio con MCH

se utilizan  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de extracto (Charioui et al., 2017). Con especies de *Chlorococcum* sp. y *Chlorella* sp. ocurre algo similar, con el doble de la concentración del extracto se obtienen resultados similares. Por lo que MCH sigue teniendo mayor actividad antioxidante que otras especies de microalgas (Choochote & Suklampoo, 2014). Al comparar con alimentos, MCH posee una actividad antioxidante similar al zumo de mango, al hacer una comparación con té verde o negro estos poseen entre 10 - 11%.de inhibición, 5 veces más bajo que la actividad de MCH. Al realizar una comparación con kiwi, éste posee solo un 12% de inhibición a la mitad de concentración, es decir a  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Otros frutos como la manzana poseen sobre el 9% a la misma concentración, el pomelo 8% y la uva sobre el 11% de inhibición, lo que nos indica que aún MCH posee mayor actividad antioxidante que varios alimentos (Palomo y cols., 2009; Ramadan-Hassanien, 2008). Ahora, si se compara con el principal productor de luteína en el mundo, *Tagetes patula* L., éste se encuentra muy por debajo de los valores esperados, ya que sólo presenta un 14% de inhibición de radicales libre, con una concentración 8 veces mayor para *Muriellopsis* sp., sin mencionar el tiempo de producción que es bastante más prolongado, pueden ser semanas, incluso meses. A diferencia de MCH que en un par de días se puede obtener gran cantidad de biomasa (Bhattacharyya y cols., 2010).

Otro método antioxidante es el ensayo FRAP o poder antioxidante reductor férrico, mide la capacidad antioxidante para reducir el ion férrico a ferroso en presencia de 2,4,6-tri (2-piridil) -s-triazina (TPTZ), esta reacción ocurre a bajo pH a cargo del tampón ácido acético-acetato de sodio (pH 3,6), formándose un complejo coloreado ferroso-tripiridiltriazina. Esta reducción se monitorea midiendo el cambio en la absorción a 593 nm (Alam y cols., 2013; Benzie & Strain, 1996; Rojano y cols., 2008). Dado que no hay radicales libres involucrados, no hay forma de comparar la capacidad antioxidante con diferentes tipos de radicales, como el método DPPH. El ensayo FRAP tiene algunos inconvenientes, como la

interferencia, la cinética de reacción y los métodos de cuantificación (Somogyi y cols., 2007).

En los ensayos realizados, el valor de FRAP más alto en cultivo al interior lo obtuvo MCH-SW con 311 mg Eq de Trolox·g<sup>-1</sup> muestra. Por otro lado, en el ensayo al exterior el valor más alto lo obtuvo MCH-35 con 318 mg Eq de Trolox·g<sup>-1</sup> muestra. Si bien los métodos antioxidantes DPPH y FRAP no son comparables, ya que ninguno de sus resultados coincide, lo que si deja en claro que MCH-0 es la situación experimental que menor capacidad antioxidante posee, y que de alguna forma el aumento de salinidad en el medio esta afectando el metabolismo de MCH. Además FRAP no estaría asociado solo a los carotenoides presentes en la microalga, sino que debe formarse otro componente al que se asocia, que podría tener incluso mejor actividad antioxidante que la luteína (Alam y cols., 2013; Benzie & Strain, 1996; Krinsky & Johnson, 2005).

Se ha evaluado la actividad antioxidante en otros organismos, por ejemplo *Lampaya medicinalis*, una planta endémica de la zona norte de Chile, posee valores entre 31 y 158 mg Eq de Trolox·g<sup>-1</sup>, datos muy por debajo que los obtenidos con MCH (Morales & Paredes, 2014) si comparamos con un alga de agua fresca *Oedogonium intermedium* esta no supera los 8 mg Eq de Trolox·g<sup>-1</sup> (Wang y cols., 2018).

Si se compara con algas cafés como *Sargassum vestitum*, *Sargassum linearifolium* *Phyllospora comosa* y *Padina* sp. entre otras, los valores más elevados bordean los 183 mg Eq de Trolox·g<sup>-1</sup> con la concentración más alta de extracto de 1 mg·mL<sup>-1</sup>. El extracto de MCH utilizado fue de 200 ug·mL<sup>-1</sup> (Dang y cols.,2018) al comparar con otras especies MCH sigue teniendo lo valores más altos de actividad antioxidante medidas con el ensayo FRAP.

Entonces se puede decir que la microlaga MCH efectivamente fue afectada por la exposición a elevadas concentraciones de salinidad en la primera etapa del análisis. Esto quedo claro en primera instancia por la disminución del número celular que se obtuvo en MCH-50:50, MCH-SW y MCH-35 en los cultivos al interior, si bien en éste último cultivo la cepa estaba previamente adaptada, de igual manera la concentración de salinidad aun compromete su crecimiento. Por otro lado, al evaluar la concentración de biomasa, los valores más altos son obtenidos por las células expuestas a mayor concentración de salinidad, esto debido al aumento de tamaño y peso que presentan las microalgas.

Al analizar los cultivos en condiciones de interior los mejores resultados, se obtuvieron en el tratamiento MCH-SW ya que posee una alta concentración de biomasa, su eficiencia fotosintética esta dentro de los parámetros esperados, aunque sus valores de NPQ indican que esta activando otros mecanismos para protegerse de la alta salinidad, estos cambios estarían relacionados con la producción de carotenoides, que se evidencia con los cromatogramas obtenidos por HPLC. Además, posee alta productividad de luteína y también una buena actividad antioxidante según el método DPPH.

Por otro lado, en los cultivos de exterior, el mejor resultado fue MCH-0, se observa que la microalga esta en su condición natural. Como se ha descrito anteriormente, uno de los objetivo de esta investigación es buscar una alternativa rentable, por lo que utilizar agua de mar sería la mejor opción, en este caso, el mejor representante fue MCH-35, la cepa posee alta concentración de biomasa, estable eficiencia fotosintética, aunque al igual que MCH-SW también activo la producción de carotenoides para su protección, lo que se refleja en el valor de NPQ. Al evaluar la viabilidad celular, esta posee mayores porcentajes de mortalidad al terminar el experimento, además de ser la cepa con mayor

producción de ROS, también tiene alta productividad de luteína y capacidad antioxidante mediante el ensayo FRAP.

Al estar la cepa MCH expuesta a estrés, se altera el equilibrio entre la producción de ROS y su eliminación, lo cual provoca un daño a través de la oxidación de los componentes celulares, es decir, el "estrés oxidativo", lo que nos indica que esta en constante lucha por buscar un equilibrio. En la mayoría de las microalgas, el estrés elevado en salinidad es beneficioso para la acumulación de lípidos, pero generalmente conduce a la disminución de los pigmentos fotosintéticos y al daño oxidativo (Sun y cols., 2018).

La búsqueda de un antioxidante natural es de interés mundial, debido a sus múltiples beneficios para la salud, el punto interesante es determinar como será administrado este producto. Estudios indican que se requieren por lo menos 6 mg·día<sup>-1</sup> de luteína para reducir el riesgo de enfermedades, aunque también se indica que se debe consumir como máximo 18 mg, normalmente se consume de 1 a 3 mg de luteína por día (Steiner y cols., 2018). El problema es que la luteína que se consume a diario no se absorbe en su totalidad, debido a que es una molécula inestable de dobles enlaces carbono-carbono conjugados con una tasa de absorción baja después de la administración y una biodisponibilidad deficiente debido a su insolubilidad en los medios acuosos y se absorbe pobremente cuando se administra por vía oral. Por lo tanto es importante encontrar algún sistema que permita su absorción con sus propiedades intactas. Es por esto que existen los sistemas de encapsulación coloidal, proceso en el cual el material activo está incrustado o cubierto por un material de pared protectora, esto permite aumentar la viabilidad, evitar evaporación o reacción del producto ante condiciones adversas, aumentando así la vida útil de compuestos activos hidrófobos como la luteína. Existen distintos tipos: como emulsiones múltiples, que pueden considerarse emulsiones dentro de otras emulsiones, otros son los complejos de inclusión

moleculares que se forman cuando la luteína se localiza físicamente dentro de un sustrato que contiene cavidad, que permanece en solución en el sistema. Existen las partículas de biopolímeros que están compuestas por una red de polímeros densos unidas por diferentes fuerzas. Los liposomas están compuestos por una capa secundaria de fosfolípidos sin un núcleo lipídico, las microemulsiones y emulsiones tienen un núcleo lipídico fluido rodeado de surfactantes, siendo microemulsiones termodinámicamente más estables que las emulsiones, las nanopartículas lipídicas sólidas son similares a las nanoemulsiones, excepto que tienen un núcleo lipídico sólido. Encontramos los nanoliposomas decorados con lisina, podrían mejorar la estabilidad, liberación y bioactividad de la luteína, protegiendo a la luteína de la degradación y promover su liberación en condiciones de fluido gastrointestinal, además mantiene su actividad antioxidante y actividad antiproliferativa, ya que se mantiene su estructura molecular única, esto es de gran interés para la industria alimenticia y farmacéutica (Jiao y cols., 2018; Steiner y cols., 2018).

## 6. CONCLUSIÓN

En este estudio se analizó el comportamiento fisiológico y bioquímico de la microalga MCH *Muriellopsis* sp. en agua de mar, efectivamente se vio afectada bajo esta condición, ya que se evidenciaron cambios en el crecimiento, eficiencia fotosintética, productividad de luteína y actividad antioxidante.

Se logró identificar que MCH-SW, cultivada en agua de mar, obtuvo los valores más altos en cuanto a productividad de luteína por gramo por día y mayor actividad antioxidante en condiciones de cultivo al interior.

Además se expuso a MCH, a condiciones de alta irradiancia, logrando evidenciar cambios, en el aumento del número celular, concentración de biomasa y composición de carotenoides.

MCH-35 cepa adaptada al crecimiento en agua de mar al exterior obtuvo los resultados más prometedores, ya que posee alta producción de luteína y alta actividad antioxidante, en comparación con las otras concentraciones de salinidad.

Finalmente, podemos concluir que este estudio ha permitido identificar las condiciones en que se debe cultivar MCH para aumentar la producción del contenido de luteína tanto al interior como al exterior. Además permitió concluir que esta especie de microalga es una de las mayores productoras a nivel mundial, en base a los antecedentes conocidos hasta ahora. Si bien es una microalga dulceacuícola, creció sin dificultad en agua de mar, lo que permite disminuir costos y realizar una producción masiva para poder extraer luteína, que es un carotenoide que posee un alto valor alimenticio, por sus propiedades bien conocidas para evitar algunas enfermedades.



## 7. REFERENCIAS

- 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. <http://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Bai, S.-K., Lee, S.-J., Na, H.-J., Ha, K.-S., Han, J.-A., Lee, H., Kwon, Y.-G., Chung, C.-K., Kim, Y.-M. (2005). beta-Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kappaB activation. *Experimental & Molecular Medicine*, 37(4), 323–334. <http://doi.org/10.1038/emm.2005.42>
- BCC Research. (2018). The Global Market for Carotenoids. From <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-for-carotenoids-fod025f.html>
- Begum, H., Yusoff, F. M. D., Banerjee, S., Khatoon, H., & Shariff, M. (2016). Availability and utilization of pigments from microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13), 2209–2222. <http://doi.org/10.1080/10408398.2013.764841>
- Beltrán-Rocha, J. C., Guajardo-Barbosa, C., Barceló-Quinta, I. D., & López-Chuken, U. J. (2017). Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO<sub>2</sub>. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52(3), 417–427. <http://doi.org/10.4067/S0718-19572017000300001>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical biochemistry*, 76(239), 70–76. <http://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bhattacharyya, S., Datta, S., Mallick, B., Dhar, P., & Ghosh, S. (2010). Lutein content and *in vitro* antioxidant activity of different cultivars of indian marigold flower (*Tagetes patula L.*) extracts. *Journal of agricultural and food chemistry* (Vol. 58). <http://doi.org/10.1021/jf101262e>

- Blanco, A. M., Moreno, J., Del Campo, J. A., Rivas, J., & Guerrero, M. G. (2007). Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis* sp. in open ponds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(6), 1259–1266. <http://doi.org/10.1007/s00253-006-0598-9>
- Cardoso, L. A. C., Karp, S. G., Vendruscolo, F., Kanno, K. Y. F., Zoz, L. I. C., & Carvalho, J. C. (2017). Biotechnological production of carotenoids and their applications in food and pharmaceutical products. In *Carotenoids* (pp. 125–141). InTech.
- Casal, C., Cuaresma, M., Vega, J. M., & Vilchez, C. (2011). Enhanced productivity of a lutein-enriched novel acidophile microalga grown on urea. *Marine Drugs*, 9(1), 29–42. <http://doi.org/10.3390/md9010029>
- Choochote, W., & Suklampoo, L. (2014). Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 26, 43–48. <http://doi.org/10.1007/s10811-013-0084-6>
- Cobos Ruiz, M., Paredes Rodríguez, J. D., & Castro Gómez, J. C. (2016). Induction of total lipids production in microalgae under nutritional stress. *Acta Biologica Colombiana*, 21(1), 17–26. <http://doi.org/10.15446/abc.v21n1.47439>
- D'Alessandro, E. B., Soares, A. T., Da Costa, D. C., Silva Neto, H. D. A., Fernandes, V. D. O., & Antoniosi Filho, N. R. (2018). A thermal water microalga: *Eutetramorus planctonicus* as a promising source of fatty acids and lutein. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(5), 6707–6713. <http://doi.org/10.1016/j.jece.2018.10.038>
- da Silva, T. L., Santos, C. A., & Reis, A. (2009). Multi-parameter flow cytometry as a tool to monitor heterotrophic microalgal batch fermentations for oil production towards biodiesel. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(3), 330–337. <http://doi.org/10.1007/s12257-008-0228-8>
- Dang, T. T., Bowyer, M. C., Van Altena, I. A., & Scarlett, C. J. (2018). Comparison of chemical profile and antioxidant properties of the brown algae. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 174–181.

- <http://doi.org/10.1111/ijfs.13571>
- Del Campo, J. A., Moreno, J., Rodríguez, H., Angeles Vargas, M., Rivas, J., & Guerrero, M. G. (2000). Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*, 76(1), 51–59. [http://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00178-9](http://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00178-9)
- El-Baky, H. H. A., El Baz, F. K., & El-Baroty, G. S. (2008). Evaluation of marine alga *Ulva Lactuca* L. as a source of natural preservative ingredient. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 7(11), 3353–3367. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01926.x>
- Faraloni, C., & Torzillo, G. (2017). Synthesis of antioxidant carotenoids in microalgae in response to physiological stress. In *Carotenoids* (pp. 143–157). <http://doi.org/10.5772/67843>
- Fennema, O. R. (1996). *Food Chemistry* (3rd ed.). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Gião, M. S., Guedes, A. C., & Malcata, F. X. (2011). Antioxidants from wild plants: sources, features and assays. In *Wild Plant: Identification, Uses and Conservation* (pp. 63–104). New York: Nova Publishers.
- Glazer, A. N. (1994). Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology*, 6(2), 105–112. <http://doi.org/10.1007/BF02186064>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.002>
- Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8):1396-1412. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>
- Granado-Lorencio, F., Herrero-Barbudo, C., Acién-Fernández, G., Molina-Grima, E., Fernández-Sevilla, J. M., Pérez-Sacristán, B., & Blanco-Navarro, I. (2009).

- In vitro* bioaccessibility of lutein and zeaxanthin from the microalgae *Scenedesmus almeriensis*. *Food Chemistry*, 114(2), 747–752. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.058>
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., Sousa-Pinto, I., & Malcata, F. X. (2014). Bioactive carotenoids from microalgae. *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources* (1st ed., pp. 131–151). JohnWiley & Sons, Ltd.
- Guedes, A. C., Gião, M. S., Seabra, R., Ferreira, A. C. S., Tamagnini, P., Moradas-Ferreira, P., & Malcata, F. X. (2013). Evaluation of the antioxidant activity of cell extracts from microalgae. *Marine Drugs*, 11, 1256–1270. <http://doi.org/10.3390/md11041256>
- Guillard, R. R. L., & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. *J. Microbiol*, 8(1140).
- Guldhe, A., Kumari, S., Ramanna, L., Ramsundar, P., Singh, P., Rawat, I., & Bux, F. (2017). Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation. *Journal of Environmental Management*, 203, 299–315. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.08.012>
- Halliwell, B. (2015). Free radicals and other reactive species in disease. In *eLS* (pp. 1–9). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <http://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002269.pub3>
- Hitchcock, G. L. (1982). A comparative study of the size-dependent organic composition of marine diatoms and dinoflagellates. *Journal of Plankton Research*, 4(2), 363–377. <http://doi.org/10.1093/plankt/4.2.363>
- Hong, Y., Hu, H., Xie, X., & Li, F. (2008). Responses of enzymatic antioxidants and non-enzymatic antioxidants in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to the allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) isolated from reed (*Phragmites communis*). *Journal of Plant Physiology*, 165, 1264–1273. <http://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.10.007>
- Hyka, P., Lickova, S., Přibyl, P., Melzoch, K., & Kovar, K. (2013). Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae.

- Biotechnology Advances*, 31(1), 2–16.  
<http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.007>
- Ibañez, E., & Guerrero, M. (2017). ¿Que sabemos de? Las algas que comemos. Madrid: Catarata. Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=AlzQDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT4&dq=Dunaliella+salina&ots=m-Rh5m39VI&sig=GvoYs88ZU05hOx-Vk3KMD1Zjhc0#v=onepage&q&f=true>
- Ingkasupart, P., Manochai, B., Song, W. T., & Hong, J. H. (2015). Antioxidant activities and lutein content of 11 marigold cultivars (*Tagetes* spp.) grown in Thailand. *Food Science and Technology (Campinas)*, 35(2), 380–385. <http://doi.org/10.1590/1678-457X.6663>
- Jha, D., Jain, V., Sharma, B., Kant, A., & Garlapati, V. K. (2017). Microalgae-based pharmaceuticals and nutraceuticals: An emerging field with immense market potential. *ChemBioEng Reviews*, (00), 1–16. <http://doi.org/10.1002/cben.201600023>
- Jiao, Y., Li, D., Liu, C., Chang, Y., Song, J., & Xiao, Y. (2018). Polypeptide – decorated nanoliposomes as novel delivery systems for lutein. *RSC Advances*, 8(55), 31372–31381. <http://doi.org/10.1039/C8RA05838E>
- Kadam, S. U., & Prabhasankar, P. (2010). Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. *Food Research International*, 43(8), 1975–1980. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.06.007>
- Kijlstra, A., Tian, Y., Kelly, E. R., & Berendschot, T. T. J. M. (2012). Lutein: More than just a filter for blue light. *Progress in Retinal and Eye Research*, 31(4), 303–315. <http://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.03.002>
- Kim, J.-H., Na, H.-J., Kim, C.-K., Kim, J.-Y., Ha, K.-S., Lee, H., Chung, H.-T., Kwon, H. J., Kwon, Y.-G., Kim, Y.-M. (2008). The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits NF-κB-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF-κB-inducing kinase pathways: Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in NF-κB activation. *Free Radical Biology and*

- Medicine*, 45(6), 885–896. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.019>
- Kon, I. Y., Gmoshinskaya, M. V., Safronova, A. I., Alarcon, P., & Vandenas, Y. (2014). Growth and tolerance assessment of a lutein-fortified infant formula. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*, 17(2), 104. <http://doi.org/10.5223/pghn.2014.17.2.104>
- Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(6), 459–516. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2005.10.001>
- Lakshminarayana, R., Sathish, U. V., Dharmesh, S. M., & Baskaran, V. (2010). Antioxidant and cytotoxic effect of oxidized lutein in human cervical carcinoma cells (HeLa). *Food and Chemical Toxicology*, 48(7), 1811–1816. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2010.04.011>
- Lambrev, P. H., Miloslavina, Y., Jahns, P., & Holzwarth, A. R. (2012). On the relationship between non-photochemical quenching and photoprotection of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(5), 760–769. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.002>
- Lee, K. K., Lim, P. E., Poong, S. W., Wong, C. Y., Phang, S. M., & Beardall, J. (2018). Growth and photosynthesis of *Chlorella* strains from polar, temperate and tropical freshwater environments under temperature stress. *Journal of Oceanology and Limnology*, 36(4), 1266–1279. <http://doi.org/10.1007/s00343-018-7093-x>
- Lin, J. H., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2015). Lutein in specific marigold flowers and microalgae. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 49, 90–94. <http://doi.org/10.1016/j.jtice.2014.11.031>
- Malnoë, A. (2018). Photoinhibition or photoprotection of photosynthesis? Update on the (newly termed) sustained quenching component qH. *Environmental and Experimental Botany*, 154(May), 123–133. <http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.005>
- Matos, J., Cardoso, C., Bandarra, N. M., & C. Afonso. (2017). Microalgae as a

- healthy ingredient for functional food. *Food and Function*.  
<http://doi.org/10.1039/C7FO00409E>
- Mazalová, P., Šarhanová, P., Ondřej, V., & Pouličková, A. (2011). Quantification of DNA content in freshwater microalgae using flow cytometry: a modified protocol for selected green microalgae. *Fottea* (Vol. 11). Retrieved from <http://www.biologie.uni-hamburg>.
- Morales, G., & Paredes, A. (2014). Antioxidant activities of *Lampaya medicinalis* extracts and their main chemical constituents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 1–12. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-14-259>
- Murthy, K. N. C., Vanitha, A., Rajesha, J., Swamy, M. M., Sowmya, P. R., & Ravishankar, G. A. (2005). In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* — a green microalga. *Life Sciences*, 76(12), 1381–1390. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.10.015>
- Olasehinde, T., Olaniran, A., & Okoh, A. (2017). Therapeutic potentials of microalgae in the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules*, 22(3), 480. <http://doi.org/10.3390/MOLECULES22030480>
- Osanai, T., Park, Y., & Nakamura, Y. (2017). Editorial: Biotechnology of Microalgae, Based on Molecular Biology and Biochemistry of Eukaryotic Algae and Cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8(February), 3389–3391. <http://doi.org/10.1038/nbt.1586>
- Otohinoyi, D. A., Ekpo, O., & Ibraheem, O. (2014). Effect of ambient temperature storage on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) as a free radical for the evaluation of antioxidant activity. *International Journal of Biological and Chemical Science*, 8(3), 1262–1268.
- Palomo, I., Gutiérrez, M., Astudillo, L., Rivera, C., Torres, C., Guzmán, L., Moore-Carrasco, R., Carrasco, G., Alarcón, M. (2009). Efecto antioxidante de frutas y hortalizas de la zona central de Chile. *Rev Chil Nutr*, 36(12221111), 152–158.
- Palozza, P., Serini, S., Torsello, A., Di Nicuolo, F., Piccioni, E., Ubaldi, V., Pioli, C., Wolf, F., Calviello, G. (2003). Beta-carotene regulates NF-kappaB DNA-

- binding activity by a redox mechanism in human leukemia and colon adenocarcinoma cells. *The Journal of Nutrition*, 133(2), 381–388.
- Pinilla, G. A. (2006). Evaluación de la eficiencia fotosintética del fitoplancton en un lago amazónico (Lago Boa) y en un lago andino (Lago Guatavita), 36(45), 221–228.
- Prabhasankar, P., Ganesan, P., Bhaskar, N., Hirose, A., Stephen, N., Gowda, L. R., Hosokawa, M., Miyashita, K. (2009). Edible Japanese seaweed, wakame (*Undaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta: Chemical, functional and structural evaluation. *Food Chemistry*, 115(2), 501–508. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.047>
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Suárez-bregua, P., & Cid, Á. (2012). Flow cytometric analysis to evaluate physiological alterations in herbicide-exposed *Chlamydomonas moewusii* cells. *Keywords*, 21(2), 409–420. <http://doi.org/10.1007/s10646-011-0801-3>
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635–648. <http://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
- Ramadan-Hassanien, M. F. (2008). Total antioxidant potential of juices, beverages and hot drinks consumed in Egypt screened by DPPH *in vitro* assay. *Grasas y Aceites*, 59(3), 254–259. <http://doi.org/10.3989/gya.2008.v59.i3.516>
- Rearte, T. A., Vélez, C. G., Beligni, M. V., Figueroa, F. L., Gómez, P. I., Flaig, D., & de Iorio, A. F. (2018). Biological characterization of a strain of *Golenkinia* (Chlorophyceae) with high oil and carotenoid content induced by increased salinity. *Algal Research*, 33(July), 218–230. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2018.05.014>
- Riveros, K., Sepulveda, C., Bazaes, J., Marticorena, P., Riquelme, C., & Acién, G. (2018). Overall development of a bioprocess for the outdoor production of *Nannochloropsis gaditana* for aquaculture. *Aquaculture Research*, 49(1), 165–176. <http://doi.org/10.1111/are.13445>



- Rojano, B, C Gaviria, M Gil, J Sáez, G. S. & H. T. (2008). Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae: Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, 15, 173–181.
- Sánchez, J. F., Fernández, J. M., Acién, F. G., Rueda, A., Pérez-Parra, J., & Molina, E. (2008). Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochemistry*, 43(4), 398–405. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.01.004>
- Sato, M., Murata, Y., Mizusawa, M., Iwahashi, H., & Oka, S. (2004). A simple and rapid dual fluorescence viability assay for microalgae. *Microbiol. Cult. Coll.*, 20(2).
- Shalaby, E. A., & Shanab, S. M. M. (2013). Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*, 42(September), 556–564.
- Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., & Nagy, G. (2007). Antioxidant measurements. *Physiological Measurement*, 28(4), R41–R55. <http://doi.org/10.1088/0967-3334/28/4/R01>
- Steiner, B. M., McClements, D. J., & Davidov-Pardo, G. (2018). Encapsulation systems for lutein: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 82(May), 71–81. <http://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.10.003>
- Stoń-Egiert, J., Majchrowski, R., & Ostrowska, M. (2018). Distributions of photosynthetic and photoprotecting pigment concentrations in the water column in the Baltic Sea: an improved mathematical description. *Oceanologia*, 189, 1–16. <http://doi.org/10.1016/j.oceano.2018.08.004>
- Subagio, A., Wakaki, H., & Morita, N. (1999). Stability of lutein and its myristate esters. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(10), 1784–1786. <http://doi.org/10.1271/bbb.63.1784>
- Sun, X.-M., Ren, L.-J., Zhao, Q.-Y., Ji, X.-J., & Huang, H. (2018). Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 272.

- <http://doi.org/10.1186/s13068-018-1275-9>
- Van Bergeijk, S. A., Paullada Salmerón, J. A., López Pérez, A. I., Moreno, J., Cañavate, J. P., & García-González, M. (2013). Lutein enrichment of the rotifer *Brachionus* sp. using freeze-dried *Muriellopsis* sp. cells. *Aquaculture Research*, 44(11), 1724–1730. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03178.x>
- Varela, J. C., Pereira, H., Vila, M., & León, R. (2015). Production of carotenoids by microalgae: Achievements and challenges. *Photosynthesis Research*, 125(3), 423–436. <http://doi.org/10.1007/s11120-015-0149-2>
- Wang, N., Manabe, Y., Sugawara, T., Paul, N. A., & Zhao, J. (2018). Identification and biological activities of carotenoids from the freshwater alga *Oedogonium intermedium*. *Food Chemistry*, 242(September 2017), 247–255. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.075>
- Wrolstad, R. E. (2004). Interaction of natural colors with other ingredients - Anthocyanin pigments - Bioactivity and coloring properties. *Journal of Food Science*, 69(5), C419–C421. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10710.x>
- Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M., & Takriff, M. S. (2014). An overview : biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research*, 21(6), 1–10.
- Yilancioglu, K., Cokol, M., Pastirmaci, I., Erman, B., & Cetiner, S. (2014). Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain, 9(3). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0091957>
- Zuluaga, M., Gueguen, V., Pavon-djavid, G., & Letourneur, D. (2017). Carotenoids from microalgae to block oxidative stress. *Tabriz University of Medical Sciences*, 7(1), 1–3. <http://doi.org/10.15171/bi.2017.01>

