

Determinación del contenido de proteína y nutraceuticos en la biomasa de *Paramecium aurelia*

Determination of protein and nutraceuticals content in the *Paramecium aurelia* biomass

Manuel Sacristán de Alva, Víctor M. Luna-Pabello*

Laboratorio de Microbiología Experimental, Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad No. 3000 Coyoacán, CP. 04510 Ciudad de México, México

*Autor de correspondencia: lpvictor@unam.mx

Artículo científico recibido: 29 de septiembre de 2014, **aceptado:** 6 de abril de 2016

RESUMEN. La investigación se enfocó en la determinación del contenido proteico y nutraceutico en el ciliado de vida libre *Paramecium aurelia*, que fue aislado de una fuente silvestre y se identificó. Los cultivos axénicos de *P. aurelia* se realizaron en un bio-reactor automatizado con control de pH a 7.0, 28 °C, oxígeno disuelto superior a 2 mg L⁻¹ y agitación a 70 rpm por 72 h. El medio de cultivo se integró con 700 mL de infusión de lechuga y trigo, diluidos en 1 L de agua destilada e inóculo de 300 mL con 3 x 10³ células mL⁻¹. De estos cultivos se obtuvieron 74.1 mg L⁻¹ de biomasa seca, 48.6 % de proteínas y 37.6 % de lípidos, conformados principalmente por ácidos grasos: oleico (20.8 %), linoleico (11.1 %), gama-linolénico (3.6 %) y araquidónico (6.0 %). Las vitaminas presentes fueron: A (retinol, 81.27 µg g⁻¹), E (tocoferol, 28.73 mg g⁻¹) y D3 (colecalfiferol, 4.49 mg g⁻¹). La biomasa de *P. aurelia*, podría constituir una fuente importante de proteína y de sustancias nutraceuticas.

Palabras clave: Ácidos grasos, biomasa, ciliado, cultivo axénico, vitaminas

ABSTRACT. This investigation focused on determining the protein and nutraceutical content in the free-living ciliated *Paramecium aurelia*, which was isolated from a wild source for further identification. Axenic cultures of *P. aurelia* were performed in an automated bioreactor with pH control at 7.0, 28 °C, dissolved oxygen greater than 2 mg/l and stirring at 70 rpm for 72 h. The culture medium was composed of 700 mL of lettuce and wheat infusion, diluted with 1 L of distilled water and an inoculum of 300 mL with 3 x 10³ cells mL⁻¹. From the cultures 74.1 mg L⁻¹ of dry biomass were obtained, containing 48.6 % proteins and 37.6 % lipids, formed mainly by fatty acids: oleic (20.8 %), linoleic (11.1 %), gamma-linolenic (3.6 %) and arachidonic (6.0 %). The vitamins present were: A (retinol, 81.27 µg g⁻¹), E (tocopherol, 28.73 mg g⁻¹) and D3 (cholecalciferol, 4.49 mg g⁻¹). The biomass of *P. aurelia* could represent an important source of protein and nutraceuticals.

Key words: Fatty acids, biomass, ciliate, axenic culture, vitamins

INTRODUCCIÓN

Un nutraceutico es cualquier sustancia alimenticia, que provea beneficios a la salud (Patil et al. 2016). Estos efectos ocurren por medio de la regulación de funciones corporales que protegen o retardan las enfermedades (Bigliardi y Galati 2013). Por el contenido de ácidos grasos y vitaminas en un alimento, que proporciona beneficios médicos o fisiológicos, se cataloga como nutraceutico (Ali et al. 2009). En años recientes, es común emplear

como sinónimo de nutraceutico, el término alimento funcional (Ghosh et al. 2015).

Durante el procesamiento de los alimentos, sus componentes bioactivos son afectados. Por lo que los productos no procesados o con mínimo de procesamiento, pueden tener mejores beneficios para la salud que los procesados (Shahidi 2009). Sin embargo, la biodisponibilidad de algunos nutraceuticos lipofílicos, como los carotenoides, es baja en los alimentos crudos, debido a que se encuentran atrapados en las estructuras vegetales. Pudiendo

aumentar la biodisponibilidad al procesarlos para romper de forma parcial las estructuras y facilitar la liberación de los compuestos nutraceuticos (Mc Clements et al. 2015).

Los estudios sobre sustancias nutraceuticas en microorganismos eucariontes se han realizado casi de manera exclusiva en algas y microalgas. Lo cual se debe a que éstas constituyen una fuente de compuestos con actividad biológica que se pueden utilizar como ingredientes funcionales (Barba et al. 2015). Se tienen reportes de varias algas comestibles, en los que se indican que tienen cantidades significativas de proteínas, vitaminas y minerales esenciales para la nutrición humana (Domínguez 2013). En el caso de las microalgas, su contenido de compuestos antioxidantes son los de mayor interés (Kelman et al. 2012, Gad et al. 2011). Las microalgas también se utilizan para aumentar el contenido nutricional de los alimentos (Kovac et al. 2013), como *Chlorella* y *Tetraselmis* que contienen ω -3 y ω -6 (Spolaore et al. 2006). La ingesta de ácidos grasos monoinsaturados, como el oleico, previene arritmias, reduce la presión arterial y el tiempo de coagulación. Las especies reactivas de oxígeno y los radicales libres juegan un papel importante en la arterioesclerosis, que puede ser prevenida con el consumo de antioxidantes, como las vitaminas A, C, E, ácido fólico, β -caroteno, selenio y zinc (Badimon et al. 2010). Del mismo modo, los ácidos grasos y los polifenoles tiene influencia favorable sobre los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares (Massaro et al. 2010).

Aunque se cuenta con fuentes alternativas para la obtención de nutraceuticos, se deben buscar nuevas opciones, como los ciliados que pueden contener compuestos antioxidantes. Los *Paramecium* son de las especies más dispersas en el mundo y las más fáciles de cultivar en el laboratorio, con tamaño relativamente grande, que facilita su identificación (DeLong y Vasseur 2012). A la fecha, se tienen reportadas 15 especies del complejo *Paramecium aurelia*, de las cuales *P. primaurelia*, *P. biaurelia*, *P. tetraurelia* y *P. sexaurelia*, como las de mayor distribución (Przyboś y Surmacz 2010). Las cuales son morfológicamente idénticas, por lo que sólo

pueden diferenciarse vía genética (Catania et al. 2009). En la naturaleza el protozoo se alimenta de microorganismos como las bacterias, algas y levaduras, además de materia vegetal en descomposición (Luna-Pabello 2006). Su temperatura óptima de crecimiento es de 27 a 29 °C, pero puede crecer en temperaturas de entre 5 y 40 °C, con pH entre 5.8 y 7.4, en aguas poco profundas (Przyboś y Surmacz 2010, Luna-Pabello 2006), tamaño entre 125 y 150 μ m de largo y de 35 a 50 μ m de ancho, un macronúcleo, dos micronúcleos vesiculares e infraciliatura de 91 a 97 cinetias (Luna-Pabello 2006). Por lo anterior, el presente trabajo tuvo el objetivo de determinar el contenido de proteínas, ácidos grasos insaturados y vitaminas presentes en la biomasa de una cepa silvestre de *P. aurelia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación de la cepa de *Paramecium* sp.

Se aisló una cepa de *Paramecium* sp. procedente de agua dulce estancada en un parque de la zona sur de la Ciudad de México. Para determinar la especie se emplearon técnicas de medición y reconocimiento morfológico e infraciliatura, tinciones con azul de metileno, impregnaciones argénticas de Klein y carbonato de plata. Además de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para amplificar y secuenciar el gen que codifica para el RNAr 18S. Con la información obtenida, se procedió a realizar la comparación con las secuencias de DNA disponibles en la base de datos Genbank®.

Cultivo de *P. aurelia*

Considerando el tipo de alimento y la temperatura de crecimiento del ciliado, la cepa aislada de *P. aurelia* se cultivó en un bio-reactor automatizado de 3 L, marca Applikon Biotechnology modelo ADI 1010. Para lo cual se emplearon 700 mL de medio de cultivo formado por una mezcla 1:1 de infusión lechuga : trigo (Pon 1996), pH de 7.0, velocidad de agitación de 70 rpm, temperatura de 28 °C, oxígeno disuelto en concentración de 5.0 a 5.5 mg L⁻¹ por 72 h; para alcanzar la fase estacionaria o de máxima densidad del microorganismo. De forma

preliminar se realizó una curva de crecimiento del organismo para detectar la fase *lag* de aclimatación al medio de cultivo, la fase de crecimiento exponencial, la etapa de crecimiento continuo y la fase de muerte o decaimiento del cultivo. El crecimiento se determinó por cuenta directa de los paramecios presentes en una muestra de 0.1 mL del cultivo, que se realizó cada 24 h, con un microscopio estereoscópico (Motic SMZ-168).

Separación de la biomasa del medio de cultivo

Después del tiempo de cultivo, se centrifugó el medio de cultivo a 3 500 rpm por 7 min en una centrífuga Labnet Hermile Z400. Posteriormente, se filtró la biomasa con una membrana Millipore de 0.45 μm para eliminar el líquido del medio de cultivo. Para determinar el peso seco de la biomasa, se secó la biomasa en una estufa a 70 °C hasta alcanzar peso constante (Chinnasamy *et al.* 2010).

Determinación del contenido de proteína, ácidos grasos y vitaminas liposolubles

El contenido de nitrógeno total de la muestra, se determinó con el método de Kjeldahl (APHA 2012), usando el factor de 6.25 para calcular el contenido de proteína. Mientras que la determinación del contenido de los ácidos grasos de interés, se realizó con el método 34.1.08 de la AOAC (2012), para ello se pesaron 0.25 g de muestra, para luego agregar 25 mL de la mezcla de cloroformo : etanol (1:1), filtrar y evaporar el disolvente.

La preparación y determinación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, se realizó con el método 41.1.28 de la AOAC (2012). Agregando 2 mL de NaOH en metanol al 2 %, llevar a ebullición por 10 min y agregar 1 mL de la disolución de trifluoruro de boro en metanol 1.3 M, para llevar a ebullición por 2 min y agregar 2 mL de la disolución saturada de NaCl, y separar las fases con un embudo de separación. Al sólido que quedó, se le agregó 1 mL de hexano grado HPLC y se inyectó la muestra en un cromatógrafo de gases marca Varian modelo 3 800, con detector de ionización de flama (FID), nitrógeno como gas acarreador y una columna J&W DB-23 de 30 m de largo y 25 mm de diámetro in-

terno, con temperatura del inyector de 250 °C y del detector de 300 °C, mientras que en el horno la temperatura varió de 140 a 230 °C, con incrementos de 10°C min⁻¹.

El contenido de vitamina A (retinol), D3 (colecalfiferol) y E (tocoferol) se determinó con los métodos 922.06, 922.04 y 922.03 (AOAC 2012). Pesando 1 g de muestra a la que se le agregaron 4 mL de KOH en etanol y agitar un minuto en un vórtex, incubar por 10 min a 58°C y dejar enfriar para agregar 400 μL de dimetilsulfóxido, para luego adicionar 5 mL de agua desionizada y 5 mL de n-hexano. La fase orgánica se separó por medio de evaporación hasta secar en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Al sólido residual, se le adicionó 1 mL de metanol : acetonitrilo : agua (25:24:1). La muestra se inyectó en un equipo HPLC con un detector UV de 254 nm, acoplado a una columna C8 con precolumna C-8.

Análisis de datos

La identificación del microorganismo se realizó comparando las las secuencias de DNA obtenidas con las disponibles en la base de datos Genbank[®], las características morfológicas se obtuvieron midiendo 30 microorganismos. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, los resultados se presentan como valores medios y desviación estándar.

RESULTADOS

La secuencia amplificada en laboratorio tiene 99 % de compatibilidad con las secuencias del gen que codifica para el RNAr 18S de *P. tetraurelia* y de *P. primaurelia*. Con esta información se corrobora que el microorganismo estudiado pertenece al complejo *P. aurelia*. La especie de *Paramecium* aislado mostró una forma cilíndrica, con dimensiones de 127.2 \pm 10.5 μm de largo y de 36.2 \pm 5.5 μm de ancho (Figura 1). En la Figura 2, se observa la curva de crecimiento de *P. aurelia*, donde se muestra que la fase *lag* ocurre en las primeras 24 h de cultivo. Posteriormente, ocurre la fase exponencial hasta las 72 h, en la cual se encuentra en la fase de

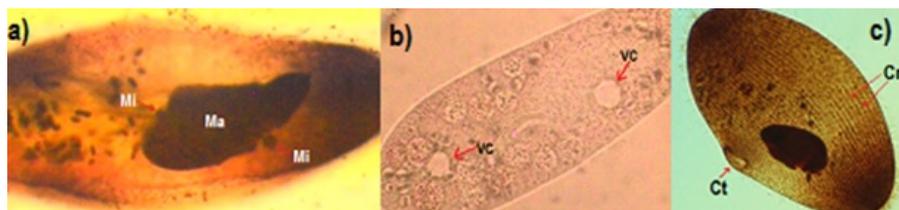


Figura 1. Morfología de *P. aurelia*. Ma: Macronúcleo, Mi: Micronúcleo, VC: Vacuola contráctil, Ct: Citostoma, Cn: Cinetias.

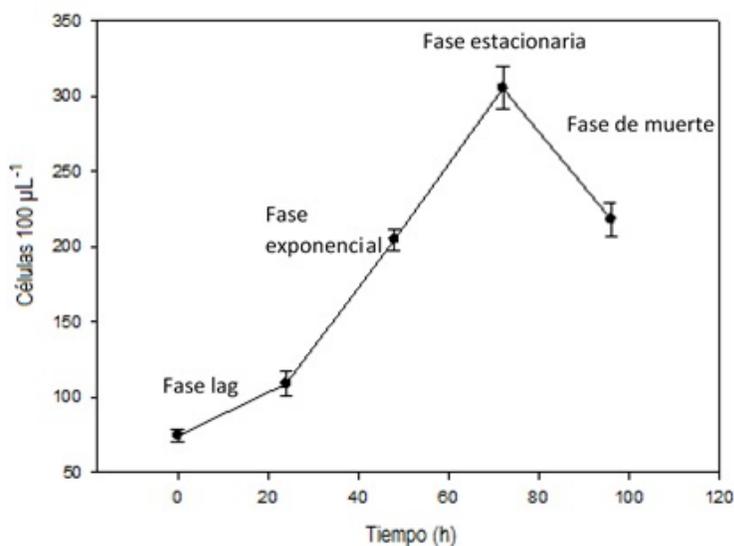


Figura 2. Curva de crecimiento de *P. aurelia*.

crecimiento y duplicación. Al término de esta fase, inicia la fase de muerte.

En la Tabla 1, se observa que la biomasa producida de *P. aurelia* es baja (74.1 mg L^{-1}), aún y cuando la producción de biomasa se realizó en un bio-reactor controlado. Por lo que es importante efectuar estudios que permitan incrementar su densidad poblacional y la producción de biomasa. Para el contenido de humedad en la biomasa de *P. aurelia* se tuvieron valores de 76 %, con contenido proteico promedio del 48.6 %.

El contenido de ácidos grasos encontrados en la biomasa de *P. aurelia* son de tipo monoinsaturado (oleico) y poliinsaturado (linoleico, gama-linolénico y araquidónico), lo que le confiere propiedades nutracéuticas (Tabla 2). La variación entre los cultivos, aun cuando estos se realizaron bajo condi-

ciones estandarizadas, puede atribuirse a la oxidación de los ácidos grasos por efecto del periodo de almacenamiento. Se infiere que un efecto similar ocurrió con la vitamina D3 que tiene una gran desviación estándar. Para las vitaminas (A y E) se tiene una baja desviación estándar, lo que indica una mayor capacidad para permanecer estables.

DISCUSIÓN

El microorganismo estudiado pertenece a la especie *P. aurelia*, debido a que sus genes tiene un 99 % de compatibilidad con los genes depositados en el Genbank[®] para la especie, pero también las características morfológicas coinciden con las características de *P. aurelia* (Luna-Pabello 2006, Przyboś et al. 2008, Catania et al. 2009). En la figura

Tabla 1. Caracterización de la biomasa de *P. aurelia*.

Parámetro	Promedio	DS
Número de células en 100 μL	305	19
Humedad (%)	75.7	0.7
Biomasa seca (mg L^{-1})	74.13	0.01
Proteína (mg L^{-1})	36.01 (48.6 %)a	1.47
Lípidos totales (mg L^{-1})	27.83 (37.5 %)a	0.90
Ácido oleico (C18:1) (mg L^{-1})	5.78 (20.8 %)b	3.09
Ácido linoleico (C18:2 ω -6) (mg L^{-1})	3.09 (11.1 %)b	0.60
Ácido γ -linolénico (C18:3 ω -6) (mg L^{-1})	1.01 (3.6 %)b	0.99
Ácido α -linolénico (C18:3 ω -3) (mg L^{-1})	0.73 (2.6 %)b	0.34
Ácido Araquidónico (C20:4 ω -3) (mg L^{-1})	1.68 (6.0 %)b	1.20
Ácido Eicosapentaenoico (C20:5 ω -3) (mg L^{-1})	0.18 (0.6 %)b	0.08
Retinol (Vitamina A) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	6.02 (81.27 $\mu\text{g g}^{-1}$)a	2.47
Colecalciferol (Vitamina D3) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	333.16 (4.49 mg g^{-1})a	91.33
Tocoferol (Vitamina E) (mg L^{-1})	2.13 (28.73 mg g^{-1})a	0.97

aContenido relativo porcentual (%) respecto a la biomasa seca, b Contenido relativo, porcentual (%) respecto a los lípidos totales, DS desviación estándar.

Tabla 2. Comparación entre el contenido de lípidos y ácidos grasos de algunas algas y el de *P. aurelia* en base seca.

Microorganismo	Porcentaje de lípidos (%)	mg L^{-1} del ácido graso respecto a lípidos totales						Fuente
		C18:1	C18:2	C18:3, ω -6	C18:3, ω -3	C20:4	C20:5	
<i>Spirulina platensis</i>	11	32.8-35.7	10.3-14.4	18.3-24	0.6	0.34-0.41	2.2-2.9	Chacón-Lee, y González-Mariño 2010
<i>Chlorella vulgaris</i>	56.8	48.2	8.5	11.6	-	>2.0	>2.0	Draaisma et al. 2013
<i>Scenedesmus obliquus</i>	12-14	3.0-9.4	1.2-1.7	0.3-3.5	5.5-21.9	0.06-0.2	-	Chacón-Lee, y González-Mariño 2010
<i>Isochrysis galbana</i>	17.2	19.7	1.1	0.5	0.5	1.1	1.9	Chacón-Lee, y González-Mariño 2010
<i>Scenedesmus</i> sp.	37.1	46.2	15.9	1.0	-	>2.0	>2.0	Griffiths et al. 2012
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	26.3	9.2	2.8	>2.0	-	4.9	2.8	Griffiths et al. 2012
<i>P. aurelia</i>	37.5	20.8	11.1	3.9	2.6	6.0	0.6	Datos encontrados

2, se observa un crecimiento exponencial típico de los protozoos, con las distintas fases en la curva de crecimiento indicadas por DeLong y Vasseur (2012), que inician con la fase de adaptación al medio de cultivo, seguido de la fase de crecimiento exponencial, finalizando con la fase de muerte.

Aunque algunas algas presentan un contenido de proteína mayor al obtenido de 48.6 %, como *Scenedesmus obliquus* (50-56 %), *Spirulina platensis* (63 %), *Arthrospira maxima* (60-71 %) (Chacón-Lee y González-Mariño 2010) y *Chlorella vulgaris* (55-67 %) (Christaki et al. 2011), otras tienen un contenido similar, como *Chlamydomonas reinhardtii* (48 %) (Chacón-Lee y González-Mariño 2010)

y *Haematococcus pluvialis* (48 %) (Christaki et al. 2011), lo cual permite suponer que el contenido proteico de *P. aurelia* es factible de ser utilizado como suplemento. Siempre y cuando se compruebe la digestibilidad de la proteína y que no tenga toxicidad (AOAC 2012). El contenido de proteína de *P. aurelia* en base seca, es mayor que el contenido de la leche (26 %), carne (43 %), soya (37 %) y levadura (39 %) (Spolaore et al. 2006).

El contenido total de lípidos de *P. aurelia* fue de 37.5 %, valor que es menor a los 56.8 % de *C. vulgaris*, pero similar al contenido de 37.1 % de *Scenedesmus* sp. y mayor al contenido de lípidos de otras algas (Tabla 2). En la biomasa de *P. aure-*

lia se encontraron los ácidos grasos oleico (C18:1), linoleico (C18:3 ω -3), gama-linolénico (C18:3 ω -6) y araquidónico (20:4), así como las vitaminas A, D3 y E, que son sustancias nutraceuticas.

Las algas que tienen una mayor proporción de ácido oleico son *C. vulgaris* (48.2 %), *S. platensis* (32.8 - 35.7 %), y *Scenedesmus* sp. (46.2 %) (Tabla 2). Sin embargo, tanto *S. platensis*, como *Scenedesmus* sp. tienen un contenido menor de lípidos que *P. aurelia*. En consecuencia, esta especie podría utilizarse como fuente de ácido oleico (5.7 mg L⁻¹). Por otra parte, *Scenedesmus* sp. es la única alga que cuenta con una proporción mayor de ácido linoleico (3.1 mg L⁻¹). El contenido de ácido araquidónico (1.7 mg L⁻¹) del ciliado es mayor que el contenido de otras especies de algas. Por lo que *P. aurelia* podría representar una fuente de ácidos grasos.

Las vitaminas contenidas en la biomasa de *P. aurelia*, y la proporción de tocoferol (vitamina E) de 28.73 mg g⁻¹ es similar al que presenta *Spirulina* sp. (29.4 mg g⁻¹) (Mendiola et al. 2008), pero superior al de especies como *Caulerpa sertularioides* (0.32 mg g⁻¹) (Pires-Cavalcante et al. 2011), *Porphyridium cruentum* (0.55 mg g⁻¹) (Lee 2013) y *Euglena gracilis* (7.35 mg g⁻¹) (Ogbonna 2009). Lo que sugiere que el ciliado es una fuente de esta vitamina. Al respecto se sabe que la ingesta diaria recomendada para hombres y mujeres es de 15 mg día⁻¹ (DRIs 2010), por lo que se requieren 500 mg de biomasa de *P. aurelia* para cubrir el 100 % de la ingesta diaria de la vitamina E. El porcentaje de retinol (vitamina A) de *P. aurelia* de 87.21 μ g g⁻¹ es superior al contenido de *Haematococcus*

pluvialis (0.09 μ g g⁻¹ equivalentes de retinol) y *A. gracilis* (70 μ g g⁻¹ equivalentes de retinol) (Bishop y Zubeck 2012, Chue et al. 2012). El colecalciferol (Vitamina D3) presente en la biomasa de *P. aurelia* (4.5 x 10⁵ μ g 100 g⁻¹), es superior al contenido encontrado en la tilapia (45.3 μ g 100 g⁻¹), el hígado de res (14.1 μ g 100 g⁻¹) y la yema de huevo (5.8 μ g 100 g⁻¹) (Schmid y Walther 2013).

CONCLUSIONES

El contenido proteico y nutraceutico en la biomasa seca de *P. aurelia*, es de 48.6 % de proteína y 37.6 % de lípidos formados por los ácidos grasos insaturados oleico (20.8 %), linoleico (11.1 %), gama-linolénico (3.6 %) y araquidónico (6.0 %). Además de las vitaminas A (retinol, 81.27 μ g g⁻¹), E (tocoferol, 28.73 mg g⁻¹) y D3 (colecalciferol, 4.49 mg g⁻¹). La biomasa de *P. aurelia* es una fuente no convencional de proteínas, ácidos grasos y vitaminas que tienen efectos nutraceuticos.

AGRADECIMIENTOS

A los revisores que permitieron enriquecer el contenido del manuscrito. Al apoyo recibido por medio de los proyectos UNAM, DGAPA-PAPIIT103312 y PAIP 5000-9111 y al Subprograma 127 "Formación Básica en Investigación" otorgado por la Facultad de Química de la UNAM. A la asistencia técnica del profesor Luciano Hernández Gómez.

LITERATURA CITADA

- Ali R, Athar M, Abdullah U, Abudiat AS, Qayyum M (2009) Nutraceuticals as natural healers: Emerging evidences. African Journal of Biotechnology 8: 891-898.
- APHA (American Public Health Association) (2012) Standard methods for the examination of water and wastewater, 22st edition, Washington DC, EUA. 1360p.
- AOAC (2012) Official Methods of Analysis of AOAC International Latimer G. J. Ed. 19th edition, Washington DC, EUA. 2610p.
- Badimon L, Vilahur G, Padro T (2010) Nutraceuticals and atherosclerosis: Human trials. Cardiovascular Therapeutics 28: 202-215.

- Barba FS, Grimi N, Vorabier E (2015) New approaches for the use of non conventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae. *Food Engineering Reviews* 7: 45-62.
- Bigliardi B, Galati F (2013) Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology* 31: 118-129.
- Bishop WM, Zubeck HM (2012) Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. *Journal Nutrition & Food Sciences* 2: 1-6.
- Catania F, Wurmser F, Potekhin A, Przyboś E, Lynch M (2009) Genetic Diversity in the *Paramecium aurelia* species complex. *Molecular Biology and Evolution* 26: 421-431.
- Chacón-Lee TL, González-Mariño GE (2010) Microalgae for "Healthy" foods-possibilities and challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9: 655-675.
- Chinnasamy S, Bhatnagar A, Hunt RW, Das KC (2010) Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology* 101: 3097-3105.
- Christaki E, Florou-Paneri P, Bonos E (2011) Microalgae: a novel ingredient in nutrition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 62: 794-799.
- Chue KT, Ten LN, Oh YK, Woo SG, Lee M, Yoo SA (2012) Carotenoid compositions of five microalga species. *Chemistry of Natural Compounds* 48: 141-142.
- DeLong PJ y Vasseur DA (2012) Size-density scaling in protists and the links between consumer-resource interaction parameters. *Journal of Ecology* 81: 1193-1201.
- Domínguez H (2013) *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. Woodhead Publishing Limited. UK. 768p.
- Draaisma RB, Wijffels RH, Slegers PM, Brentner LB, Roy A, Barbosa MJ (2013) Food commodities from microalgae. *Current Opinion in Biotechnology* 24: 169-177.
- DRIs (2010) Dietary Reference Intakes (DRIs): Recommended dietary allowances and adequate intakes, vitamins. http://www.nal.usda.gov/fnic/DRI/DRI_Tables/RDA_AI_vitamins_elements.pdf. Fecha de consulta 21 de octubre de 2014.
- Gad AS, Khadrawy YA, El-Nekeety AA, Mohamed SR, Hassan NS, Abdel-Wahhab MA (2011) Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and *Spirulina* in rats. *Nutrition* 27: 582-589.
- Ghosh D, Bagchi D, Konishi T (2015) *Clinical aspects of functional foods and nutraceuticals*. CRC Press. US. 445p.
- Griffiths MJ, van Hille RP, Harrison STL (2012) Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology* 24: 989-1001.
- Kelman D, Posner EK, McDermid KJ, Tabandera NK, Wright PR, Wright AD (2012) Antioxidant activity of Hawaiian marine algae. *Marine Drugs* 10: 403-416.
- Kovac DJ, Simeunovic JB, Babic OB, Mijan AC, Miloranovic I L (2013) Algae in food and feed. *Food & Feed Research* 40: 21-31.
- Lee JW (2013) *Advanced biofuels and bioproducts*. Springer. USA. 1122p.
- Luna-Pabello VM (2006) *Atlas de ciliados y otros microorganismos frecuentes en sistemas de tratamiento aerobio de aguas residuales*. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 95p.

- Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, De Caterina R (2010) Nutraceuticals and prevention of atherosclerosis: focus on ω -3 polyunsaturated fatty acids and Mediterranean diet polyphenols. *Cardiovascular Therapeutics* 28: 13-19.
- Mc Clements DJ, Li I, Yiao H (2015) The nutraceutical bioavailability classification scheme: Classifying nutraceuticals according to factors limiting their oral bioavailability. *Annual Review of Food Science and Technology* 6: 299-327.
- Mendiola JA, García-Martínez D, Rupérez FJ, Martín-Álvarez PJ, Reglero G, Cifuentes A, et al. (2008) Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE. *Journal of Supercritical Fluids* 43: 484-489.
- Ogbonna JC (2009) Microbiological production of tocopherols: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84: 217-225.
- Patil PS, Patil KN, Dudhgaonkar TD, Mohite Ks, Maydum CS (2016) A review on phytochemicals as Nutraceuticals. *International Journal for Innovative Research in Science & Technology* 2: 254-260.
- Pires-Cavalcante KMS, Barroso AD, Barbosa SM, Holanda SA, Saker-Sampaio S (2011) Seasonal changes of α -tocopherol in green marine algae (*Caulerpa* genus). *Journal of Food Science* 76: 775-781.
- Pon RT (1996) Infusoria and paramecium cultures. *The Calquarium* 38(10). http://www.calgaryaquariumsociety.com/Articles/Infusoria_And_Paramecium_Cultures.html. Fecha de consulta 21 de octubre 2014.
- Przyboś E, Surmacz M (2010) New world-wide data on the distribution of dpecies of the *Paramecium aurelia* complex (ciliophora, protozoa). *Folia Biologica* 58: 185-188.
- Schmid A, Walther B (2013) Natural vitamin D content in animal products. *Advances in Nutrition. An International Review Journal* 4: 453-462.
- Shahidi F (2009) Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. *Trends in Food Science & Technology* 20: 376-387.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A (2006) Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 87-96.