



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Estrategia para la determinación del contenido proteico y de sustancias
nutracéuticas en cultivos de *Paramecium* sp.

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

MANUEL SACRISTÁN DE ALVA



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Silvia de Jesús Mendoza Arellano

VOCAL: Profesor: Víctor Manuel Luna Pabello

SECRETARIO: Profesor: Luz Sandra Sánchez del Ángel

1er. SUPLENTE: Profesor: Agustín Reyo Herrera

2° SUPLENTE: Profesor: Luciano Hernández Gómez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

EXPERIMENTAL, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

SUPERVISOR TÉCNICO: M EN C LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

SUSTENTANTE: MANUEL SACRISTÁN DE ALVA

Índice

Resumen	1
1 Introducción.....	2
2 Objetivos e hipótesis	4
2.1 Objetivo general	4
2.2 Objetivos específicos	4
2.3 Hipótesis	4
3 Marco teórico.....	5
3.1 Importancia de los nutraceuticos.....	5
3.2 Nutraceuticos en otros organismos	8
3.3 Generalidades sobre los ciliados	11
3.4 Generalidades sobre <i>Paramecium</i> sp.....	12
3.5 Generalidades sobre <i>Paramecium aurelia</i>	15
4 Metodología.....	16
4.1 Selección del microorganismo.....	17
4.2 Aislamiento de microorganismos del género <i>Paramecium</i>	17
4.3 Selección del medio de cultivo	17
4.4 Mantenimiento de los cultivos de <i>Paramecium</i>	17
4.5 Identificación y reconocimiento de la especie de <i>Paramecium</i>	18
4.6 Cultivo de <i>Paramecium</i> sp. a nivel matraz	19
4.7 Cultivo de <i>Paramecium</i> sp. en un bio-reactor.....	19
4.8 Obtención de la biomasa	20
4.9 Determinación cuantitativa para sustancias nutraceuticas	20
4.9.1 Humedad	20
4.9.2 Proteína	20
4.9.3 Ácidos grasos	21
4.9.4 Vitaminas.....	22
4.9.5 Elementos traza.....	23
5 Resultados	24
5.1 Selección del medio de cultivo	24
5.2 Identificación y reconocimiento de la especie de <i>Paramecium</i> sp.	24
5.3 Cultivo de <i>Paramecium aurelia</i> a nivel matraz.....	31
5.4 Cultivo de <i>Paramecium aurelia</i> en bio-reactor	31
5.5 Obtención de la biomasa de <i>Paramecium aurelia</i> a partir de los cultivos en el bio-reactor	39
5.6 Determinación cuantitativa para sustancias nutraceuticas	40

5.6.1	Humedad	40
5.6.2	Proteína	40
5.6.3	Ácidos grasos	41
5.6.4	Vitaminas	45
5.6.5	Elementos traza	47
6	Análisis y discusión	48
6.1	Selección del medio de cultivo adecuado	48
6.2	Condiciones óptimas de cultivo a nivel bio-reactor	48
6.3	Obtención de la biomasa de <i>Paramecium aurelia</i> a partir de los cultivos en el bio-reactor	49
6.4	Determinación cuantitativa de sustancias nutraceuticas	49
6.4.1	Humedad	49
6.4.2	Proteína	50
6.4.3	Ácidos grasos	50
6.4.4	Vitaminas	52
6.4.5	Elementos traza	54
7	Conclusiones	56
8	Bibliografía	58
9	Anexos	62
9.1	Anexo A. Medios de cultivo	62
9.2	Anexo B. Técnicas de tinción	62
9.3	Anexo C. Fórmula y estructura de ácidos grasos con actividad nutraceutica ...	65
9.4	Anexo D. Límite de detección del método de absorción atómica	65

Reconocimientos

Se hace patente el apoyo recibido por parte del proyecto DGAPA PAPIIT IN-107209, así como del PAIP FQ-VMLP 6190-14 de 2009 y 2010.

Al subprograma 127 formación básica en investigación de la Facultad de Química de la UNAM.

Se reconoce el apoyo técnico brindado, para la realización de esta a los profesores Guadalupe Tsuzuki Reyes y Luciano Hernández Gómez.

Se reconoce el apoyo brindado en la realización de las tinciones de *Paramecium* a la bióloga Margarita Reyes Santos del Laboratorio de Protozoología de la Facultad de Ciencias de la UNAM .

Se reconoce el apoyo brindado por el Dr. Felipe Vázquez (†) del laboratorio de Físicoquímica del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM por la determinación de metales en *P. aurelia*.

Se reconoce el apoyo dado a Rosa María Castillo por la realización del perfil de ácidos grasos en *P. aurelia* y a Sara Montaña por la cuantificación de vitaminas liposolubles en *P. aurelia*, ambas del Departamento de Nutrición Animal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Se reconoce el apoyo dado por Lourdes Patricia Castro Ortiz para el cultivo y aislamiento de *P. aurelia*.

Se reconoce el apoyo dado por Jaime Arturo Ávila Licona en toda la parte de biología molecular.

Agradecimientos

A mis padres por el apoyo que me brindaron durante toda la carrera.

A Ayerim por estar a mi lado y por sus consejos.

A toda mi familia.

Al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Experimental: Edgar, Jorge, Holdayara, Mabel, Liliana, Ana, Sergio, Ale, Mónica, Hugo, Benjamín, Toño, Rafa, Héctor, Paty, Arturo, Alma, Jazmín, Arturo.

A la gente que conocí durante la carrera: Polo, Pável, Paloma, Chiva, Azalia, Diana, Azalia, Itzel, Mauricio, Daniel, Carlos, Carlos Daniel, Cristina, Carlos.

Resumen

Recientemente ha habido un interés en los productos que promueven la salud, estos han sido llamados alimentos funcionales o nutraceuticos. Los alimentos funcionales o nutraceuticos pueden proveer beneficios fisiológicos, nutricionales y energéticos además de efectos antihipertensivos, antioxidantes y antiinflamatorios. Las algas y microalgas han recibido atención por su contenido en ingredientes funcionales como ácidos grasos poliinsaturados, pigmentos con propiedades antioxidantes, polisacáridos sulfatados y esteroides que funcionan como agentes antimicrobianos, pero no se han realizado estudios sobre la presencia de estos compuestos de manera tan amplia en otros microorganismos. El objetivo de este proyecto es proponer una estrategia que permita aislar de una fuente natural un protozoo del género *Paramecium*. Una vez aislado el protozoo se va a identificar la especie de *Paramecium* mediante técnicas de reconocimiento morfológico, infraciliatura y PCR.

El protozoo se cultivó axénicamente, en un medio de cultivo adecuado para su crecimiento. El medio de cultivo se eligió haciendo crecer al protozoo *Paramecium* en distintos medios de cultivo para determinar cuál era el más adecuado para el crecimiento de esta especie. Una vez que se ha seleccionado el medio de cultivo adecuado para el crecimiento del protozoo se mantuvieron los cultivos del mismo mediante resiembras e incubándolos a una temperatura óptima de crecimiento. El medio de cultivo seleccionado también se utilizó para cultivar el protozoo a nivel matraz, este cultivo se utiliza como inóculo para el cultivo de *Paramecium* en un bio-reactor en donde se cultiva al microorganismo en un volumen aproximado de 2.5L. Se realiza un cultivo en el bio-reactor para obtener la mayor cantidad de biomasa posible para realizar las pruebas posteriores. La biomasa se separa del medio de cultivo mediante centrifugación y filtración. Una vez separada la biomasa del medio de cultivo se realizaron las pruebas para la determinación y cuantificación de las sustancias nutraceuticas y de proteína en la biomasa del protozoo.

El contenido proteico se determinó mediante la cuantificación del nitrógeno total de la biomasa. Las sustancias nutraceuticas que se determinaron son algunos ácidos grasos (ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquidónico, ácido docosahexanoico, ácido eicosapentanoico), algunas vitaminas liposolubles (A, D y E) que se cuantificaron mediante métodos cromatográficos, y algunos minerales (Fe, Ca, Cu, Se, Mg, K o Cr) los cuales se cuantificaron mediante espectrometría de absorción atómica. Estas sustancias ya tienen una actividad nutraceutica probada.

1 Introducción

Un nutraceutico se define como cualquier sustancia que sea considerada un alimento o parte de un alimento que además de sus efectos nutricionales provee beneficios médicos o de salud demostrados, mejorando el estado de salud o reduciendo el riesgo de alguna enfermedad (Andlauer y Fürst, 2002). Un alimento puede ser considerado funcional si además de sus efectos nutricionales tiene un efecto benéfico demostrado para una o más funciones del organismo humano, mejorando el estado de salud o reduciendo el riesgo de alguna enfermedad (Plaza *et al.*, 2008). Se ha encontrado que una gran cantidad de componentes de los alimentos que tienen relación con la salud, cuya deficiencia produce enfermedad, son componentes activos efectivos para promover la salud, prevenir enfermedades e incluso curarlas (Ali *et al.*, 2009).

En los últimos años ha habido un interés en los alimentos funcionales ya que pueden proveer beneficios fisiológicos, nutricionales y energéticos además de efectos antihipertensivos, antioxidantes y antiinflamatorios (Herrero *et al.*, 2006).

En la actualidad no existe un método específico para la extracción de las sustancias nutraceuticas producidas por un microorganismo, por lo general la ingesta de estas sustancias se realiza mediante el consumo del microorganismo completo. El análisis de los suplementos alimenticios presenta muchos retos debido a la falta de información para identificar y aislar los ingredientes activos de ciertos materiales y productos. El desarrollo de métodos para un suplemento está basado en la identificación de su componente activo, la determinación de la cantidad disponible de este componente en la materia en crudo y establecer la cantidad de este componente que se debe incluir en el producto final (Sullivan y Crowley, 2006). Si se encuentra alguna sustancia con propiedades nutraceuticas en estos microorganismos hay que determinar si estos están biodisponibles y que no estén presentes factores antinutritivos ni tóxicos (Reboloso *et al.*, 2000).

A la fecha los estudios que se han hecho sobre la presencia de sustancias nutraceuticas se ha realizado casi exclusivamente con algas y microalgas ya que estas son una fuente interesante de diversos compuestos con actividad biológica que pueden ser utilizados como ingredientes funcionales. Los antioxidantes son los compuestos que han atraído mayor interés en las algas (Plaza *et al.*, 2008). Existen reportes de varias algas comestibles indicando que contienen cantidades significativas de proteínas, vitaminas, y minerales esenciales para la nutrición humana (Norziah y Ching, 2000). Las microalgas pueden ser utilizadas para aumentar el contenido nutricional de ciertos alimentos o para afectar de forma positiva la salud humana.

Esto se debe a que aunque muchas algas tienen un contenido bajo de lípidos, entre estos se encuentran varios de las familias de los ácidos grasos ω -3 y ω -6 (Spolaore *et al.*, 2006).

Las algas también podrían ser utilizadas como suplemento proteínico, el desarrollo de alimentos funcionales podría utilizar algas marinas, sobre todo las especies ricas en proteínas. Para determinar el valor nutritivo de las proteínas se deben realizar ensayos de digestibilidad. Se ha visto que hay varias especies de algas que podrían ser utilizadas como fuente de alimento para nutrición humana y animal (Fleurence, 1999). En las algas por lo general no se aísla la proteína para su uso en alimentos debido a razones técnicas y económicas, se utiliza toda la biomasa de éstas. Esto tiene algunas ventajas ya que las algas además de las proteínas contienen otros nutrientes como carbohidratos, lípidos, vitaminas, pigmentos, minerales y otros elementos traza. La calidad nutricional de la proteína se mide de acuerdo al contenido, la proporción y disponibilidad de los aminoácidos. Aunque las algas tienen un alto contenido de proteínas no se han utilizado como alimentos debido a la consistencia de la biomasa seca, su color y el olor que tiene, además los costos para el cultivo de algas son altos. Más recientemente se ha utilizado en algunos casos a las algas como una fuente de proteínas en alimentos para animales (Becker, 2007).

Los ciliados son microorganismos de estructura compleja y de entre los protozoos son los más grandes. Reciben este nombre debido a la presencia de numerosas estructuras denominadas cilios que se presentan al menos en alguna etapa de su ciclo de vida. Cada célula ciliada presenta un citostoma (boca) conectada a una citofaringe al final de la cual se encuentran las vacuolas digestivas que es donde la célula digiere y absorbe el contenido alimenticio, para finalmente eliminar los materiales no digeribles a través del citoprocto o citopigio (Luna-Pabello, 2006). Los ciliados libres nadadores se encuentran ampliamente distribuidos en cuerpos de agua dulce y representan un eslabón muy importante de la cadena alimenticia. De manera particular, el género *Paramecium* es fácil de mantener a nivel laboratorio, debido a que su cultivo es simple y económico, por lo que han sido frecuentemente utilizados para investigación científica. Sin embargo, a la fecha, no existen estudios relacionados con su capacidad para producir sustancias nutraceuticas.

2 Objetivos e hipótesis

2.1 Objetivo general

Proponer una estrategia que permita determinar el contenido proteico y de sustancias nutraceuticas en *Paramecium* sp.

2.2 Objetivos específicos

Identificar la especie de *Paramecium* empleada en el desarrollo del proyecto.
Seleccionar un medio de cultivo adecuado para el cultivo de la especie de *Paramecium* empleada.
Determinar las condiciones óptimas para el cultivo de esta especie de *Paramecium* en un bio-reactor.
Determinar el contenido proteico de *Paramecium* sp. bajo condiciones controladas de laboratorio.
Determinar el contenido de ciertas sustancias con actividad nutraceutica presentes en *Paramecium* sp.

2.3 Hipótesis

Si existen concentraciones importantes de proteína y/o compuestos nutraceuticos en la biomasa de *Paramecium* sp., entonces es posible que sea usado como suplemento alimenticio.

3 Marco teórico

3.1 Importancia de los nutraceuticos

Recientemente ha habido un interés en los productos que promueven la salud, estos han sido llamados alimentos funcionales (Plaza *et al.*, 2008).

El ácido docosahexanoico (DHA) es un ácido graso poliinsaturado ω -3 y es uno de los componentes mayoritarios de la materia gris y de los fosfolípidos de la retina y los espermatozoides. Se cree que el mantener niveles adecuados de DHA en el cerebro y la retina es importante para un buen funcionamiento del sistema nervioso y visual y para reducir la tendencia trombótica y la hipertriacilglicerolemia. Debido al alto contenido de DHA en el cerebro, una deficiencia de este ácido graso puede afectar la habilidad para aprender (Linko y Hayakawa, 1996).

El DHA es esencial para el crecimiento y desarrollo del cerebro en infantes y también se requiere para el mantenimiento de las funciones del cerebro en adultos. Las deficiencias de DHA están asociadas a déficit de atención, desorden de hiperactividad, fibrosis quística, fenilcetonuria, depresión unipolar, hostilidad agresiva y adrenoleucodistrofia. Un decremento de DHA en el cerebro está asociado con un declinamiento cognitivo durante el envejecimiento y un desarrollo esporádico del Alzheimer. El DHA tiene un efecto positivo en enfermedades como la hipertensión, la artritis, la arterosclerosis, depresión, desarrollo de diabetes mellitus en adultos, infarto al miocardio y algunos cánceres (Horrocks y Yeo, 1999).

Estudios clínicos y epidemiológicos establecen que el ácido linoleico, ácido graso ω -6, y ciertos ácidos grasos ω -3, como el ácido linolénico, el ácido eicosapentanoico (EPA) y el DHA protegen de manera colectiva contra el síndrome coronario. El ácido linoleico es el ácido graso que juega un papel más importante en la regulación del metabolismo de las lipoproteínas de baja densidad reduciendo su producción y aumentando su excreción. Este ácido graso es el más potente reductor del colesterol total en plasma y las lipoproteínas de baja densidad, los cuales están establecidos como factores de riesgo en el síndrome coronario. Otros estudios en hombres y mujeres sugieren que este ácido graso protege contra muertes cardiacas e infartos al miocardio no fatales. Los ácidos grasos ω -3, especialmente EPA y DHA, son potentes agentes antiarrítmicos e hipotriacilglicerolémicos. Además los ácidos grasos EPA y DHA también reducen la presión arterial, el nivel sérico de triglicéridos y el riesgo de la enfermedad isquémica del corazón (Wijendran y Hayes, 2004). Una suplementación de ácidos grasos ω -3 en pacientes con diabetes tipo 2 tiene un efecto favorable

disminuyendo los triglicéridos y el colesterol VLDL y reduciendo la presión arterial y los marcadores inflamatorios (Davi *et al.*, 2010).

El ácido araquidónico es utilizado como un suplemento alimenticio para la formación de prostaglandinas antiinflamatorias, además ayuda a disminuir el contenido de lipoproteínas de baja densidad en la sangre en pacientes hipercolesterolémicos. Este compuesto ayuda a mejorar los efectos de ciertas enfermedades como diabetes, esclerosis múltiple, dermatitis, diabetes y artritis reumática (Sajilata *et al.*, 2008).

Los ácidos grasos ω -9 como el ácido oleico no son ácidos grasos esenciales, sin embargo juegan un rol moderado reduciendo el colesterol plasmático en el cuerpo. Al parecer el ácido oleico tiene un efecto similar en el colesterol que el ácido linoleico y es menos susceptible a la oxidación que este último, por lo que se ha intentado incrementar la relación entre ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos poliinsaturados en los aceites de algunas semillas (Osborn y Akoh, 2002). Los ácidos grasos saturados y los ácidos grasos trans se relacionan con un elevado riesgo cardiovascular mientras que los ácidos grasos monoinsaturados ω -9 y los poliinsaturados ω -3 y ω -6 reducen el riesgo de una enfermedad del corazón. Varios estudios han demostrado que la ingesta de ácidos grasos monoinsaturados tiene ventajas adicionales incluyendo la prevención de arritmias, bajando la presión arterial y disminuyendo la coagulación (Badimon *et al.*, 2010).

Está reportado que los micronutrientes juegan un papel importante en funciones inmuno-fisiológicas y su deficiencia puede suprimir las respuestas inmunes, mientras que su acumulación es inmunotóxica. El α -tocoferol es un componente esencial de la membrana celular, incluyendo las membranas nuclear y mitocondrial. Ha sido reportado que su deficiencia perjudica la generación de moléculas inmunoreactivas (citocinas y prostaglandina), la producción y secreción de inmunoglobulinas, la expresión de marcadores de superficie y causa daños a la membrana celular de los linfocitos. La deficiencia de vitamina A resulta en la supresión de la fagocitosis, la respuesta a anticuerpos específicos y un tipo de hipersensibilidad retardada. El cobre y el zinc están envueltos en algunas funciones inmunes importantes, su deficiencia ha sido reportada como perjudicial para la producción y secreción de componentes inmunoreguladores (Islam *et al.*, 2005).

Las especies de oxígeno reactivo y los radicales libres juegan un rol mayoritario en la patofisiología de la arterioesclerosis y la suplementación con antioxidantes como las vitaminas A, C, E, ácido fólico, β -caroteno, selenio y zinc protegen contra la arterioesclerosis (Badimon *et al.*, 2010).

Además de las funciones inmunes, muchos de los micronutrientes actúan como defensa contra el ataque de radicales libres y la peroxidación de lípidos. El α -tocoferol, el ácido ascórbico y el β -caroteno (pro-vitamina A) son poderosos antioxidantes. El α -tocoferol es el mayor antioxidante liposoluble que protege a las células contra la peroxidación lipídica. Algunos elementos traza como el cobre, el zinc, el manganeso y el selenio también actúan como antioxidantes a través de su incorporación a enzimas específicas (Islam *et al.*, 2005).

La vitamina E es una mezcla de vitaminas liposolubles clasificadas como tocoferoles y tocotrienoles. Hay una fuerte evidencia epidemiológica entre altos niveles de tocoferol en sangre y la protección contra el desarrollo de una enfermedad cardiovascular, cáncer y demencia. El γ -tocoferol tiene funciones antiinflamatorias y antineoplásicas. Un estudio señala que la suplementación con vitaminas E y C mejora dramáticamente el estatus oxidativo en pacientes con hemodiálisis disminuyendo la formación de peróxidos a partir de lípidos. El efecto neuroprotectivo de la vitamina E ha sido demostrado por su habilidad de proteger ciertas neuronas en un modelo de enfermedad de Parkinson en ratas. Otro estudio propone que la suplementación con vitamina E parenteralmente puede ser una estrategia efectiva para prevenir o tratar la enfermedad de Parkinson. De los diferentes isómeros de la vitamina E el α -tocotrienol presentó el más potente efecto antiapoptótico neuroprotectivo en neuronas del sistema nervioso central. Estos efectos se atribuyen a las funciones no antioxidantes y puede explicar los efectos benéficos de la vitamina E como el tratamiento del Alzheimer con α -tocoferol. Debido a que los desordenes neurodegenerativos envuelven estrés oxidativo y apoptosis de neuronas, estos isómeros de la vitamina E juegan un papel importante en el tratamiento de estas enfermedades (Eskin y Tamir, 2006). La vitamina E facilita la absorción de la vitamina A en el intestino previniendo su oxidación y aumenta su acción antioxidante en presencia de zinc (Birujete *et al.*, 2009).

La forma activa de la vitamina D (1- α -25-dihidroxi D₃) juega un papel crucial en la homeostasis del calcio y los huesos. Se ha visto que la forma activa de esta vitamina previene el crecimiento de varias células neoplásicas en cáncer de próstata, cáncer de mama, osteosarcoma y carcinoma del colon, pero su uso en prevención del cáncer está limitado por su actividad calcémica (Eskin y Tamir, 2006). Una deficiencia en vitamina D está generalmente asociada con obesidad y diabetes tipo 2, probablemente debido a que la vitamina se deposita en las reservas de grasa lo que la hace menos biodisponible. Los sujetos obesos con deficiencia de vitamina D tienen niveles elevados de hormona paratiroidea, lo que puede ocasionar una baja sensibilidad a la insulina a través de un incremento desproporcionado del Ca²⁺. Una ingesta de vitamina D en infantes puede reducir el riesgo de desarrollar diabetes tipo 1 (Daví *et al.*, 2010).

Se ha visto que el Cr(III) es un micronutriente esencial requerido para el metabolismo de macronutrientes. Debido a que las dietas son pobres en este elemento traza y que además es de los que menos se absorbe se presentan problemas de resistencia a insulina, hiperglicemia y anomalías lipídicas por su deficiencia. Estudios realizados indican que la suplementación con Cr(III) y ejercicio ayudan a la pérdida de peso sin afectar la masa muscular. Estudios en animales indican que el Cr(III) reduce los niveles plasmáticos de colesterol LDL y triglicéridos e incrementa los niveles de colesterol HDL. Estos estudios pusieron en evidencia que el Cr(III) está implicado en la regulación de ciertos genes del tejido graso (Lau *et al.*, 2008).

El hierro interviene en la estructura de la hemoglobina y en la actividad enzimática de algunas reacciones celulares, además de intervenir en la cadena respiratoria. Para mejorar la absorción de hierro es aconsejable el consumo de alimentos con alto contenido de vitamina C, la absorción es favorecida dado que la acidez gástrica cambia la forma férrica a ferrosa que se absorbe mejor (Birute *et al.*, 2009).

El calcio actúa como mediador intracelular cumpliendo una función de segundo mensajero, por ejemplo, el ion Ca^{2+} interviene en la contracción de los músculos. También está implicado en la regulación de algunas enzimas que actúan en fosforilación, tiene funciones enzimáticas similares a las del magnesio, en los procesos de transferencia de fosfato. Está vinculado con el fósforo por lo que la falta o exceso de cualquiera de estos micronutrientes afecta la absorción del otro (Birute *et al.*, 2009).

En los últimos años el selenio ha sido reconocido como un nutriente biológico importante. La insuficiencia de su ingesta en la dieta para satisfacer sus requerimientos biológicos tiene consecuencias adversas en la susceptibilidad a enfermedades y el mantenimiento de la salud. Este elemento también parece ser activo a niveles supranutricionales, mayoritariamente en el campo de la prevención del cáncer y posiblemente también a niveles farmacológicos como adyuvante en el tratamiento de ciertos cánceres (Néve, 2002).

3.2 Nutracéuticos en otros organismos

Las algas y microalgas han recibido atención por su contenido en ingredientes funcionales como ácidos grasos poliinsaturados, pigmentos con propiedades antioxidantes, polisacáridos sulfatados y esteroides que funcionan como agentes antimicrobianos. Los antioxidantes son de gran interés debido a que se pueden utilizar para inhibir la oxidación de lípidos y para mejorar la salud humana (Herrero *et al.*, 2006). Algunas microalgas contienen polisacáridos con potencial acción antiviral. Las algas tienen un alto contenido en fibra dietética. También contienen una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados. Otros compuestos de

interés son los esteroides que ayudan a reducir los niveles de colesterol en sangre y tienen propiedades antiinflamatorias, antibacteriales, antifúngicas y antitumorales (Plaza *et al.*, 2008).

El alga *Porphyridium cruentum* acumula una gran cantidad de lípidos, especialmente ácido araquidónico y ácido eicosapentanoico, tiene un alto contenido proteico, además de tocoferol, vitamina K y carotenos. La biomasa tiene un contenido suficiente para la ingesta diaria recomendada en minerales como sodio, potasio, calcio y magnesio. Debido a que estos minerales si están biodisponibles y no se detectaron factores antinutritivos ni tóxicos, esta alga podría ser utilizada para propósitos nutricionales ya que contiene una gran diversidad de nutrientes (Reboloso *et al.*, 2000).

En un estudio se determinó la composición nutricional del alga *Gracilaria changgi*. Se vio que el contenido de proteínas de esta alga no es muy alto y que el contenido de lípidos es bajo como en la mayoría de las algas, pero esta alga tiene un alto contenido de vitamina C y contiene pigmentos carotenoides con actividad de provitamina A. Los lípidos contenidos en esta alga son en su mayoría ácidos grasos poliinsaturados, importantes para la salud humana. También tiene una alta concentración de fibra y de minerales. Por esta razón *G. changgi* es un potencial alimento nutritivo en las dietas humanas y puede ser utilizada en la industria alimentaria como un ingrediente con alto valor nutricional (Norziah y Ching, 2000).

El alga *Spirulina platensis* es una fuente potencial del nutraceutico ácido γ -linolénico, que es un intermediario para formar el ácido araquidónico. Se han hecho estudios de toxicidad con esta alga y se ha visto que no es tóxica (Sajilata *et al.*, 2008). Esta alga ha sido consumida por humanos debido a sus efectos nutricionales y sus posibles efectos medicinales. Se le ha prestado atención a esta especie debido a que es una fuente de proteína y por sus efectos nutraceuticos. Es una fuente de nutrientes como provitaminas, minerales y ácidos grasos poliinsaturados y algunos compuestos antioxidantes como las sustancias fenólicas. Se ha visto que esta alga reduce los niveles de colesterol en pacientes hipercolesterolémicos y se han demostrado las propiedades antioxidantes de sus ficobiliproteínas (Colla *et al.*, 2007). Otra microalga de interés del mismo género es *Spirulina maxima* debido a que se ha visto que el valor nutrimental de sus proteínas es muy parecido al de otras proteínas de plantas (Salazar *et al.*, 1996).

Chlorella es un alga verde unicelular que se encuentra tanto en agua fresca como en agua marina, y es ampliamente utilizada como suplemento alimenticio. Se le ha prestado atención últimamente para el desarrollo de alimentos funcionales y la producción de nutrientes esenciales para la salud humana. Un estudio determinó que el consumir un suplemento diario que contenga esta alga ayuda a reducir la presión

sanguínea y a mantenerla estable. También se han encontrado dos polisacáridos en esta alga que son responsables de una potencial actividad antitumoral (Sheng *et al.*, 2007).

Un alga que tiene una gran acumulación de pigmentos carotenoides es *Dunaliella salina*, los pigmentos que contiene tienen varias aplicaciones en productos nutricionales y para la salud. Hay un interés creciente en el uso y medida de la capacidad antioxidante tanto en las industrias farmacéutica y de alimentos como en estudios clínicos de estos pigmentos. Esta alga contiene β -caroteno, cuya actividad antioxidante es bien conocida, además es segura y puede ser una fuente potencial de suplementos alimenticios. Otros pigmentos producidos por esta alga son el α -caroteno, la luteína y el licopeno. Se ha probado que los β -carotenos naturales tienen una mayor biodisponibilidad y mayor capacidad antioxidante que los sintéticos (Murthy *et al.*, 2005)

El único ácido graso poliinsaturado comercialmente disponible obtenido de algas es el ácido docosahexanoico. Este ácido graso viene del alga *Cryptocodinium cohnii*. Las microalgas tienen una gran cantidad de aplicaciones en la nutrición tanto humana como animal (Spolaore *et al.*, 2006).

El género de algas *Enteromorpha* tiene un gran potencial para su explotación comercial debido a su abundante y variada composición química y la calidad y concentración de los nutrientes que son básicos para otros organismos. Los mayores constituyentes de este género son las proteínas y los minerales. De los 10 aminoácidos esenciales para el ser humano, 9 están presentes en estas algas. La digestibilidad de las proteínas es bastante alta y los factores antinutritivos que pudieran reducir el valor nutricional son escasos o nulos. Para usar esta alga como alimento también se realizaron análisis microbiológicos y todos estuvieron dentro de la norma. El contenido de lípidos era bajo, pero dentro de estos había un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados los cuales tienen beneficios en la salud de los humanos y animales. Esta alga es recomendada para consumo humano debido a que es rica en calcio y fósforo, contiene 9 de los 10 aminoácidos esenciales y contiene hemicelulosa la cual ayuda a la digestión y aumenta la producción de bilis ayudando en la digestión de las grasas (Aguilera *et al.*, 2005).

Algunas bacterias también han sido utilizadas como fuente de sustancias nutraceuticas, se ha visto que bacterias del género *Propionibacteria* son capaces de producir componentes benéficos para la salud humana. Es sabido que estos microorganismos son productores eficientes de vitamina B₁₂. Además algunas especies de este género pueden producir grandes cantidades de ácido fólico. Hay tres microorganismos que producen grandes cantidades de vitamina B₁₂, que son *Pseudomonas denitrificans*, *Bacillus megaterium* y

Propionibacterium, pero solamente *Propionibacterium* es un microorganismo de grado alimenticio por lo que es el único que puede utilizarse como suplemento alimenticio (Hugenholtz *et al.*, 2002).

El único estudio similar realizado con ciliados, aunque no fue para buscar nutraceuticos, se hizo con *Tetrahymena thermophila*, lo que se hizo fue incubar este protozoo no patógeno por periodos cortos de tiempo en leche ya que gracias a las enzimas que tiene puede transformar el colesterol en provitamina D₃ y otros derivados del colesterol $\Delta 7$ desaturado. El colesterol fue reducido a un 50 % de su contenido inicial en la leche después de un periodo de 12 h de incubación con suspensiones del ciliado vivo. Este ciliado también tiene desaturasas $\Delta 12$ de ácidos grasos que le dan la habilidad de desaturar ácidos grasos que toma del medio, transformando por ejemplo el ácido esteárico en ácido γ -linolénico (18:3, n-6), por lo que se observa un incremento de este ácido graso después de la incubación. *T. thermophila* también libera varias hidrolasas incluyendo proteasas, lipasas y fosfolipasas al medio extracelular lo que sirve para predigerir componentes complejos de varios alimentos, en la leche el perfil proteico cambia debido a la proteólisis con una reducción de la caseína, mejorando el contenido de aminoácidos. A pesar de estos cambios no hubo alteraciones marcadas de olor ni de sabor. También se encontró actividad extracelular de la lactasa con *Tetrahymena* con lo que además de reducir el colesterol aumentando los esteroides con actividad de provitamina D, aumentar algunos ácidos grasos esenciales e hidrolizar proteínas, también reduce los niveles de lactosa en la leche (Valcarce *et al.*, 2001).

3.3 Generalidades sobre los ciliados

Los ciliados son llamados de esta manera debido a la presencia de cilios simples u orgánulos ciliares compuestos, estos cilios simples o compuestos pueden estar repartidos en todo el cuerpo del microorganismos lo que se denomina ciliatura somática y sirve para la locomoción o alrededor de la boca o citostoma lo que se denomina ciliatura oral, teniendo como función la alimentación (Aladro *et al.*, 1990; Castro, 2004; Margulis *et al.*, 1990).

La infraciliatura es universal en los ciliados, se encuentra localizada debajo de la película y está representada por los gránulos basales o cinetosomas, fibrillas y microtúbulos asociados. La película es una membrana elástica con aspecto de celdillas rectangulares que cubren todo el organismo. La cinétida está compuesta por un cinetosoma y cada cilio surge de este; la hilera longitudinal de cinétidas se conoce con el nombre de cinetia (Aladro *et al.*, 1990), que coordina la locomoción (Castro, 2004; Margulis *et al.*, 1990).

Los ciliados tienen generalmente un citostoma (Fig. 1), variando su posición en los diferentes grupos; puede ser muy simple en su estructura o ser una zona compleja asociada con una cavidad bucal que contiene orgánulos ciliares complejos como la membrana paroral y las membranelas (Montes, 2006). Estos microorganismos son heterocariontes debido a que el aparato nuclear está formado por uno o más macronúcleos (Fig. 1) y uno o varios micronúcleos (Fig. 1); el macronúcleo regula el metabolismo del ciliado, mientras que el micronúcleo está involucrado en su genética y la recombinación sexual (Montes, 2006). Es frecuente la presencia de algunos orgánulos como vacuolas contráctiles o vesículas de expulsión del agua; el citoprocto (Fig. 1) o citopigio por donde descargan los materiales indigeribles (Aladro *et al.*, 1990; Margulis *et al.*, 1990). Son heterótrofos y los métodos y preferencias alimentarias muestran un amplio rango de variación, siendo bacterívoros, alguívoros, fungívoros, herbívoros, carnívoros, omnívoros y consumidores de materia orgánica (Aladro *et al.*, 1990). La reproducción ocurre a través de la fisión binaria. También, se reproducen parasexualmente, mediante conjugación, en la que se lleva a cabo el intercambio de micronúcleos (Margulis *et al.*, 1990).

3.4 Generalidades sobre *Paramecium* sp.

El género *Paramecium* ha sido utilizado para experimentos en el laboratorio debido a que es muy fácil encontrarlo en la naturaleza, su tamaño es comparativamente grande lo que los hace fáciles de observar y es posible cultivarlos sin mucha precaución ni dificultad. Las especies de *Paramecium* son ciertamente los ciliados más esparcidos en el mundo y los más fáciles de cultivar en el laboratorio (Van Wagtendonk, 1974).

Las especies de *Paramecium* se encuentran generalmente en estanques, lagunas, lagos, riachuelos, arroyos o cualquier fuente de agua estancada que constituya un ambiente adecuado para su crecimiento. No se conocen especies de agua marina aunque algunas se han encontrado en agua salobre o en estanques que contienen un poco de sal. El factor más importante que condiciona la presencia de *Paramecium* es la fuente de alimento, pero otros factores también tienen influencia como el pH, cantidad de oxígeno, temperatura, etc. Se alimentan esencialmente de bacterias, pero también son numerosos donde hay hojas o cualquier otro material vegetal en descomposición en agua poco profunda, de no más de 20 cm de profundidad y cerca del fondo, muy rara vez se encuentran en aguas profundas debido a que son microorganismos aerobios. Prefieren ambientes con pH cercano a la neutralidad (6.5 a 7.5) y es raro encontrarlos en ambientes ácidos. *Paramecium* tiene una gran capacidad de adaptación, sobre todo a diferencias de temperatura y ambientes salinos, lo que explica la gran distribución de sus diferentes especies en todos los continentes (Van Wagtendonk, 1974).

Paramecium es un organismo unicelular de forma alargada cuya longitud es variable dependiendo de la especie, puede medir de 80 a 350 μm de largo y de 40 a 80 μm de ancho. En el lado ventral tiene un largo surco que es la cavidad oral, la cual empieza en la parte anterior y continúa hasta la mitad o 2/3 del cuerpo del protozoo. La boca se sitúa en la parte posterior más alejada de esta cavidad, detrás de la boca está la cavidad oral (citostoma) (Fig. 1), al final de la cual se forman las vacuolas alimentarias (Fig. 1) en un área citoplasmática (citofaringe) (Fig. 1) limitada por sistemas fibrilares especiales. Entre la boca y la parte posterior del protozoo se encuentra el citoprocto (Fig. 1) donde los desechos resultantes de la digestión en las vacuolas alimentarias son excretados. En el lado dorsal se pueden ver los orificios de las vacuolas contráctiles (Fig. 1), que normalmente son dos, una en la parte anterior y una en la parte posterior, estas tienen movimientos alternados de contracción y dilatación (Van Wagtendonk, 1974).

La corteza de *Paramecium* consiste de unidades corticales llamadas cinetosomas que se repiten un gran número de veces de forma longitudinal de la parte anterior del protozoo a su parte posterior, cada fila longitudinal se denomina cinetia. Cada cinetosoma tiene un solo cilio y un tricocisto, (Fig. 1) que por lo general está insertado en el cinetosoma. En condiciones de estrés como la exposición de *Paramecium* a tóxicos o a depredadores los tricocistos se descargan al medio exterior como filamentos largos y estriados con una punta filosa. Los tricocistos tienen una función de defensa o protección contra depredadores de *Paramecium* (Beale y Preer, 2008).

Dentro de la célula de *Paramecium* existen varios organelos:

- el aparato nuclear que consiste de un macronúcleo y uno o más micronúcleos,
- las vacuolas contráctiles,
- las vacuolas alimentarias que se forman en el fondo de la cavidad bucal debido a un fenómeno de fagocitosis y una vez formadas recorren un circuito más o menos regular en el citoplasma que por lo general va de la boca hacia la parte anterior, pasando por la parte posterior y regresando a la parte posterior donde está el citoprocto en donde se abren liberando los desechos de la digestión y
- todos los organelos que caracterizan a las células eucariontes (Van Wagtendonk, 1974).

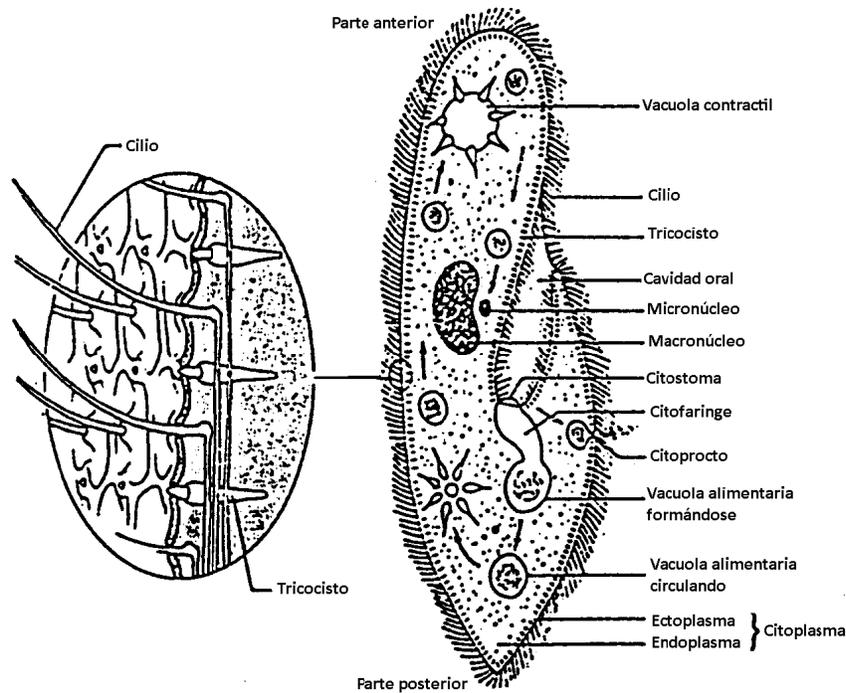


Figura 1. Morfología de *Paramecium*.

Los microorganismos del género *Paramecium* representan un eslabón muy importante dentro de la cadena alimentaria presente a lo largo del proceso de biodegradación de la materia orgánica existente, tanto en cuerpos de agua natural, como sometida a tratamientos biológicos. Estos microorganismos son los responsables de disminuir, de manera considerable, la cantidad de bacterias en suspensión presentes en los líquidos residuales parcialmente tratados, lo cual redundará en la disminución del grado de turbiedad, debido al efecto depredador (Silva, 2008).

Debido a que se requiere encontrar métodos de desinfección que sean menos costosos, de fácil uso y cuyo impacto negativo hacia el ambiente y la salud pública sea nulo, se ha determinado una posible alternativa la cual es la utilización de agentes biológicos como es el caso de microorganismos ciliados libres nadadores. Como ejemplo se han utilizado microorganismos inocuos consumidores de bacterias del género *Paramecium* que, además de consumir bacterias, también consumen materia orgánica sin alterar las características organolépticas del agua (Silva, 2008). Los protozoos ciliados también son responsables, de la purificación de una considerable proporción de las aguas residuales. Debido a la propiedad que tiene *Paramecium* como consumidores de bacterias, se ha considerado la posibilidad de utilizarlos para la eliminación de enterobacterias patógenas de aguas residuales pretratadas biológicamente, en lugar de la utilización de agentes químicos los cuales presentan algunas desventajas. Estas bacterias podrían utilizarse como fuente de alimento para estos microorganismos. Los ciliados libres nadadores exhiben varios tipos de

hábitos alimenticios, los *Paramecium* se consideran como microvóvoros, ya que se alimentan de bacterias, materia orgánica en descomposición, pequeños protozoos, algas y levaduras, mediante la intercepción directa de los mismos por su cavidad bucal (Silva, 2003).

3.5 Generalidades sobre *Paramecium aurelia*

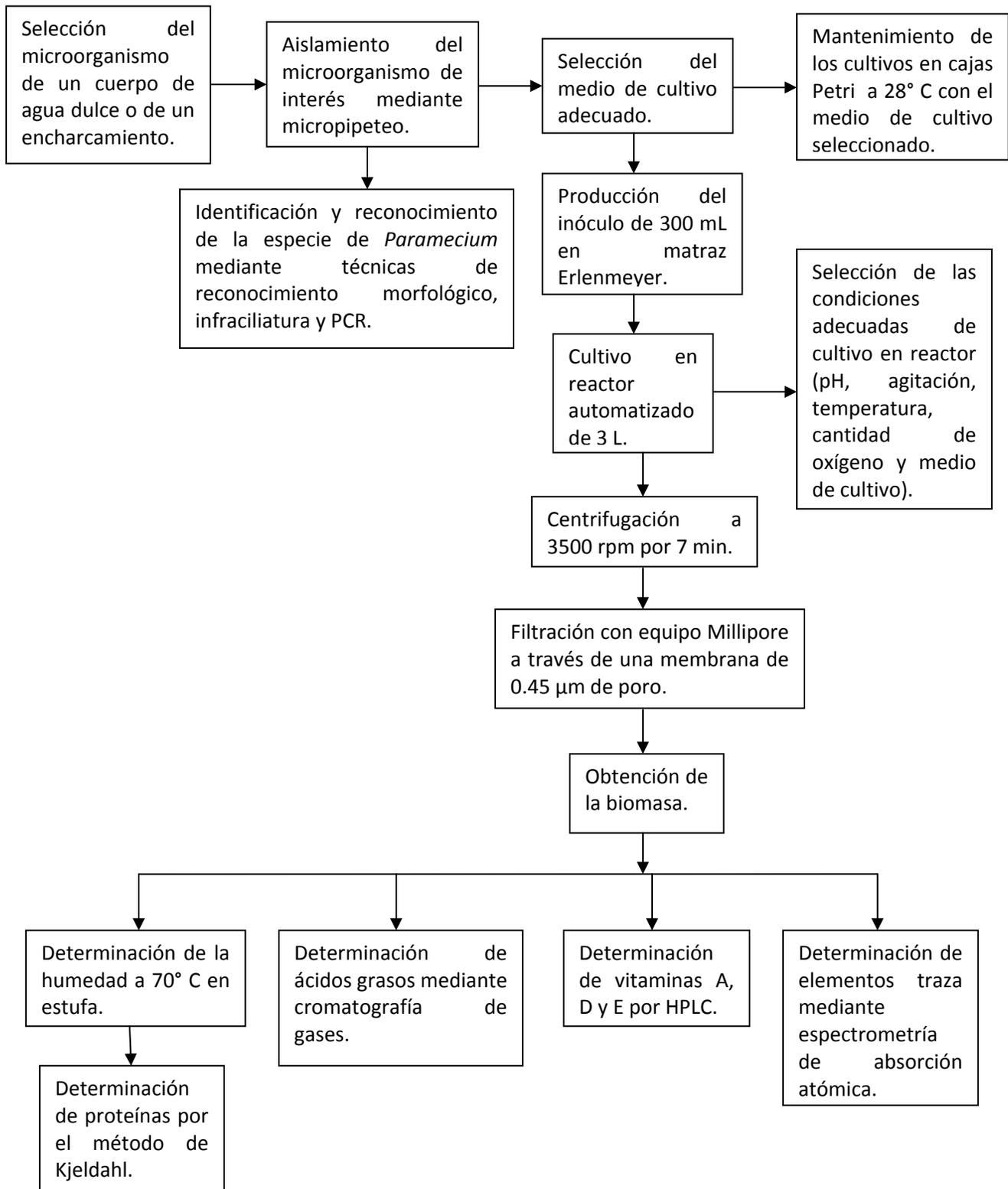
Paramecium aurelia es un protozoo de forma más o menos cilíndrica que mide aproximadamente 150 µm de largo y 50 µm de ancho pero varía considerablemente de tamaño dependiendo del suministro de comida, la etapa del ciclo de vida y la cepa particular con la que se está trabajando. Normalmente contiene un macronúcleo y dos micronúcleos vesiculares usualmente situados cerca del macronúcleo. Hay variaciones ocasionales en el número de micronúcleos que se han encontrado (Beale, 1954).

Esta especie se encuentra en estques y arroyos en varias partes del mundo, particularmente donde hay cierta cantidad de materia vegetal en descomposición. En la naturaleza este protozoo usa como alimento otros microorganismos como bacterias, algas y levaduras entre otros. Su temperatura óptima de crecimiento es de 27 a 29° C, aunque puede crecer a temperaturas de entre 5 y 40° C, y crece en medios con un pH de entre 5.8 y 7.4. *P. aurelia* como otros ciliados se reproduce por fisión binaria que puede ocurrir tan frecuentemente como cada 5 h en condiciones favorables (Beale, 1954).

En la actualidad se conocen 15 especies del complejo *Paramecium aurelia* en todo el mundo. De las especies conocidas hay cuatro que están distribuidas alrededor de todo el mundo que son *P. primaurelia*, *P. biaurelia*, *P. tetraurelia*, y *P. sexaurelia*. Otras de las especies han sido encontradas solamente en algunos lugares del mundo. Algunas de las especies han sido encontradas en diferentes hábitats y otras se han encontrado en un hábitat solamente (Przybos y Fokin, 2000). Estas especies son morfológicamente idénticas y solo pueden diferenciarse genéticamente (Catania *et al.*, 2009).

A pesar de que los ciliados del género *Paramecium* están tan ampliamente distribuidos, se han realizado muchos estudios de investigación con este género de protozoos y que su cultivo a nivel laboratorio es más simple y económico que el cultivo de algas y microalgas debido a que no se requieren medios de cultivos complejos ni del cuidado de las condiciones de iluminación de los cultivos, no se han realizado estudios que permitan determinar si este género de protozoos podría ser utilizado como suplemento alimenticio por contener alguna sustancia nutracéutica o un alto contenido de proteína, por lo cual se vio la posibilidad de realizar este estudio.

4 Metodología



4.1 Selección del microorganismo

El microorganismo con el cual se está trabajando fue aislado de un encharcamiento producido después de un día de lluvia en una jardinera. Se reconoció que el protozoo era del género *Paramecium* debido a que se conocían sus características morfológicas.

4.2 Aislamiento de microorganismos del género *Paramecium*

La muestra de agua tomada contenía una gran diversidad de protozoos y rotíferos, esta se observó en un microscopio estereoscópico y con la ayuda de una pipeta Pasteur con punta fina se sacaban de la muestra células del protozoo de interés para separarlas de los demás microorganismos y tener un cultivo axénico.

4.3 Selección del medio de cultivo

Las células del protozoo que se obtuvieron de la muestra de agua fueron colocadas en diferentes medios de cultivo para determinar cuál era el adecuado para su crecimiento óptimo. La elección de los medios de cultivo se basó en experimentos previos realizados con protozoos del género *Paramecium*.

Se colocaron diferentes medios de cultivo en cajas Petri que se dejaron incubando a 28° C durante 48 h, debido a que a las 24 h de cultivo no había un crecimiento apreciable. Los medios de cultivo en donde se colocaron células del microorganismo fueron infusión de lechuga (Silva, 2008), infusión de cebada (Silva, 2008), infusión de trigo (Pon, 1996), infusión de germinado de trigo (Maruyama *et al.*, 2001), infusión de nabo (Pon, 1996), infusión de chícharo seco (comunicación personal Margarita Reyes Santos, Laboratorio de Protozoología, Facultad de Ciencias, UNAM), infusión de avena (comunicación personal Margarita Reyes Santos, Laboratorio de Protozoología, Facultad de Ciencias, UNAM) e infusión de lechuga seca (Pon, 1996). Después de las 48 h de incubación se realizó un conteo de los microorganismos presentes en cada medio de cultivo para seleccionar el medio de cultivo donde había un mayor crecimiento.

4.4 Mantenimiento de los cultivos de *Paramecium*

Los cultivos de *Paramecium* se mantuvieron en cajas Petri dentro de una incubadora que se encontraba a 28° C, con el medio de cultivo seleccionado para un crecimiento óptimo.

Cada tercer día se hace una resiembra mediante la cual extraen por micropipeteo los protozoos de un medio de cultivo viejo y se colocan en un medio de cultivo nuevo para así mantener vivos los cultivos de este microorganismo, esto para que el protozoo no llegue a la fase de declinamiento en la cual comienza a morir.

4.5 Identificación y reconocimiento de la especie de *Paramecium*

Para hacer una suposición de la especie de *Paramecium* con la cual se trabajó se realizaron diversas tinciones mediante distintas técnicas como tinción Klein, carbonato de plata, NMF y hematoxilina de Harris de este microorganismo en el laboratorio de protozoología de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Se hicieron las técnicas de tinción de Klein y la de carbonato de plata debido a que son muy recomendables para estudiar la infraciliatura del género *Paramecium* lo que ayuda a su identificación (Foissner, 1991).

Para confirmar la especie de *Paramecium* con la cual se trabajó, se amplificó el gen que codifica para el rRNA 18S y se comparó la secuencia del gen con genes en una base de datos.

Se hicieron cultivos del protozoo en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se incubaron durante 72 h a 28° C. El cultivo obtenido se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. La pastilla se resuspende y se pasa a un tubo Eppendorf, se centrifuga a 7500 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Se resuspende la pastilla con 200 µL de amortiguador TE 10x (Tris-HCl 10 mM pH=8.0, EDTA 1 mM). Se congela la suspensión a -70° C por 15 min e inmediatamente después se coloca 10 min en agua hirviendo para lisar las células. Se deja enfriar y se agita en un vórtex durante 3 s. Se agregan 50 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y 50 µL de fenol saturado. Se agita en vórtex por 5 s y se centrifuga a 5000 rpm por 5 min a 4° C. Se transfiere la fase acuosa a otro tubo Eppendorf y se adiciona un décimo del volumen del tubo de acetato de sodio 3 M a pH=7.0 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se mezcla por inversión y se almacena a -20° C toda la noche. Se centrifuga a 14000 rpm por 30 min a 4° C. Se lava el paquete de DNA dos veces, cada una con 300 µL de etanol frío al 80 % y se centrifuga a 14000 rpm 3 min a 4° C. Se vacía el contenido del tubo cuidando que la pastilla quede en el tubo y se deja secar completamente. Se resuspende la pastilla con 100 µL de agua desionizada y se almacena a -20° C hasta su uso.

Para amplificar la secuencia de DNA para la identificación se realiza un PCR.

En un tubo se agregan 18.2 µL de agua desionizada, 2.5 µL de buffer, 1.8 µL de MgCl₂, 0.3 µL del primer 3'-TACCTGGTTGATCCTGCCAG-5' (Fokin *et al.*, 2004), 0.3 µL del primer 3'-CCATCCATGTTTTGACCTGGTAAG-5', 0.8 µL de dNTPs y 1 µL de DNA, el tubo se coloca en un termociclador y ahí se le añaden 0.8 µL de la enzima Taq polimerasa.

Las condiciones del termociclador fueron:

94° C – 2 min
94° C – 50 s }
52.5° C – 40 s } 25 ciclos
72° C – 1 min }
72° C – 7 min

Se comprueba que la secuencia amplificó cargando 5 µL de la muestra con 1 µL de buffer de carga en un gel de agarosa que se revela en bromuro de etidio y se compara con un marcador. Si la secuencia se amplificó se purifica y se manda a secuenciar.

4.6 Cultivo de *Paramecium* sp. a nivel matraz

El cultivo a nivel matraz de los protozoos se realiza añadiendo al matraz 50 mL del medio de cultivo seleccionado, se llena hasta la marca de 150 mL con agua destilada, se adicionan 20 mL de inóculo y se adiciona agua de la llave hasta llegar a la marca de 200 mL. El matraz se deja incubando durante 72 h a 28° C.

4.7 Cultivo de *Paramecium* sp. en un bio-reactor.

Se realizaron cultivos del protozoo en un bio-reactor automatizado de 3 L, ADI 1010-Applikon Biotechnology. Para determinar las condiciones óptimas de crecimiento del protozoo con las cuales se pueda obtener la suficiente biomasa como para realizar las pruebas de determinación de sustancias nutraceuticas en estos microorganismos, se variaron algunas condiciones en el reactor como son pH, temperatura, cantidad de medio de cultivo, agitación y tiempo de cultivo. La biomasa se determinó mediante el conteo de microorganismos, cada 24 h de cultivo, en 0.1 mL de medio que se coloca en un portaobjetos y se visualiza mediante un microscopio (APHA, 1998). El procedimiento consiste en contar a los *Paramecium* en la gota de medio y cada vez que uno es contado se retira mediante una pipeta Pasteur con punta fina.

Antes de adicionar el medio de cultivo al bio-reactor este se pasa por un filtro Whatman con lo cual se reduce la formación de precipitado en el medio de cultivo.

4.8 Obtención de la biomasa

Una vez finalizadas las 72 h de cultivo en el bio-reactor se centrifuga el medio de cultivo en tubos Corning de 50 mL a 3500 rpm durante 7 min, transfiriendo las pastillas de los tubos centrifugados a un solo tubo. Una vez que se ha centrifugado todo el medio de cultivo se filtra la biomasa obtenida con una membrana Millipore de 0.45 μm de poro para eliminar el medio de cultivo restante.

4.9 Determinación cuantitativa para sustancias nutraceuticas

4.9.1 Humedad

Se ponen en una estufa a 70° C +/- 3° C los papeles filtro donde se va a pesar la muestra hasta que tengan un peso constante y se registra su peso. Posteriormente se pone una cantidad de la biomasa en el papel filtro y se pesa. Los papeles filtro con la biomasa se colocan en la estufa a 70° C +/- 3° C durante 2 h o hasta peso constante y transcurrido este tiempo se vuelven a pesar. Por diferencia de peso se obtiene el peso de la biomasa y de la biomasa seca con lo cual puede calcularse la humedad de la misma. (Aguilera *et al.*, 2005)

4.9.2 Proteína

La cuantificación del contenido de proteína se realiza en la biomasa que había sido utilizada para la determinación de humedad. El contenido de proteína se determina cuantificando el nitrógeno total de la muestra mediante el método de Kjeldahl.

Se pesan aproximadamente 125 mg de muestra.

Se colocan en un tubo de digestión.

Se adiciona 1 g de catalizador (mezcla de 62.5 g de K_2SO_4 con 6.25 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Se colocan en el digestor Buchi K-435 y se mantienen a la máxima temperatura por alrededor de 2.5 h a 3 h.

Se dejan enfriar a temperatura ambiente.

Una vez fríos se adicionan 10 mL de agua destilada.

Cada tubo se coloca en un digestor Buchi K-350 y se adiciona sosa al 36 % hasta un vire de color.

El nitrógeno se recupera en 50 mL una disolución de ácido bórico al 5 % con indicadores (1.75 mL de fenolftaleína al 0.1 % en etanol y 0.5 mL de una mezcla de verde de bromocresol al 0.033 % y rojo de metilo al 0.066 % en etanol).

La disolución de ácido bórico se titula con una disolución de HCl previamente valorada hasta un vire a un color rojo. (La valoración se realiza con carbonato de sodio anhidro secado en una estufa a 120° C hasta peso constante y se utiliza verde de bromocresol como indicador).

Se calcula el contenido de nitrógeno y el resultado se multiplica por el factor 6.25 para obtener el contenido de proteína de la muestra.

Se utiliza un control que es sulfato de amonio secado previamente en un horno a 110° C hasta peso constante. (Clesceri *et al.*, 1998)

4.9.3 Ácidos grasos

La extracción de lípidos totales se realizó mediante el método 34.1.08 AOAC Official Method 923.07:

Se pesan aproximadamente 0.25 g de muestra.

Se agregan 25 mL de una mezcla de cloroformo:etanol (1:1).

Se agita de 2 a 3 min en un vórtex.

Se filtra la muestra a través de un filtro con Na₂SO₄ anhidro, el tubo donde se va a recolectar la muestra debe estar previamente pesado.

Se lava el filtro de 2 a 3 veces con cloroformo.

Se evapora a sequedad en baño María con flujo de nitrógeno.

Se pesa el tubo con los lípidos extraídos.

Se obtiene el porcentaje de lípidos en la muestra por diferencia de peso.

Para la determinación de ésteres metílicos de ácidos grasos se siguió la metodología del método 41.1.28 AOAC Official Method 969.33:

Agregar a los lípidos extraídos 2 mL de NaOH en metanol al 2 %.

Agregar estándar interno (ácido miristoleico, CH₃(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₃COOH) y agitar.

Llevar a ebullición por 10 min.

Agregar 1 mL de BF₃ en boro/metanol.

Llevar a ebullición por 2 min.

Dejar enfriar a temperatura ambiente.

Agregar 2 mL de la disolución saturada de NaCl.

Separar las fases, la fase superior se coloca en un tubo limpio y la fase inferior se desecha.

Evaporar a sequedad.

Resuspender con 1 mL de hexano grado HPLC.

Inyectar en el cromatógrafo de gases (se utilizó un cromatógrafo de gases marca Varian modelo 3800 con detector de ionización de flama (FID) y se usó hidrógeno como gas acarreador. La columna que se usó es una J&W DB-23 de 30 m de largo y 0.25 mm de diámetro interno).

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

La temperatura del inyector fue de 250° C, la temperatura del detector de 300° C, en el horno se varió la temperatura mediante un programa de temperatura teniendo una temperatura inicial de 140° C y aumentando la temperatura a una velocidad de 10° C/min hasta alcanzar los 230° C.

4.9.4 Vitaminas

El método se basa en la saponificación y extracción de las vitaminas liposolubles las cuales tienen un máximo de absorción a 254 nm.

Se pesa 1 g de muestra en un tubo de vidrio de 13 X 100 mm con tapón de rosca, se adicionan 4 mL de una disolución de KOH en etanol y se agita por 1 min en un vórtex, posteriormente se incuba durante 10 min a 58° C.

Se deja enfriar y se agregan 400 µl de dimetilsulfóxido agitando en un vórtex.

Se adicionan 5 mL de agua desionizada y se agita en un vórtex.

Se agregan 5 mL de n-hexano y se agita por inversión. Se deja reposar para que se separen las fases.

Separar la fase orgánica y transferir a otro tubo de vidrio de 13X100 mm.

Lavar la fase acuosa tres veces con hexano, en cada lavada pasar la fase orgánica al tubo donde se transfirió la primera fase orgánica.

Evaporar a sequedad en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente

Redisolver en 1 mL de fase móvil, transferir a un vial de vidrio color ámbar.

Inyectar en un equipo de HPLC con un detector UV-vis de 486 a 254nm.

Se utilizan las siguientes condiciones cromatográficas:

Columna: C₈, de 5 cm. Precolumna: C₈.

Fase móvil: metanol/acetonitrilo/agua (25:24:1)

Longitud de onda del detector: 254 nm

Volumen de inyección: 5 µl

Tiempo de corrida: 20 min.

Temperatura ambiente.

(Comunicación personal Sara Montaña Benavides, Departamento de Nutrición Animal, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán).

4.9.5 Elementos traza

Esta determinación se realizó con base en el método oficial de 4.8.02 AOAC Official Method 968.08.

Se pesan 0.5 g de la biomasa seca de *Paramecium* en un tubo de digestión. Se adicionan 25 mL de HNO₃ y se lleva a ebullición por 30 a 45 min para oxidar toda la materia oxidable. Se deja enfriar y se agregan 10 mL de HClO₄ al 70 %. Se hierve hasta que la solución se torne incolora y aparezcan humos blancos densos. Se deja enfriar y se añaden 50 mL de agua. Se hierve para liberar todos los humos de NO₂. Se diluye a 100 mL con agua. La muestra es aspirada por un espectrómetro de absorción atómica con quemador de aire-acetileno.

5 Resultados

5.1 Selección del medio de cultivo

Los medios e cultivo que se seleccionaron para el crecimiento del protozoo fueron la infusión de lechuga y la infusión de trigo. Se probó con una mezcla de ambas infusiones y se determinó que el protozoo presentaba un crecimiento óptimo con estas infusiones.

Se vio que una mezcla 1:1 de ambas infusiones es el medio de cultivo más adecuado para realizar el cultivo de estos microorganismos, ya que había un crecimiento mayor que con las infusiones por separado.

Para hacer la resiembra de los cultivos del protozoo se usa 1 volumen de la mezcla de infusiones que se diluyen en 3 volúmenes de agua.

5.2 Identificación y reconocimiento de la especie de Paramecium sp.

Estas son algunas de las fotografías tomadas en el laboratorio.



Figura 2. Paramecium en contraste de fase, pueden observarse los cilios (Ci).

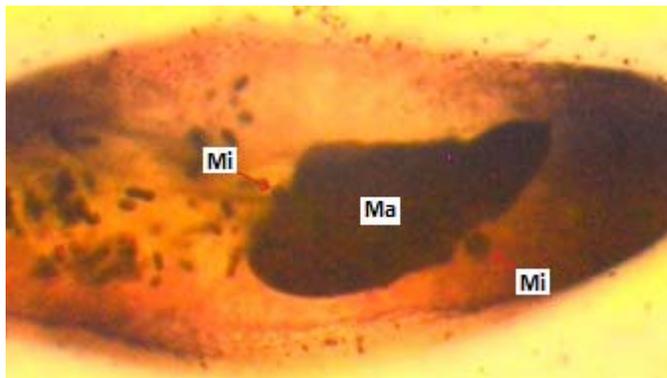


Figura 3. Tinción con carbonato de plata. Se puede observar la posición de los micronúcleos (Mi) que se encuentran al lado del macronúcleo (Ma).

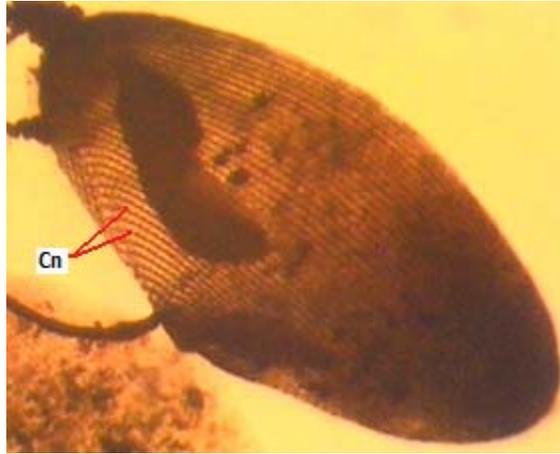


Figura 4. Tinción con carbonato de plata. En esta fotografía pueden observarse las cinetias de *Paramecium*.

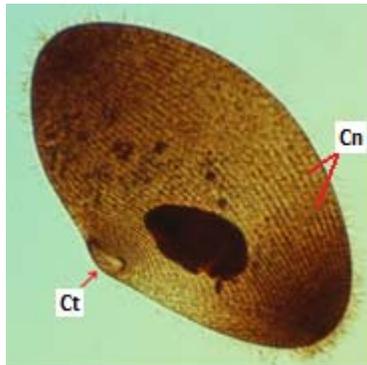


Figura 5. Tinción de Klein. En esta fotografía se observa la posición del citostoma (Ct) y pueden observarse las cinetias (Cn) de *Paramecium*.

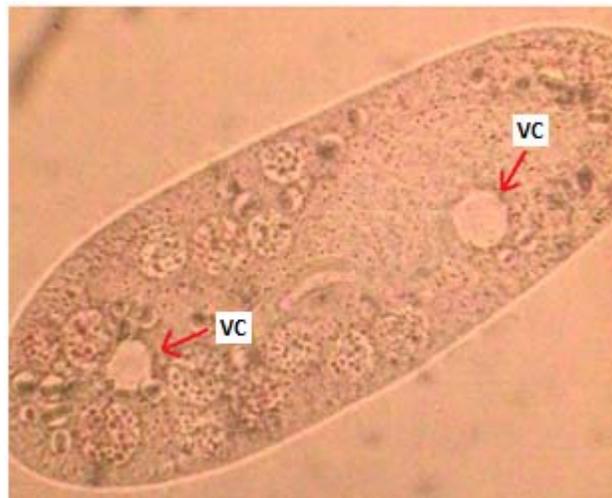


Figura 6. Tinción con azul de metileno. En esta fotografía se puede observar la posición de las vacuolas contráctiles (VC) de *Paramecium*.



Figura 7. Tinción NMF. En esta fotografía se puede observar la ciliatura de *Paramecium*.



Figura 8. Tinción de hematoxilina de Harris. En esta fotografía se puede observar el macronúcleo (Ma) de *Paramecium*.

También se realizaron mediciones de los microorganismos para determinar el tamaño promedio que tenían estos. Las mediciones se hicieron de microorganismos en medios de cultivo que tenían 48 h de incubación. Los microorganismos se midieron con el programa Motic Images Plus 2.0 el cual fue calibrado mediante un objetivo micrométrico.



Figura 9. Dimensiones de *Paramecium*.

Tabla 1. Dimensiones de varios *Paramecium*.

Ejemplar de <i>Paramecium</i>	Largo (μm)	Ancho (μm)
1	112.2	29.2
2	113.6	33.8
3	114.3	30.7
4	114.9	30.7
5	115.3	26.5
6	115.4	32.3
7	115.6	34.8
8	117.0	29.8
9	117.5	28.5
10	119.7	31.7
11	121.1	32.7
12	121.5	41.7
13	122.4	32.0
14	124.7	38.1
15	126.7	45.3
16	127.2	31.7
17	129.1	45.2
18	131.9	42.5
19	132.1	41.7
20	134.2	42.3
21	134.2	33.2
22	134.4	45.4
23	136.5	39.6
24	136.9	36.0
25	137.1	40.5
26	137.1	35.0
27	137.1	38.7
28	138.6	41.2
29	147.9	36.4
30	148.9	39.4
Promedio	127.2	36.2
Desviación estándar	10.5	5.5
Coefficiente de variación	0.1	0.2

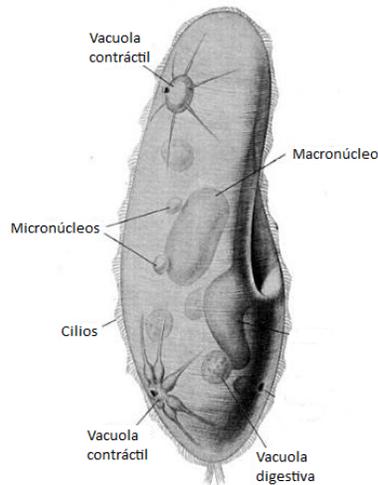


Figura 10. Morfología de *Paramecium aurelia*.
En la figura se muestran varias estructuras del protozoo. (Beale y Preer, 2008).

De la bibliografía se puede ver que *P. aurelia* tiene dos vacuolas contráctiles en los extremos de la célula, un macronúcleo y dos micronúcleos pegados al macronúcleo. El tamaño de esta especie de *Paramecium* es de alrededor de 135 μm de largo y 40-45 μm de ancho (Jurand y Selman, 1969).

Las características morfológicas de este protozoo encontradas mediante la realización de las tinciones y la medición son que este microorganismo posee dos micronúcleos, posee dos vacuolas contráctiles cerca de sus extremos y tiene un tamaño en promedio de 127.2 μm de largo y de 36.2 μm de ancho. Con estas características se puede afirmar que la especie con la que se ha trabajado pertenece al complejo ***Paramecium aurelia***.

Para confirmar que efectivamente se trata de una especie de este complejo, se amplificó mediante PCR el gen que codifica para el RNAr 18S de este microorganismo. El tamaño de la secuencia amplificada fue de alrededor de 1200 pb.

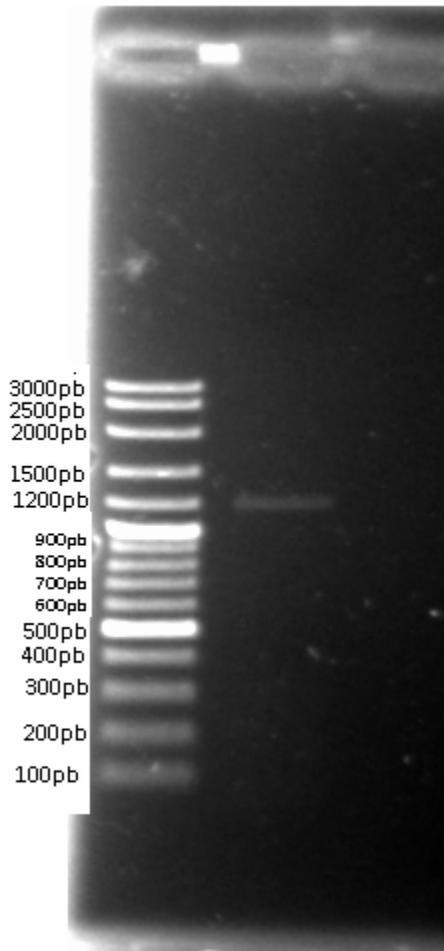


Figura 11. Amplificación del gen que codifica para el RNAr 18S.

La parte del gen que se amplificó se mandó a secuenciar y se obtuvo la siguiente secuencia de 1155 pb:

```

NGCTCNANGTCAAANCANTGGATGGTANGCCATGCNTNCNTCGTGAAGTATAAATAGTATACAGTGAAACTGCGAAT
GGCTCATTAAAACAGTTATAGTTTATTTGATAGTGCAAATTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCG
CAAATACCGGACGCAAGAATGGTAGCATTTATTAGATTTAACCGTCATATGGTGAATCATAGTAACTTAGCTGACCGCG
TGTATACGTGGTAAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTCACGGG
TAACGGAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCG
TAAATTACCCAATCCCGATTCCGGGAGGTAGTGACAAGAAATAGCAACTCGTGCGGGTTTCCGTTACGGGATTGCAAT
GAGATAAGTCCAAATCCGTAAACGATTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCA
ATAGCGTATACTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAATTCGAGTCAGTTACTAGTTGGCTCTTCGTCAGTT
AGTTAATTGATTCTCCGTCTACAATCCCTTTTGCCTTTAGGGTTGCAGCTGGGCGAGTAGACAATTTACCTTGAAAAA
TTAGAGTGTTCCAGGCAGGTCTTCGCCGAATACATTAGCATGGAATAATGGAATAGGACTTGGGTCTTTTGTGGTTT
TAGGACTTGAGTAATGATTAATAGGGACAGATGGGGGCATTAGTATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGATTTATT
AAAGACTAACTTATGCGAAAGCATTGCCAAGGATGTTTTCATTAAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCAAAGACGAT
CAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATAACCGACTCGAGATCGGAAGGGTAATATATTAGTCCCTTTCCGCATCGT
AAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGNAANGACGGAAGGG
CACCTCNCNNGAGGGNNNNNNANGCGGCTANTACCTGGTGATNCCTGCCAGGNNNNN.

```

Esta secuencia se comparo con secuencias en la base de datos de Genbank.

Tabla 2. Comparación de la secuencia amplificada en el laboratorio con secuencias del Genbank.

Descripción de la secuencia	Porcentaje de cobertura en relación con la secuencia de estudio	Porcentaje de identidad con la secuencia de estudio
Paramecium tetraurelia gene for 18S ribosomal RNA, partial se	92%	99%
Paramecium tetraurelia gene for 18S ribosomal RNA, partial se	92%	99%
Paramecium tetraurelia small-subunit rRNA gene	92%	99%
Paramecium tetraurelia isolate Lahorensis 18S ribosomal RNA	92%	99%
Uncultured marine eukaryote clone FV36_CilD11 small subunit	92%	99%
Paramecium tetraurelia macronuclear X gene, complete sequen	92%	99%
Paramecium primaurelia 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	90%	99%
Paramecium jenningsi 18S ribosomal RNA gene, partial sequen	90%	99%
Paramecium schewiakoffi partial 18S rRNA gene, strain CH1	92%	98%
Paramecium tetraurelia 16S ribosomal RNA gene, partial seque	92%	98%
Paramecium multimicronucleatum gene for 18S ribosomal RNA,	92%	96%
Paramecium multimicronucleatum gene for 18S ribosomal RNA,	92%	96%
Paramecium multimicronucleatum small subunit ribosomal RNA	90%	96%
Paramecium sp. BR3 partial 18S rRNA gene, strain BR3	92%	95%
Paramecium caudatum gene for 18S ribosomal RNA, partial sec	92%	93%
Paramecium caudatum gene for 18S ribosomal RNA, partial sec	92%	93%
Paramecium caudatum gene for 18S ribosomal RNA, partial sec	92%	93%
Paramecium caudatum 18S ribosomal RNA gene, partial sequer	92%	93%
Paramecium woodruffi small subunit ribosomal RNA gene, parti	90%	93%
Paramecium nephridiatum strain WS97-1 18S ribosomal RNA ge	90%	93%
Paramecium nephridiatum strain BB3-9 18S ribosomal RNA gen	90%	93%
Paramecium duboscqui partial 18S rRNA gene, strain Ku4-8	92%	91%
Paramecium calkinsi 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	90%	92%
Paramecium calkinsi 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	90%	92%
Paramecium polycaryum 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	90%	91%
Paramecium putrinum small subunit ribosomal RNA gene, parti	90%	91%
Paramecium duboscqui 18S ribosomal RNA gene, partial sequer	90%	91%
Paramecium quadecaurelia strain AN1 18S ribosomal RNA gene	43%	100%
Paramecium quadecaurelia strain 328 18S ribosomal RNA gene	43%	100%
Paramecium tredecaurelia strain 209 18S ribosomal RNA gene,	43%	100%
Paramecium dodecaurelia strain 246 18S ribosomal RNA gene,	43%	100%
Paramecium decaurelia strain 223 18S ribosomal RNA gene, pa	43%	100%
Paramecium octaurelia strain 565s 18S ribosomal RNA gene, pa	43%	100%
Paramecium octaurelia strain K8 18S ribosomal RNA gene, part	43%	100%
Paramecium octaurelia strain K9 18S ribosomal RNA gene, part	43%	100%
Paramecium octaurelia strain IEE 18S ribosomal RNA gene, par	43%	100%
Paramecium octaurelia strain 138 18S ribosomal RNA gene, pa	43%	100%
Paramecium septaurelia strain V5-13 18S ribosomal RNA gene,	43%	100%
Paramecium septaurelia strain GFg-1 18S ribosomal RNA gene,	43%	100%
Paramecium septaurelia strain AZ5-2 18S ribosomal RNA gene,	43%	100%
Paramecium sexaurelia strain CB16-2 18S ribosomal RNA gene,	43%	100%
Paramecium sexaurelia strain AZ8-4 18S ribosomal RNA gene,	43%	100%
Paramecium sexaurelia strain 159 18S ribosomal RNA gene, pa	43%	100%
Paramecium tetraurelia strain 172 18S ribosomal RNA gene, pa	43%	100%
Paramecium tetraurelia strain 32 18S ribosomal RNA gene, par	43%	100%
Paramecium tetraurelia strain 298s 18S ribosomal RNA gene, p	43%	100%
Paramecium tetraurelia strain S 18S ribosomal RNA gene, parti	43%	100%
Paramecium tetraurelia strain d4-2 18S ribosomal RNA gene, p	43%	100%
Paramecium tetraurelia strain PF15 18S ribosomal RNA gene, p	43%	100%
Paramecium tetraurelia strain nr7-1 18S ribosomal RNA gene, p	43%	100%
Paramecium tetraurelia strain 51s 18S ribosomal RNA gene, pa	43%	100%
Paramecium biaurelia strain PK2 18S ribosomal RNA gene, part	43%	100%

En esta tabla se da un porcentaje que relaciona el tamaño de la secuencia amplificada en el laboratorio respecto a la secuencia presente en la base de datos y un porcentaje que dice cuan parecidas son la secuencia amplificada en el laboratorio comparada con la secuencia de la base de datos.

Se puede ver que la secuencia que se amplificó tiene un 99 % de compatibilidad con las secuencias del gen que codifica para el RNAr 18S de *P. tetraurelia* y de *P. primaurelia*, ambas secuencias son de tamaños similares a la de la secuencia amplificada en el laboratorio. La secuencia amplificada en el laboratorio tiene un 100 % de afinidad con otras especies del complejo *P. aurelia* pero esto es debido a que las secuencias que se encuentran en la base de datos son más cortas que la secuencia que se amplificó, estas secuencias son de tan solo 506 pb. Hay otra especie que es *P. jenningsi* con la cual la secuencia amplificada también tiene un 99 % de afinidad, pero debido a las características morfológicas del protozoo que se está trabajando puede decirse que esta especie no es la que se está cultivando.

Con la información obtenida solo se puede asegurar que el protozoo con el que se está trabajando es una de las especies del complejo *P. aurelia* pero no se puede decir específicamente de que especie del complejo se trata, ya que las únicas secuencias casi completas del gen que codifica para el RNAr 18S son las de las especies *P. tetraurelia* y *P. primaurelia*.

5.3 Cultivo de *Paramecium aurelia* a nivel matraz

El cultivo de *P. aurelia*, a nivel de matraz, se realizó para ver si se podía hacer crecer al microorganismo en volúmenes de agua mayores que los de las cajas Petri, además de que el cultivo en el matraz se utiliza para inocular el bio-reactor. En los cultivos a nivel matraz había un promedio de 130 ejemplares/100 μ L.

5.4 Cultivo de *Paramecium aurelia* en bio-reactor

Para determinar el tiempo de cultivo al cual se obtiene la mayor cantidad de microorganismos se hizo un cultivo para ver a qué tiempo los microorganismos comenzaban a reducir su población. Las condiciones que se utilizaron para el cultivo fueron temperatura de 28° C, una agitación de 50 rpm, oxígeno disuelto superior a 2 mg/L, 200 mL de medio de cultivo (mezcla 1:1 de infusión de lechuga con infusión de trigo) con 500 mL de agua y pH=7.0.

Tabla 3. Cantidad de células de *P. aurelia* en 100 µL de cultivo a diferentes tiempos.

	Número de células/100 µL				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
	13	55	79	109	90
	15	57	77	107	91
	17	58	81	111	93
	16	59	83	113	95
	11	57	79	110	93
	13	56	80	110	97
	15	59	80	107	96
	16	60	81	109	92
	13	60	77	108	91
	15	57	83	112	97
Promedio	14.4	57.8	80	109.6	93.5
Desviación estándar	1.838	1.7	2.1	2.0	2.6
Coefficiente de variación	12.8	2.92	2.64	1.83	2.77

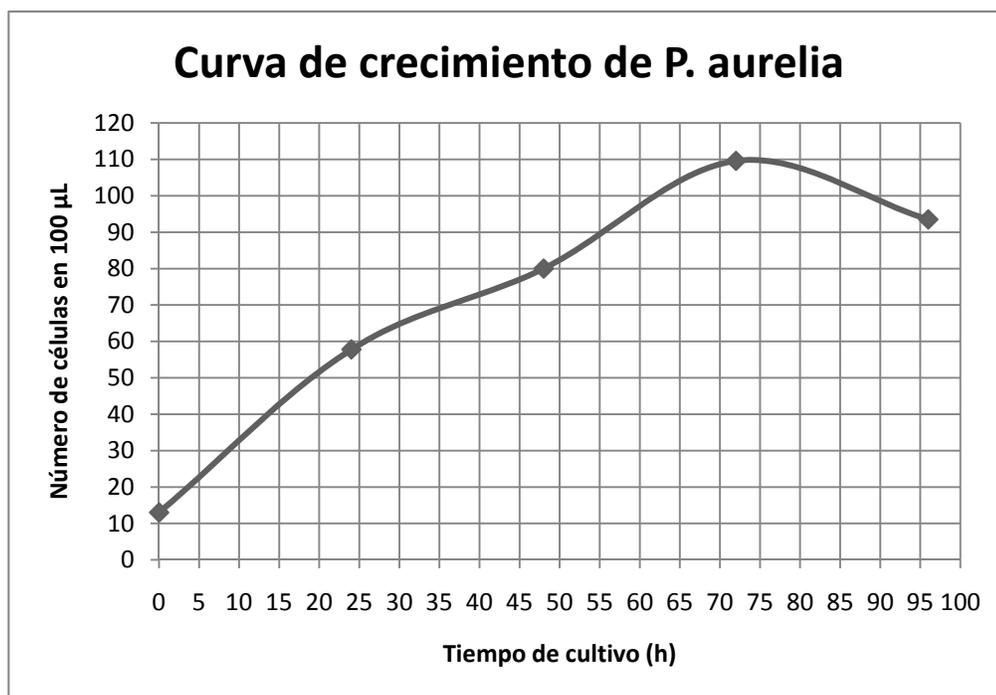


Figura 12. Curva de crecimiento de *P. aurelia* durante 96 h.

De la gráfica puede observarse que el tiempo al cual hay una mayor cantidad de microorganismos es a las 72 h de cultivo.

Debido a que se estandarizó el inóculo el conteo de microorganismos a las 0 h de cultivo siempre es de alrededor de 13 células/100 μ L.

Para determinar el pH óptimo de crecimiento se realizaron 3 cultivos a diferentes pH, los pH utilizados fueron de 7.0, 7.25 y 7.5 debido a que los cultivos en cajas Petri tenían pH de entre 7.0 y 8.0, pero los microorganismos crecían mejor en las cajas Petri con medios de cultivo en valores de pH de entre 7.0 y 7.5.

Las condiciones que se utilizaron para el cultivo fueron temperatura de 28° C, una agitación de 50 rpm, oxígeno disuelto superior a 2 mg/L, 150 mL de medio de cultivo (mezcla 1:1 de infusión de lechuga con infusión de trigo) con 550 mL de agua y se variaron los pH. Los microorganismos fueron contados en varias muestras de 0.1 mL, a las 48 y 72 h de cultivo, visualizando 0.1 mL de medio en un microscopio y retirando a los microorganismos contados por micropipeteo, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 4. Cantidad de células de *P. aurelia* en 100 μ L de cultivo a diferentes pH.

	Número de células/100 μ L					
	pH=7		pH=7.25		pH=7.5	
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
	33	81	27	55	20	39
	35	79	25	58	21	38
	33	77	26	53	22	38
	36	79	29	56	25	37
	31	78	30	56	20	37
	30	82	31	54	23	35
	37	85	26	53	26	37
	33	84	25	58	23	36
	35	86	25	53	21	34
	39	85	28	55	25	36
Promedio	34.2	81.6	27.2	55.1	22.6	36.7
Desviación estándar	2.7	3.3	2.2	1.9	2.2	1.5
Coefficiente de variación	8.0	4.0	8.1	3.5	9.6	4.1

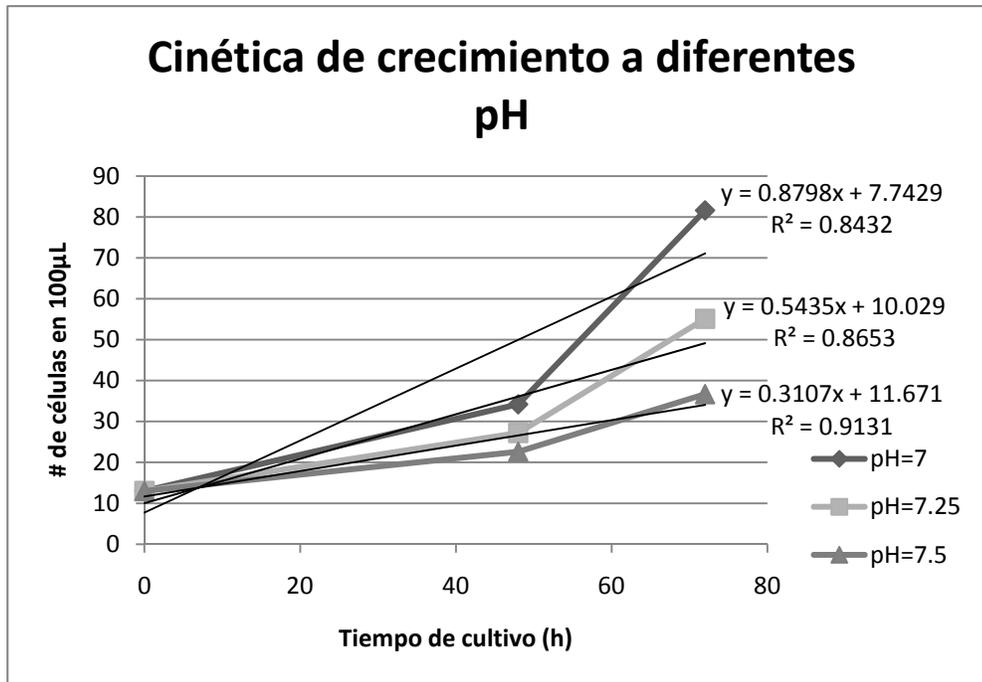


Figura 13. Cinética de crecimiento de *P. aurelia* a diferentes valores de pH.

De esta gráfica se pueden obtener las velocidades específicas de crecimiento que son:

para pH=7, $\mu=0.88$

para pH=7.25, $\mu=0.54$

para pH=7.5, $\mu=0.31$

De estos resultados puede observarse que el pH óptimo de crecimiento de estos microorganismos es a un pH=7.0.

Una vez teniendo el pH óptimo para el cultivo de estos protozoos se varió la velocidad de agitación del medio de cultivo, se probó con 50 rpm, 70 rpm y 100 rpm. Las condiciones que se utilizaron para el cultivo fueron temperatura de 28° C, pH=7.0, oxígeno disuelto superior a 2 mg/L, 150 mL de medio de cultivo (mezcla 1:1 de infusión de lechuga con infusión de trigo) con 550 mL de agua. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 5. Cantidad de células de *P. aurelia* en 100 µL de cultivo a diferentes velocidades de agitación.

	Número de células/100 µL					
	50 rpm		70 rpm		100 rpm	
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
	67	122	83	154	31	81
	59	121	85	155	32	79
	66	118	83	153	30	77
	63	123	77	152	33	79
	65	129	79	151	35	78
	61	127	80	157	31	82
	60	123	83	150	29	85
	63	119	81	151	30	84
	64	128	85	152	31	86
	65	121	80	154	33	85
Promedio	63.3	123.1	81.6	152.9	31.5	81.6
Desviación estándar	2.6	3.8	2.6	2.1	1.8	3.3
Coefficiente de variación	4.1	3.1	3.2	1.4	5.6	4.0

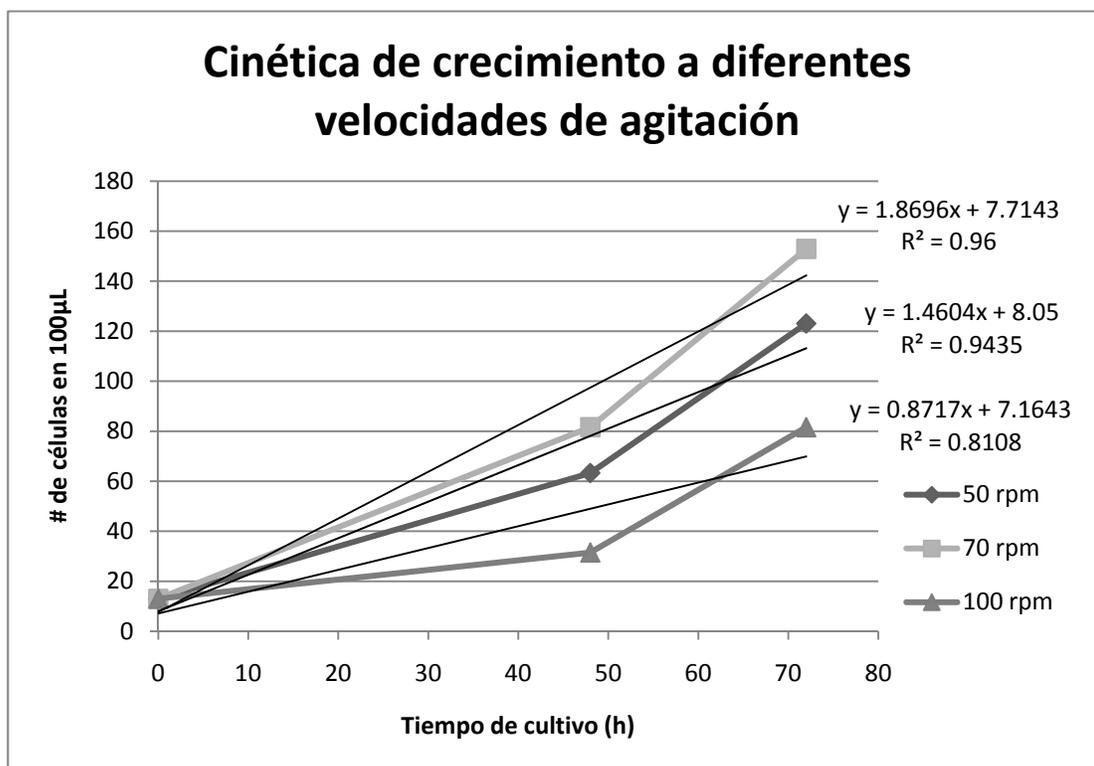


Figura 14. Cinética de crecimiento de *P. aurelia* a diferentes velocidades de agitación.

De la gráfica anterior se pueden obtener las velocidades específicas de crecimiento que son:

para 50 rpm, $\mu=1.46$

para 70 rpm, $\mu =1.87$

para 100 rpm, $\mu =0.87$

Con los resultados obtenidos se puede determinar que la velocidad de agitación a la cual estos microorganismos tienen el crecimiento más óptimo es de 70 rpm.

Teniendo el pH óptimo y la velocidad de agitación óptima para el microorganismo se probó aumentando y reduciendo la temperatura 2° C para determinar si había un mayor crecimiento del microorganismo. Las condiciones que se utilizaron para el cultivo fueron pH=7.0, 70 rpm, oxígeno disuelto superior a 2 mg/L, 150 mL de medio de cultivo (mezcla 1:1 de infusión de lechuga con infusión de trigo) con 550 mL de agua. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 6. Cantidad de células de *P. aurelia* en 100 μ L de cultivo a diferentes temperaturas.

	Número de células/100 μ L					
	26° C		28° C		30° C	
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
	70	141	86	159	64	135
	71	147	87	160	63	137
	73	143	89	162	66	137
	75	145	91	163	67	133
	77	143	88	165	61	136
	76	139	89	157	60	138
	75	144	91	161	62	131
	70	146	87	166	61	132
	69	147	86	163	69	135
	73	143	84	162	66	135
Promedio	72.9	143.8	87.8	161.8	63.9	134.9
Desviación estándar	2.8	2.6	2.3	2.7	3.0	2.3
Coefficiente de variación	3.9	1.8	2.6	1.7	4.7	1.7

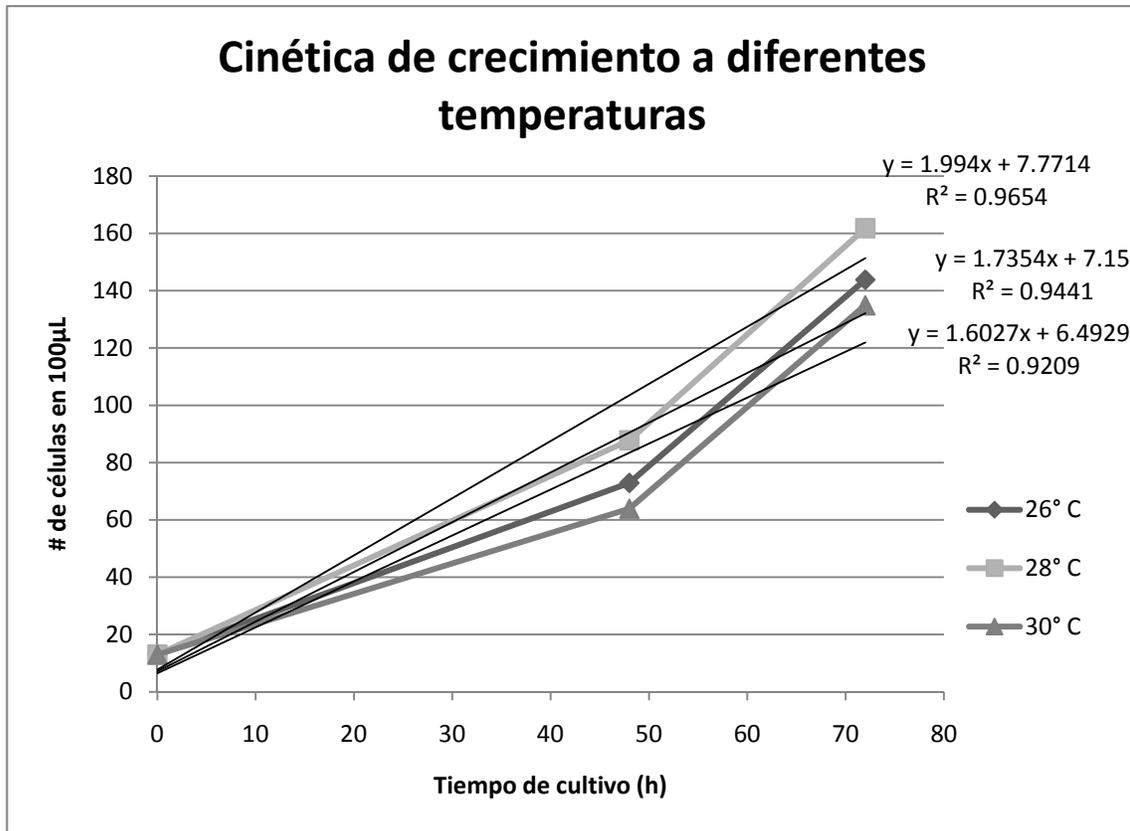


Figura 15. Cinética de crecimiento de *P.aurelia* a diferentes temperaturas.

De esta gráfica se pueden obtener las velocidades específicas de crecimiento que son:

para 26° C, $\mu=1.74$

para 28° C, $\mu =1.99$

para 30° C, $\mu =1.60$

Con los resultados obtenidos se puede determinar que la temperatura óptima de crecimiento de estos microorganismos es de 28° C.

Una vez que se tienen la temperatura, el pH y la velocidad de agitación óptimos para el crecimiento de este microorganismo se procede a variar las cantidades de medio de cultivo. El medio que se agregó fue una mezcla 1:1 de infusión de lechuga e infusión de trigo, además se agregó 1 L de agua al bio-reactor. Se hicieron cultivos con 350 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL y 800 mL de medio. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 7. Cantidad de células de *P. aurelia* en 100 µL de cultivo con diferentes cantidades de medio de cultivo.

	Número de células/100 µL								
	350 mL		500 mL		600 mL		700 mL		800 mL
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h	24 h
77	147	89	198	113	227	155	308	0	
79	149	87	203	107	232	148	312	0	
80	151	93	208	103	229	153	307	0	
81	145	90	205	117	227	155	309	0	
75	153	86	206	110	229	147	307	0	
77	147	89	200	111	230	153	310	0	
79	148	93	201	107	235	149	301	0	
73	147	91	211	105	233	150	311	0	
79	150	88	203	113	225	157	310	0	
77	149	90	202	107	228	151	313	0	
Promedio	77.7	148.6	89.6	203.7	109.3	229.5	151.8	308.8	0
Desviación estándar	2.4	2.3	2.3	3.9	4.3	3.1	3.3	3.4	0
Coefficiente de variación	3.1	1.6	2.6	1.9	3.9	1.3	2.2	1.1	0

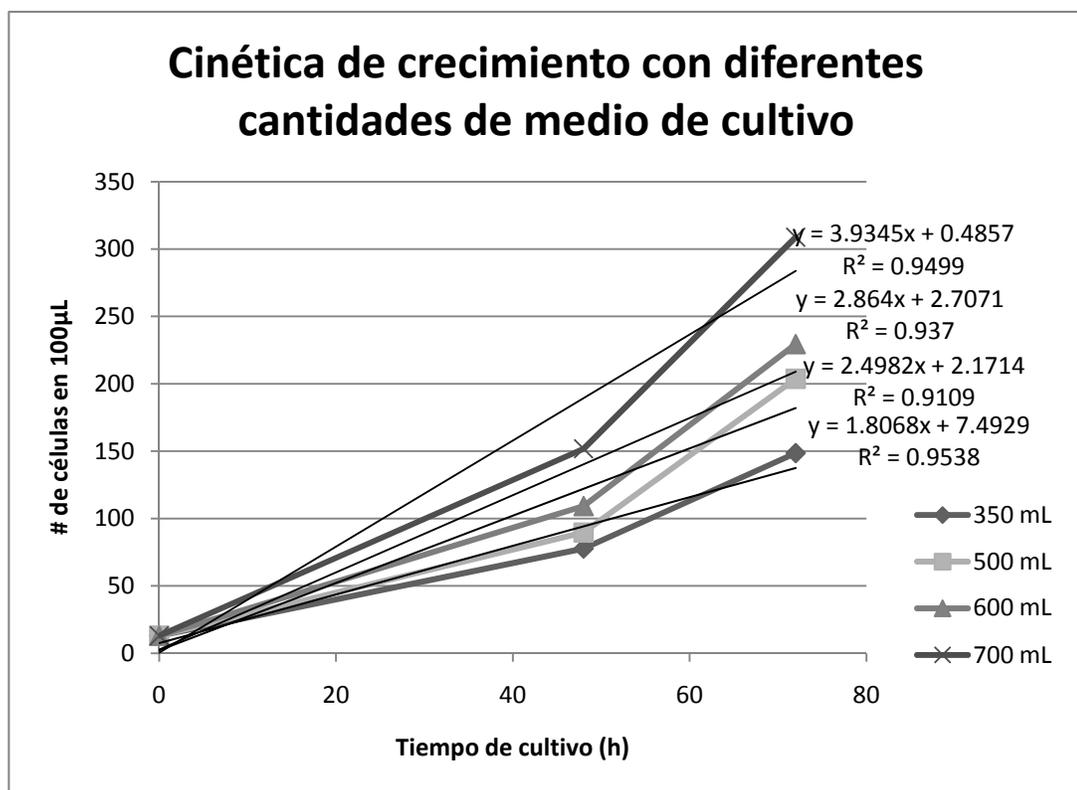


Figura 16. Cinética de crecimiento de *P. aurelia* a diferentes cantidades de medios de cultivo.

De esta última gráfica se pueden obtener las velocidades específicas de crecimiento que son:

Con 350 mL, $\mu=1.81$

Con 500 mL, $\mu =2.49$

Con 600 mL, $\mu =2.86$

Con 700 mL, $\mu =3.93$

Con los resultados obtenidos se puede determinar que los protozoos crecen mejor al adicionar un medio de cultivo que esté compuesto de 700 mL de una mezcla 1:1 de infusiones de trigo y lechuga y se adicione 1 L de agua.

Con los datos obtenidos aquí se determinó que las condiciones óptimas de crecimiento para *P. aurelia* en el bio-reactor son a 28° C, pH=7.0, agitación a 70 rpm, empleando 700 mL de medio de cultivo, 300 mL de inóculo y aforando a 2 L con agua destilada, oxígeno disuelto superior a 2 mg/L y dejando el cultivo por 72 h. Con estas condiciones se obtiene la mayor cantidad de biomasa en el bio-reactor.

5.5 Obtención de la biomasa de *Paramecium aurelia* a partir de los cultivos en el bio-reactor

En la tabla se muestra la cantidad de biomasa de *P. aurelia* que se obtenía de los cultivos en el bio-reactor, cada uno de los valores es lo que se obtenía después de 72 h de cultivo bajo condiciones estandarizadas.

Tabla 8. Cantidad de biomasa que se obtuvo en algunos de los cultivos en el bio-reactor.

	Número de células en 100 μL	Peso de la biomasa (g)	Peso de la biomasa seca (g)
	293	0.2752	0.0668
	287	0.2399	0.0583
	297	0.2918	0.0709
	295	0.2906	0.0706
	299	0.2961	0.0719
	291	0.2729	0.0663
	333	0.3751	0.0911
	337	0.3802	0.0924
	313	0.3252	0.079
Promedio	305	0.3052	0.0741
Desviación estándar	18.493242	0.04689605	0.01139617
Coficiente de variación	6.06335804	15.3645593	15.3702329

5.6 Determinación cuantitativa para sustancias nutraceuticas

5.6.1 Humedad

La humedad se determinó en cinco muestras de tres cultivos diferentes, las muestras 1 y 2 son del mismo cultivo, las muestras 3 y 4 son del mismo cultivo, pero diferente al de las muestras 1 y 2, y la muestra 5 es de otro cultivo.

Tabla 9. Humedad de la biomasa obtenida de los cultivos en el bio-reactor.

Muestra	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	Humedad (%)
1	0.1960	0.0492	74.90
2	0.1720	0.0426	75.23
3	0.3751	0.0900	76.01
4	0.3802	0.0927	75.62
5	0.1237	0.0287	76.80
		Promedio	75.71
		Desviación estándar	0.74
		Coefficiente de variación	0.973

Con los datos obtenidos se puede determinar que la humedad de la biomasa obtenida mediante el cultivo en el bio-reactor es de 75.71 %.

5.6.2 Proteína

La proteína se determinó mediante el método de Kjeldahl en cultivos diferentes de *P. aurelia*, cada una de las muestras que se analizaron son la mezcla de 3 cultivos diferentes realizados en el bio-reactor bajo condiciones estandarizadas.

Tabla 10. Porcentaje de proteína en la biomasa de *P. aurelia* obtenida de los cultivos en el bio-reactor.

Peso de la biomasa seca (g)	Porcentaje de nitrógeno	Porcentaje de proteína (base seca)
0.1347	7.97	49.85
0.165	7.53	46.97
0.1511	7.83	48.96
	Promedio	48.59
	DS	1.47
	% CV	3.03

Con estos datos se puede determinar que el contenido de proteína de la biomasa de *P. aurelia* obtenida de distintos cultivos en un bio-reactor es de 48.59 %.

5.6.3 Ácidos grasos

Se hizo el perfil de ácidos grasos, mediante cromatografía de gases, de la biomasa húmeda de *P. aurelia* obtenida a partir de 3 diferentes cultivos realizados en el bio-reactor bajo condiciones estandarizadas.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 11. Perfil de ácidos grasos de la biomasa húmeda de *P. aurelia*.

	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Promedio	DS	% CV
Lípidos Totales	9.24	8.87	9.26	9.12	0.22	2.41
Porcentaje de los ésteres metílicos de los ácidos grasos						
Mirístico (14:0)	1.28	1.81	1.4	1.50	0.28	18.57
Pentadecanoico (15:1)	0.52	0.52	0.56	0.53	0.02	4.33
cis 10-pentadecanoico (15:1)	0.29	No Detectado	No Detectado	-		
Palmítico (16:0)	23.92	23.02	22.91	23.28	0.55	2.38
Palmitelaidico (16:1)	0.64	0.68	0.66	0.66	0.02	3.03
Palmitoleico (16:1)	2.93	2.85	3.06	2.95	0.11	3.60
Heptadecanoico (17:0)	0.21	0.23	No Detectado	0.22	0.01	6.43
cis 10-heptadecanoico (17:1)	0.92	1.04	No Detectado	0.98	0.08	8.66
Estearico (18:0)	5.54	6.24	5.22	5.67	0.52	9.21
Oleico (18:1)	20.91	23.8	17.63	20.78	3.09	14.86
cis-vaccenico (18:1)	11.04	11.94	11.57	11.52	0.45	3.93
Linoleico (18:2)	11.81	10.77	10.76	11.11	0.60	5.43
γ -linolénico (18:3)	3.7	2.98	4.94	3.87	0.99	25.60
α -linolénico (18:3 ω 3)	2.58	2.22	2.89	2.56	0.34	13.08
Araquidónico (20:4)	6.39	4.7	7.03	6.04	1.20	19.93
Eicosapentanoico (20:5 ω 3)	0.63	0.57	0.73	0.64	0.08	12.56
Otros ácidos grasos	6.66	6.61	11.33	8.20	2.71	33.06

Los ácidos grasos con actividad nutracéutica probada y por lo tanto los que son de interés para el trabajo realizado son los siguientes:

Tabla 12. Porcentaje de ácidos grasos con actividad nutracéutica en la biomasa húmeda de *P. aurelia*.

Porcentaje de ácidos grasos	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Promedio	DS	% CV
Oleico (18:1)	20.91	23.8	17.63	20.78	3.09	14.86
Linoleico (18:2)	11.81	10.77	10.76	11.11	0.60	5.43
γ-linolénico (18:3)	3.7	2.98	4.94	3.87	0.99	25.60
α-linolénico (18:3 ω3)	2.58	2.22	2.89	2.56	0.34	13.08
Araquidónico (20:4)	6.39	4.7	7.03	6.04	1.20	19.93
Eicosapentanoico (20:5 ω3)	0.63	0.57	0.73	0.64	0.08	12.56
Cantidad de células en 100 μL	265	232	285			

Los cromatogramas obtenidos para los 3 diferentes cultivos fueron los siguientes:

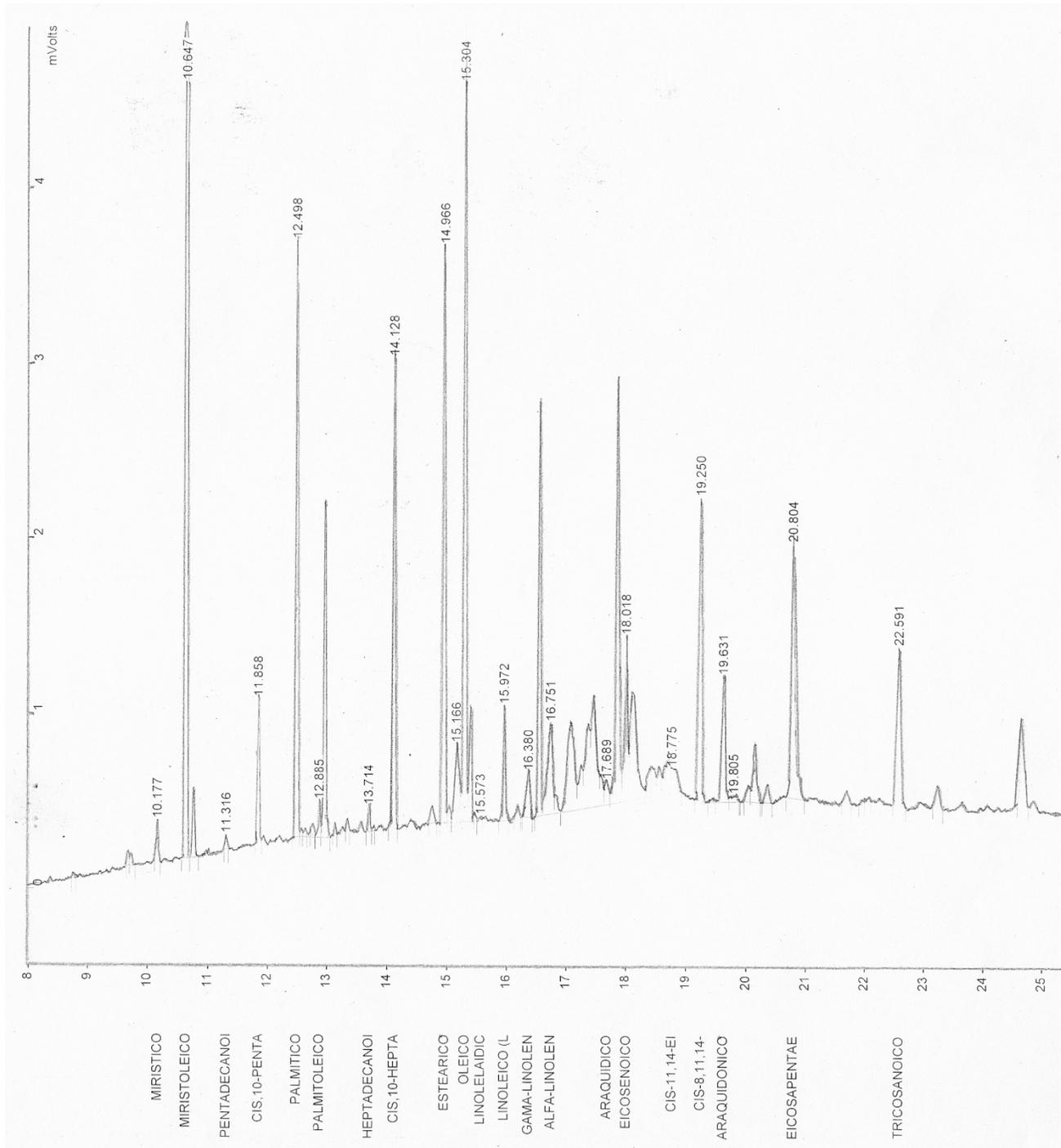


Figura 17. Cromatograma del perfil de ácidos grasos del cultivo 1 de *P. aurelia*.

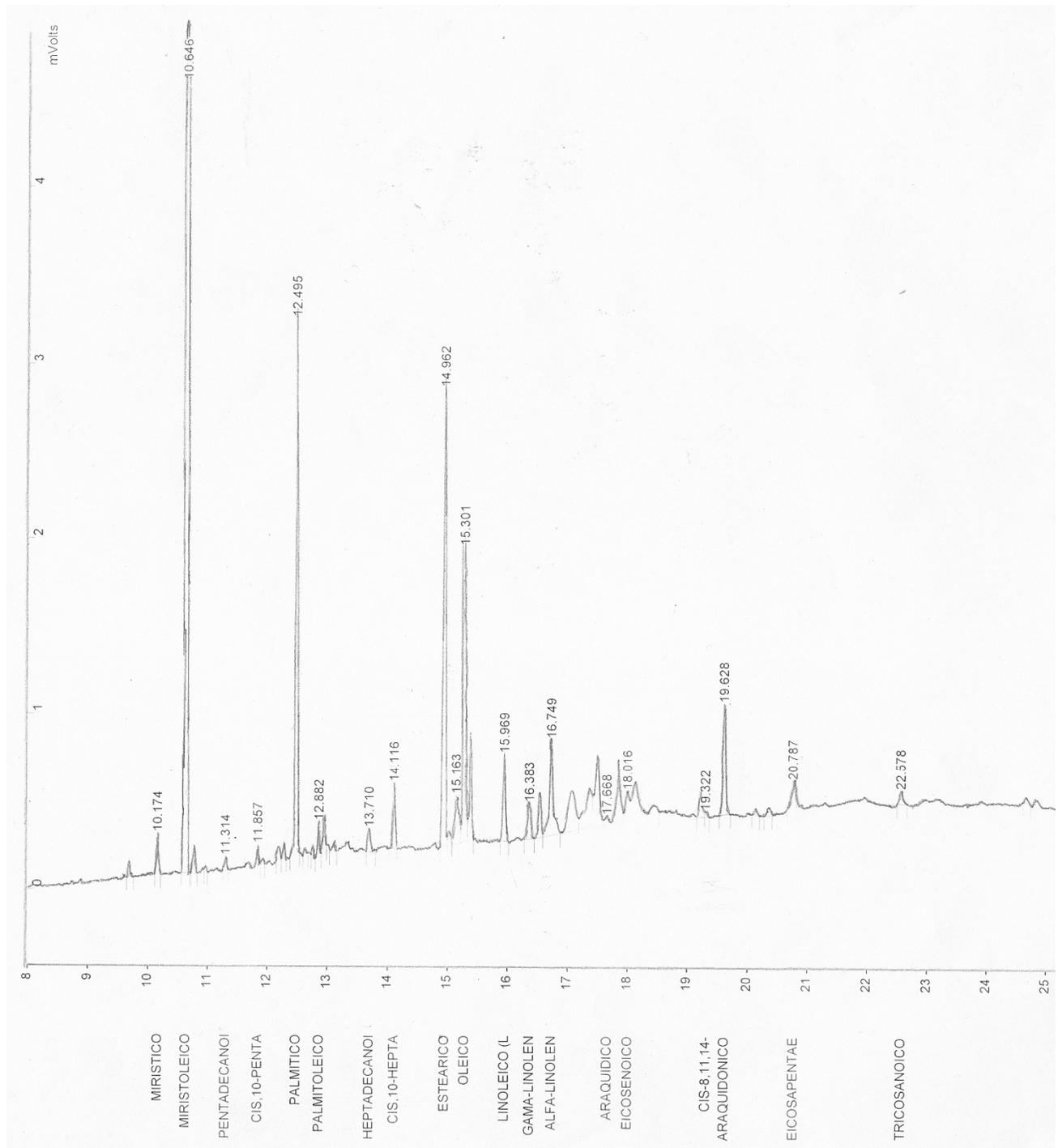


Figura 18. Cromatograma del perfil de ácidos grasos del cultivo 2 de *P. aurelia*.

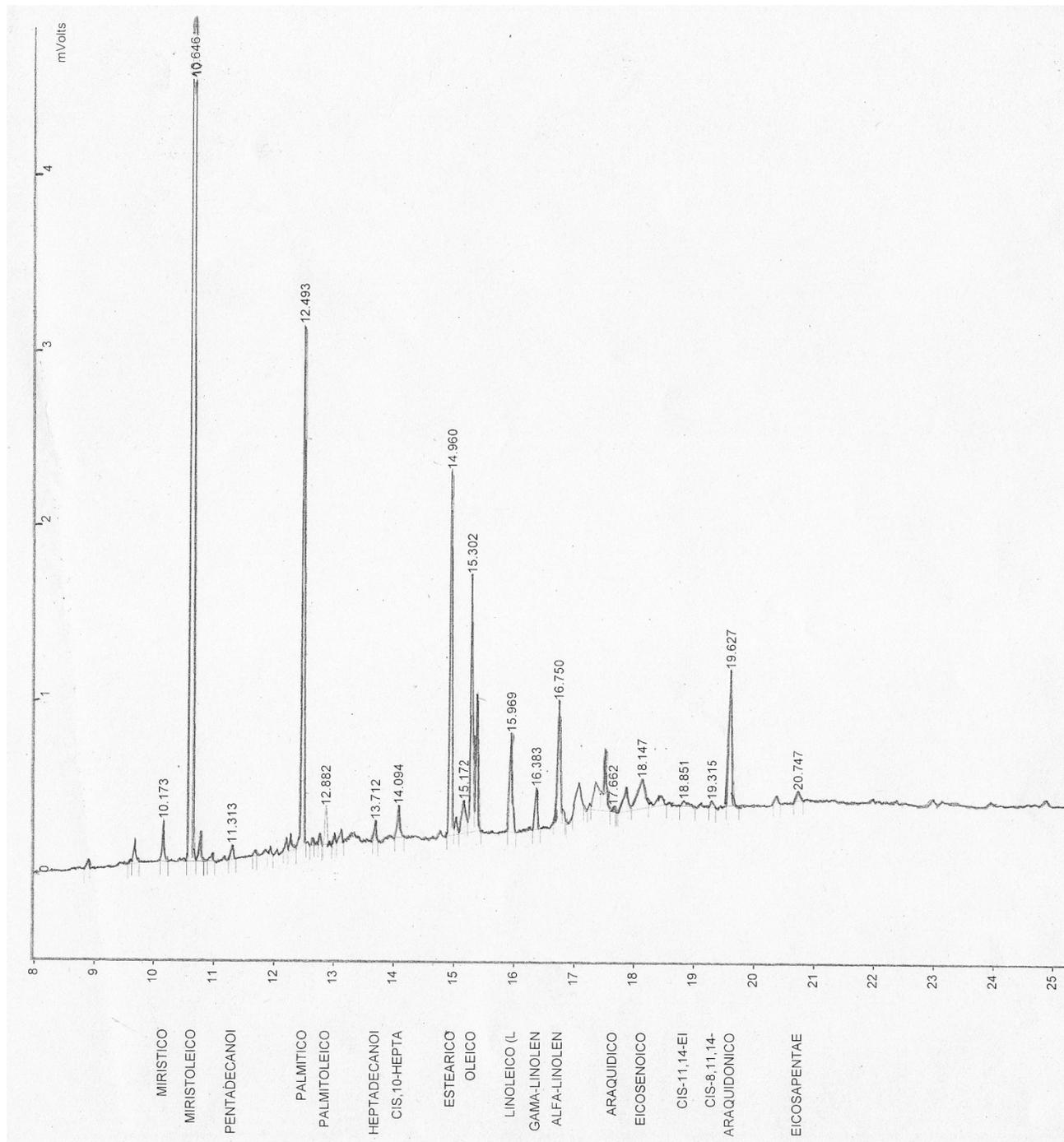


Figura 19. Cromatograma del perfil de ácidos grasos del cultivo 3 de *P. aurelia*.

5.6.4 Vitaminas

Se cuantificaron las vitaminas A, D y E por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, a partir de la biomasa húmeda de *P. aurelia* obtenida a partir de 3 diferentes cultivos realizados en el bio-reactor bajo condiciones estandarizadas.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 13. Contenido de vitaminas liposolubles en la biomasa húmeda de *P. aurelia*.

	Cultivo 4	Cultivo 5	Cultivo 6	Promedio	DS	% CV
Retinol (Vitamina A) µg/100g	142.50	3753.50	2026.00	1974.00	1806.06	91.49
Colecalciferol (Vitamina D3) mg/100g	19.25	256.00	52.25	109.17	128.23	117.46
Tocoferol (Vitamina E) UI	80.88	2004.75	1039.13	1041.58	961.94	92.35
Cantidad de células en 100 µL	281	293	277			

Los cromatogramas obtenidos para los 3 diferentes cultivos fueron los siguientes:

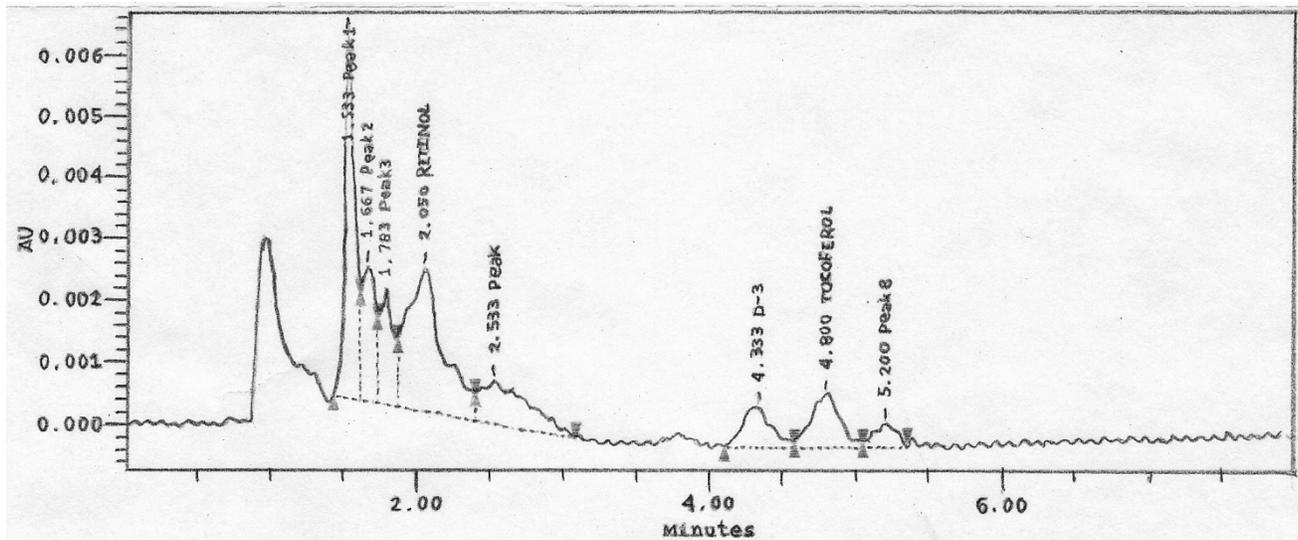


Figura 20. Cromatograma del contenido de vitaminas liposolubles del cultivo 4 de *P. aurelia*.

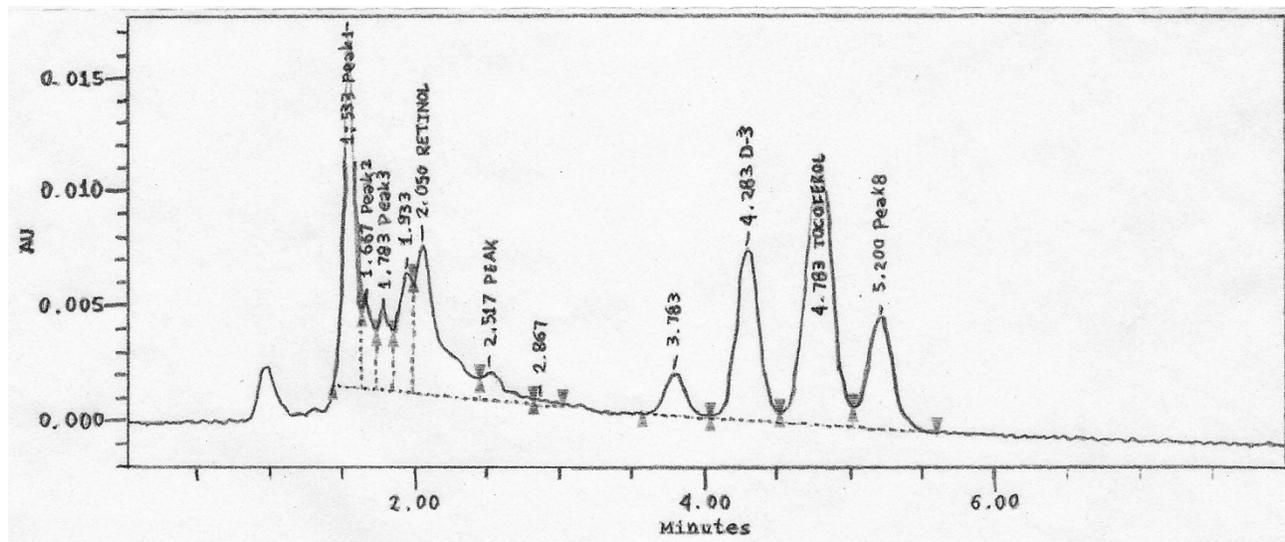


Figura 21. Cromatograma del contenido de vitaminas liposolubles del cultivo 5 de *P. aurelia*.

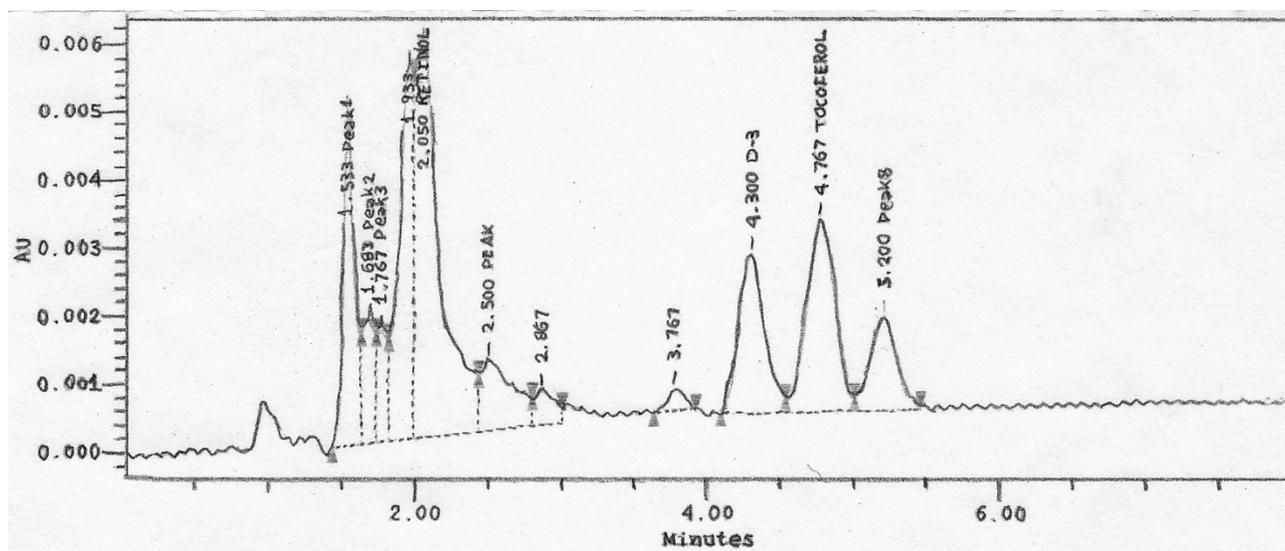


Figura 22. Cromatograma del contenido de vitaminas liposolubles del cultivo 6 de *P. aurelia*.

5.6.5 Elementos traza

Los metales se determinaron por absorción atómica en una mezcla de 5 cultivos de *P. aurelia* obtenidos a partir del cultivo bajo condiciones estandarizadas en el bio-reactor.

Tabla 14. Contenido de metales en la biomasa seca de *P. aurelia*.

Metal	Contenido en mg/kg
Mg	1472.710
K	3289.776
Ca	1187.444
Cr	36.436
Fe	791.943
Cu	96.924
Se	0.464

Límite de detección del método en Anexo D.

6 Análisis y discusión

6.1 Selección del medio de cultivo adecuado

Después de un cultivo de 48 h se observó que en las distintas infusiones se formaba un precipitado que posiblemente era la materia orgánica que después de un tiempo floculaba, por lo cual para utilizar los medios de cultivo para el crecimiento del protozoo en el bio-reactor se iba a formar este precipitado que después se iba a separar con la biomasa y no se iba a tener una biomasa pura, por lo cual se descartaron las infusiones de lechuga seca y la de germinado de trigo donde se observaba una mayor cantidad del precipitado. En la infusión de nabo no hubo crecimiento de los microorganismos después de 24 h por lo cual también se descartó este medio de cultivo. Las infusiones de cebada y avena tenían una gran cantidad de almidón que gelificaba por lo cual era muy difícil filtrarla y no se podía utilizar en el bio-reactor. Al hervir el chícharo seco para hacer la infusión de se formaba una capa de aceite por lo cual tampoco podía usarse para el cultivo en el bio-reactor.

6.2 Condiciones óptimas de cultivo a nivel bio-reactor

De los resultados obtenidos puede observarse que al incrementar el pH del medio de cultivo se inhibe el crecimiento de los protozoos. El pH con el cual *P. aurelia* tiene un mejor crecimiento e el bio-reactor es el pH óptimo de crecimiento reportado en la literatura para este microorganismo.

Al aumentar la velocidad de agitación hay un menor crecimiento de los microorganismos lo cual puede deberse a que las propelas con las que se agita el reactor están hechas para cultivos de bacterias y no de células eucariontes por lo que el esfuerzo de corte al que se someten las células es demasiado e impiden su crecimiento.

La temperatura a la cual el crecimiento de los cultivos de *P. aurelia* es mejor es la temperatura óptima de crecimiento reportada en la literatura para este microorganismo ya que al variar esta temperatura probablemente se afecta su metabolismo causando un menor crecimiento de los mismos.

Se puede observar que entre más alta sea la concentración del medio de cultivo mayor es el crecimiento de *P. aurelia*, pero hasta una cierta concentración ya que al tener una concentración muy alta de medio de cultivo se inhibe el crecimiento de los protozoos, incluso los protozoos que se agregaron para inocular el bio-reactor habían muerto.

Las condiciones de cultivo que se eligieron fueron las más óptimas debido a que en cada cultivo donde se modificaba una de las variables se eligió la condición a la cual se obtenía la cinética de crecimiento más alta para *P. aurelia* teniendo al final las condiciones óptimas lo que da como resultado un cultivo con la mayor cinética de crecimiento posible.

6.3 Obtención de la biomasa de *Paramecium aurelia* a partir de los cultivos en el bio-reactor

A pesar de que los cultivos se hacen bajo condiciones estandarizadas se puede ver por el coeficiente de variación obtenido de la cantidad de biomasa que se obtuvo en los cultivos, que si hay una variación considerable en la cantidad de biomasa que se obtiene. Esto seguramente se debe a que se está trabajando con un sistema biológico y suele haber muchas variaciones al trabajar con microorganismos.

En la bibliografía no se encontró una referencia de la cantidad de biomasa que se obtiene a partir de cultivos de microalgas que contengan compuestos nutraceuticos para poder hacer una comparación con la cantidad de biomasa de *P. aurelia* que se obtiene, sin embargo por las cantidades de muestra que se requerían para hacer los análisis y la cantidad de muestra que se obtenía de los cultivos, pareciera que las cantidades de biomasa que se obtienen no son demasiado altas y habría que determinar si son adecuadas para utilizar este microorganismo como un suplemento alimenticio.

6.4 Determinación cuantitativa de sustancias nutraceuticas

6.4.1 Humedad

La única comparación que se puede hacer de la humedad que contiene la biomasa de *P. aurelia* es con la microalga *Porphyridium cruentum* que tiene una humedad del 80 % (Reboloso *et al.*, 2000), ya que no se encontró otro dato de comparación en la bibliografía. El protozoo y la microalga tienen un contenido de humedad muy similar.

El coeficiente de variación para el contenido de humedad obtenido para las distintas muestras de *P. aurelia* es muy bajo con lo cual se puede decir que no hay mucha variación entre los datos por lo cual estos son confiables.

6.4.2 Proteína

El contenido de proteínas de este microorganismo, respecto de microalgas y cianobacterias resulta alto (Tabla 15) por lo cual sería factible su utilización como un suplemento proteínico aunque para poder utilizarlo como un suplemento alimenticio habría que hacer pruebas de digestibilidad y de eficiencia de la proteína. El coeficiente de variación obtenido no es muy alto por lo cual puede determinarse que los datos son confiables.

Tabla 15. Contenido de proteína en algunas microalgas y cianobacterias en base seca (Spolaore *et al.*, 2006).

Microorganismo	% proteína
<i>Anabaena cylindrica</i>	43 - 56
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48
<i>Chlorella vulgaris</i>	51 - 58
<i>Dunaliella salina</i>	57
<i>Scenedesmus obliquus</i>	28 - 39
<i>Porphyridium cruentum</i>	50 - 56
<i>Spirulina maxima</i>	60 - 71
<i>Synechococcus sp.</i>	63

Si bien, algunos de estos microorganismos tienen un contenido mayor de proteína que *P. aurelia*, hay otros que tienen un contenido similar e incluso menor de proteína, por lo que *P. aurelia* podría ser utilizado como suplemento proteínico. Además si se compara el contenido de proteína, en base seca, de *P. aurelia* (48.59 %) con el de otros alimentos ricos en proteína como leche, carne, soya y levadura, con un contenido de proteína de 26 %, 43 %, 37 % y 39 %, respectivamente (Spolaore *et al.*, 2006), se puede constatar que el contenido de proteína del protozoo es mayor que el de dichos alimentos.

6.4.3 Ácidos grasos

El contenido de ácidos grasos con actividad nutracéutica en la biomasa de *P. aurelia* tiene valores altos en cuanto a la desviación estándar y el coeficiente de variación por lo que puede verse que hay una variación bastante alta entre los tres cultivos aún cuando estos se realizaron a las mismas condiciones que son las condiciones estandarizadas con las que se obtuvo una mayor cantidad de biomasa.

Si se observan los resultados para los demás ácidos grasos se puede observar que, en general, las variaciones entre las concentraciones de ácidos grasos que no tienen actividad nutracéutica no es tan variable por lo que la variación que hubo en las concentraciones de los ácidos grasos con actividad nutracéutica posiblemente se deba a que estos ácidos grasos al tener un mayor número de insaturaciones son más sensibles a la

oxidación con lo cual se pudo dar una degradación en las distintas muestras provocando las altas diferencias entre los resultados obtenidos en la concentración de ácidos grasos con actividad nutracéutica.

Las diferencias también pueden deberse a que la calidad nutricia de la lechuga se fue perdiendo debido al tiempo que estuvo almacenada con lo cual los tres medios de cultivo probablemente no tenían la misma cantidad de nutrientes. Además estas diferencias también podrían atribuirse al diferente número de células de *P. aurelia* que había después de 72 h de cultivo en cada uno de los tres cultivos.

Tabla 16. Contenido de lípidos y ácidos grasos en distintas algas comestibles.

Microorganismo	Porcentaje total de lípidos	Porcentaje del ácido graso						Fuente
		Ácido oleico	Ácido lino-leico	Ácido γ -linoléico	Ácido α -linoléico	Ácido araquidónico	Ácido eicosapentanoico	
<i>Spirulina maxima</i>	8.63 (b.s.)*	18.37	6.57	15.8	-	-	-	Sajilata <i>et al.</i> , 2008
<i>Gracilaria changgi</i>	3.3 (b.h.)*	21.9	-	-	-	-	33.1	Norziah y Ching, 2000
<i>Porphyra sp.</i>	2.1 (b.h.)*	7.16 a 15.3	3.86 a 7.06	0.81 a 2.04	0.94 a 5.66	8.00 a 9.84	10.4 a 20.9	Dawczynski <i>et al.</i> , 2007
<i>Undaria pinnatifida</i>	4.5 (b.h.)*	5.95	7.41	1.71	11.2	13.1	13.2	Dawczynski <i>et al.</i> , 2007
<i>Porphyridium cruentum</i>	6.53 (b.s.)*	-	0.37	-	-	1.29	1.27	Reboloso <i>et al.</i> , 2000
<i>Enteromorpha spp.</i>	2.24 (b.s.)*	-	6.93 a 9.11	-	3.54 a 6.39	1.32 a 1.8	2.88 a 5.73	Aguilera <i>et al.</i> , 2005

*(b.s.): base seca, (b.h.): base húmeda

Tabla 17. Contenido de lípidos y ácidos grasos en la biomasa húmeda de *P. aurelia*.

	Promedio	DS	% CV
Porcentaje total de lípidos (b.h.)	9.12	0.22	2.41
Porcentaje total de lípidos (b.s.)	37.54	-	-
Porcentaje de ácidos grasos			
Oleico (18:1)	20.78	3.09	14.86
Linoleico (18:2)	11.11	0.6	5.43
γ -linoléico (18:3)	3.87	0.99	25.6
α -linoléico (18:3 ω 3)	2.56	0.34	13.08
Araquidónico (20:4)	6.04	1.2	19.93
Eicosapentanoico (20:5 ω 3)	0.64	0.08	12.56

Si se compara el contenido total de lípidos de las algas con el contenido de lípidos de *P. aurelia*, se puede apreciar que el protozoo tiene un contenido mayor de lípidos que las algas, sobre todo el contenido es mucho más alto que el de las algas cuyo contenido de lípidos está dado en base seca.

Se puede ver que las algas que tienen un porcentaje mayor de ácido oleico son *S. maxima* y *G. changii*, las cuales tienen un porcentaje similar de ácido oleico que *P. aurelia* por lo que el protozoo podría utilizarse como una fuente de este ácido graso. Además *P. aurelia* también tiene un porcentaje mayor de ácido linoleico que todas las algas presentes en la tabla por lo que también podría ser una fuente interesante de este ácido graso. El porcentaje de los demás ácidos grasos que contiene *P. aurelia* es mayor en las algas presentes en la tabla.

P. aurelia tiene un porcentaje muy alto de ácido palmítico que es un ácido graso saturado que aumenta los niveles séricos de colesterol LDL (Grundy, 1997), además también tiene un alto contenido de ácido cis-vaccénico que es el cuarto ácido graso con mayor proporción de *P. aurelia* y este es un ácido monoinsaturado trans que también aumenta los niveles séricos de colesterol LDL (Grundy, 1997) y debido a que la cantidad de ácidos grasos que reducen el colesterol LDL no es muy alta y que la relación que hay entre el contenido de ácidos grasos insaturados y el de saturados en cuanto al contenido total de ácidos grasos de *P. aurelia* es de 1.64, lo cual no es muy alto, el uso de este protozoo como suplemento podría no ser demasiado bueno para la salud.

6.4.4 Vitaminas

Los valores de las desviaciones estándar y los coeficientes de variación entre las concentraciones de vitaminas en los tres diferentes cultivos son muy altos y aun viendo los resultados y los cromatogramas se puede apreciar que hay una gran diferencia entre las concentraciones de una misma vitamina en los tres diferentes cultivos aun habiendo obtenido la biomasa de *P. aurelia* de los tres cultivos diferentes bajo condiciones estandarizadas de cultivo.

Se puede ver que en el caso del primer cultivo hay una concentración de las tres vitaminas muy baja en comparación con los otros dos cultivos, esto puede deberse a que las vitaminas con las que se está trabajando son muy sensibles a la oxidación y el primer cultivo estuvo almacenado por un mes antes de realizar los análisis por lo que las vitaminas que contenía pudieron haber sufrido reacciones de oxidación ocasionando una pérdida de estas. Los cultivos estuvieron almacenados en un congelador a -15° C pero

debido a que en ocasiones hay variaciones de voltaje en el laboratorio esta temperatura no se mantuvo constante y los cambios de temperatura pueden haber sido un factor importante en la descomposición de las vitaminas, además de que las muestras estaban en contacto con el oxígeno del ambiente.

El segundo cultivo tiene una concentración más alta de vitaminas que el tercero, esto puede deberse a que al preparar el medio de cultivo para el tercer cultivo la lechuga llevaba 3 semanas almacenada a una temperatura de 4° C por lo que probablemente hubo una pérdida en la calidad nutricia de la misma haciendo que el tercer cultivo tuviera una deficiencia de nutrientes en comparación al segundo cultivo. Otro factor al cual se le podría atribuir la diferencia de concentraciones de vitaminas entre el segundo y el tercer cultivo es que en el segundo cultivo hubo una mayor cantidad de células de *P. aurelia* que en el tercero aunque la diferencia entre la cantidad de células entre ambos cultivos no es tan alta.

El contenido de tocoferol del alga *Ulva lactuca* es de 7.47 mg de tocoferol en 100 g de lípidos y su contenido de lípidos es de 0.3 % en base seca, lo que equivaldría a tener 0.02 mg de tocoferol en 100 g del alga seca. El contenido de tocoferol de las hojas del alga *Durvillaea antarctica* es de 46.12 mg de tocoferol en 100 g de lípidos y su contenido de lípidos es de 0.8 % en base seca, lo que equivaldría a tener 0.37 mg de tocoferol en 100 g de hojas secas y el contenido de tocoferol en el tallo de esta misma alga es de 26.48 mg de tocoferol en 100 g de lípidos y su contenido de lípidos es de 4.3 % en base seca, lo que equivaldría a tener 1.14 mg de tocoferol en 100 g de tallo seco (Ortiz *et al.*, 2006). En promedio los tres cultivos de *P. aurelia* tienen un contenido de tocoferol de 1041.58 UI, lo que equivale a 697.86 mg de tocoferol en 100g de biomasa húmeda, esto equivaldría a tener 2873.03 mg de tocoferol en 100g de biomasa seca de *P. aurelia*, lo cual es un contenido mucho mayor de esta vitamina que lo que tienen las algas reportadas en la bibliografía, por lo que *P. aurelia* es una muy buena fuente de esta vitamina.

La ingesta diaria recomendada de vitamina E es de 15 mg/día tanto para hombres como para mujeres desde 14 años de edad (Institute of Medicine, 2005), por lo que tan solo se necesitan 0.5 g de biomasa seca de *P. aurelia* para cubrir un 100 % de la ingesta diaria recomendada de esta vitamina.

Tabla 18. Contenido de β-caroteno de una microalga y una microalga y sus equivalentes de retinol.

Organismo	Contenido de β-caroteno*	Equivalentes de retinol	Fuente
<i>Dunaliella salina</i>	2870000 µg/100 g	478333.33 µg/100 g**	Murthy <i>et al.</i> , 2005
<i>Gracilaria changgi</i>	5200 µg/100 g	865 µg/100 g	Norziah y Ching, 2000

* El contenido de β-caroteno está dado en base seca.

** Calculado con base en Tee y Lim, 1991.

El promedio de contenido de retinol de *P. aurelia* es de 1974.00 µg/100 g en base húmeda, lo que equivale a un contenido de 8127.00 µg/100 g de retinol en base seca, este contenido es de casi 10 veces el contenido de retinol del alga *Gracilaria changgi*, sin embargo la microalga *Dunaliella salina* tiene un contenido de equivalentes de retinol mucho mayor que *P. aurelia*.

La ingesta diaria recomendada de vitamina A para hombres desde 14 años de edad es de 900 µg/día, mientras que para mujeres de a partir de los 14 años de edad es de 700 µg/día (Institute of Medicine, 2005), por lo tanto con 11 g de biomasa seca de *P. aurelia* se logra el 100 % de la ingesta diaria recomendada para hombres mientras que para cubrir el 100 % de la ingesta diaria recomendada para mujeres se requieren 8.5 g.

No se puede comparar la producción de vitamina D₃ de *P. aurelia* debido a que no se encontró ninguna referencia bibliográfica de la producción de esta vitamina en otro organismo.

6.4.5 Elementos traza

Solo se pudo realizar una determinación de metales en la biomasa seca de *P. aurelia* debido a que se requería una gran cantidad de muestra para hacerla y por falta de tiempo solo se pudo juntar la cantidad de muestra necesaria para hacer una sola determinación.

Tabla 19. Contenido de metales en algunas algas.

Organismo	Contenido de metales en mg/kg						Fuente
	Mg	Ca	K	Cr	Fe	Cu	
<i>Enteromorpha spp.</i>	7100	24900	18000	-	-	-	Aguilera et al., 2005
<i>E. prolifera var. tubulosa</i>	22000	15000	33000	-	-	-	Aguilera et al., 2005
<i>Porphyridium cruentum</i>	628	12400	11900	9.2	6610	74.8	Reboloso et al., 2000

El contenido de Mg, K y Ca de *P. aurelia* es menor que el de las algas de la tabla, el contenido de Fe también es menor que el de la microalga *P. cruentum*, solamente el contenido de Cr y Cu es mayor en *P. aurelia* que en *P. cruentum*. El contenido de Se en *P. aurelia* también es muy bajo y aunque no hay otro organismo de referencia con el cual compararlo por su bajo contenido de minerales, *P. aurelia* no es una buena fuente de estos micronutrientes.

De acuerdo con el Institute of Medicine (2005), las mujeres y los hombres de entre 19 y 50 años de edad deben consumir 1000 mg de Ca al día y las personas de más de 50 años deben consumir 1200 mg de Ca

diarios. Para cubrir la ingesta diaria recomendada de este mineral se requerirían alrededor de 850 g de biomasa seca de *P. aurelia*. Mientras que los hombres de entre 14 y 50 años deben consumir 35 µg de Cr diarios, las mujeres de este mismo rango de edad deben consumir 25 µg de Cr al día. Para cubrir el consumo diario de un hombre se requerirían alrededor de 0.96 g de biomasa seca de *P. aurelia* mientras que para una mujer se requerirían alrededor de 0.68 g. Asimismo, tanto en hombres como en mujeres de más de 19 años de edad la ingesta diaria recomendada de Cu es de 900 µg diarios. Para cubrir la ingesta diaria recomendada de este mineral se requerirían alrededor de 9.3 g de biomasa seca de *P. aurelia*. Mientras que las mujeres de entre 19 y 50 años de edad requieren un consumo diario de Fe de 18 mg diarios, los hombres de más de 19 años requieren 8 mg de Fe al día. Con alrededor de 23 g de biomasa seca de *P. aurelia* se podría cubrir la ingesta diaria recomendada para mujeres mientras que para los hombres solo se requeriría de aproximadamente 10 g. En cuanto a los hombres de más de 14 años requieren de una ingesta diaria de Mg de entre 400 y 420 mg diarios, las mujeres de más de 19 años requieren de una ingesta de este mineral de entre 310 y 320 mg al día. Para cubrir la ingesta diaria en hombres se requerirían de 285 g de biomasa seca de *P. aurelia* mientras que para mujeres solamente se requerirían alrededor de 217 g. Finalmente, tanto los hombres como las mujeres de más de 14 años de edad se requiere un consumo diario de 55 µg de Se. Para cubrir la ingesta diaria recomendada de este mineral se requerirían alrededor de 118 g de biomasa seca de *P. aurelia*.

7 Conclusiones

Se logró aislar el microorganismo *Paramecium* sp. de un encharcamiento de agua dulce y se pudo establecer una estrategia para determinar el contenido proteico y de sustancias nutraceuticas.

Se determinó que la mezcla de infusión de lechuga y trigo constituye un medio de cultivo adecuado para el crecimiento óptimo de *Paramecium* sp. Se logró cultivar axénicamente al protozoo.

Las técnicas de reconocimiento morfológico y de infraciliatura, así como de biología molecular (PCR) indican que la especie cultivada corresponde a *Paramecium aurelia*.

Las condiciones óptimas para la obtención de mayor cantidad de biomasa del cultivo de *P. aurelia* en el bio-reactor fueron: pH de 7, una agitación de 70 rpm, 28° C, oxígeno disuelto superior a 2 mg/L, empleando 700 mL de medio de cultivo, 300 mL de inóculo y aforando a 2 L con agua destilada.

El contenido de humedad en la biomasa de *P. aurelia* fue cercana al 76 %. En cuanto al contenido de proteína, en base seca, fue de aproximadamente 48.6 %, lo indica que sería factible su uso como suplemento proteínico, siempre y cuando la digestibilidad de la proteína sea alta y no existan indicios de toxicidad.

P. aurelia presenta un mayor contenido de lípidos totales que las algas reportadas en la bibliografía. Además, por el alto porcentaje de ácido oleico y linoleico que contiene, podría utilizarse como una fuente de estos dos ácidos. No obstante, debe tenerse presente que también contiene un alto porcentaje de ácido cis-vaccénico y palmítico, los cuales aumentan los niveles de colesterol LDL.

P. aurelia tiene un alto contenido de tocoferol, el cual es mucho mayor que el de algunas algas, por lo cual este protozoo podría ser una buena fuente de esta vitamina cuyas propiedades resultan antioxidantes.

P. aurelia tiene un contenido mucho menor de retinol que una microalga, pero tiene un contenido mayor que el de un alga. En el caso del ser humano, al no requerir de una gran cantidad de biomasa para cubrir sus requerimientos diarios, este protozoo podría ser una buena fuente de la misma.

En general, el contenido de minerales que tiene *P. aurelia* es menor que el de las algas reportadas en la bibliografía y por su bajo contenido de estos, este protozoo no es una buena fuente de minerales, excepto para los minerales que tienen una ingesta diaria recomendada baja que son Cr, Cu y Fe.

La cantidad de biomasa que se obtiene de *P. aurelia* en el bio-reactor, puede considerarse muy baja y habría que hacer estudios para determinar si es posible incrementar de manera significativa la densidad de este ciliado.

Recomendaciones

Para que no exista una variación tan grande en el contenido de los nutrientes como lo hubo en las vitaminas y en algunos ácidos grasos se podría utilizar un medio de cultivo que pudiera ser estandarizado más fácilmente. Por ejemplo, usar lechuga seca en lugar de usar lechuga fresca la cual va perdiendo su calidad nutricia durante el tiempo de almacenamiento, causando diferencias en los medios de cultivo hechos con la lechuga recién comparada y después de una o más semanas de almacenaje.

Para saber si *P. aurelia* se puede usar como un suplemento alimenticio faltaría hacer pruebas de toxicidad para determinar que este protozoo no causa daños a la salud y también habría que hacer pruebas de biodisponibilidad de los nutraceuticos encontrados. Lo anterior, en su conjunto, serviría para determinar si este ciliado representaría más problemas que beneficios para la salud humana y si su cultivo es o no costeable.

8 Bibliografía

- Aguilera-Morales M., Casas-Valdez M., Carrillo-Domínguez S., González-Acosta B. y Pérez-Gil F. 2005. *Chemical composition and microbiological assays of marine algae Enteromorpha spp. as a potential food source*, Journal of Food Composition and Analysis 18(1):79-88.
- Aladro-Lubel M, Martínez M y Mayén-Estrada R. 1990. Manual de ciliados psamófilos marinos y salobres de México. Cuadernos 9. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 167 pp.
- Ali R., Athar M., Abdullah U., Abudiat Abidi S y Qayyum M. 2009. *Nutraceuticals as natural healers: Emerging evidences*, African Journal of Biotechnology 8(6):891-898.
- Andlauer W. y Fürst M. 2002. *Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook*. Food Research International 35(2-3):171-176.
- APHA. 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th edition*. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, EE UU: 1220pp.
- Badimon L. Vilahur G. y Padro T. 2010. *Nutraceuticals and Atherosclerosis: Human Trials*, Cardiovascular Therapeutics 28(4):202–215.
- Beale G. H. 1954. The genetics of *Paramecium aurelia*; Cambridge University Press, Gran Bretaña, Pp. 13-15, 17, 21-23.
- Beale Geoffrey H. y Preer John R. Jr. 2008. *Paramecium: genetics and epigenetics*; CRC Press, EUA, Pp. 22, 23.
- Becker E.W. 2007. *Micro-algae as a source of protein*, Biotechnology Advances 25(2):207-210.
- Biruete G. A., Juárez H. E., Sieiro O. E., Romero V. R. y Silencio B. J. L. 2009. *Los nutracéuticos. Lo que es conveniente saber*, Revista Mexicana de Pediatría 76(3):136-145.
- Castro P. 2004. Evaluación de la toxicidad de lixiviados de recorte de perforación sobre el ciliado edafícola *Colpoda cucucllus*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 90 pp.
- Catania F., Wurmser F., Potekhin A., Przybos E. y Lynch M. 2009. *Genetic Diversity in the *Paramecium aurelia* Species Complex*, Molecular Biology and Evolution 26(2):421–431.
- Clesceri L. S., Greenberg A. E., Eaton A. D. y Franson H. 1998. Standard methods. for the examination of water and wastewater, American Public Health Association, Washington, DC. Pp. 103-106.
- Colla L.M., Oliveira Reinehr C., Reichert C. y Vieira Costa J.A. 2007. *Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes*, Bioresource Technology 98(7):1489-1493.
- Daví G., Santilli F. y Patrono C. 2010. *Nutraceuticals in Diabetes and Metabolic Syndrome*, Cardiovascular Therapeutics 28(4):216–226

- Dawczynski C., Schubert R. y Jahreis G. 2007. *Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products*, Food Chemistry 103(3): 891–899.
- Eskin M. y Tamir S. 2006. Dictionary of Nutraceuticals and Functional Foods, CRC Press, EUA.
- Fleurence J. 1999. *Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses*, Trends in Food Science and Technology 10(1):25-28.
- Foissner W. 1991. *Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa*, European Journal of Protistology 27(4):313-330.
- Fokin S.I., Przybos E., Chivilev S.M., Beier C.L., Horn M., Skotarczak B., Wodecka B. y Fujishima M. 2004. *Morphological and molecular investigations of Paramecium schewiakoffi sp. nov. (Ciliophora, Oligohymenophorea) and current status of distribution and taxonomy of Paramecium spp.*, European Journal of Protistology 40(3):225–243.
- Grundy S.M. 1997. *What is the desirable ratio of saturated, polyunsaturated, and monounsaturated fatty acids in the diet?*, American Journal of Clinical Nutrition 66(suppl):988-990.
- Herrero M., Cifuentes A. e Ibáñez E. 2006. *Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae A review*, Food Chemistry 98(1):136-148.
- Horrocks L.A. y Yeo Y.K. 1999. *Health benefits of docosahexaenoic acid(DHA)*, Pharmacological Research 40(3):211-225.
- Hugenholtz J., Hunik J., Santos H. y Smid E. 2002. *Nutraceutical production by propionibacteria*, Lait 82:103-112.
- Institute of Medicine of the National Academies. 2005. *Dietary Reference Intakes: Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids*. National Academies Press.
- Islam S.N., Begum P. y Ahsan M. 2005. *Serum Micronutrient (α -tocopherol, retinol, copper, zinc) Status of Immunosuppressed Rats*, Malaysian Journal of Nutrition 11(1):69-73.
- Jurand A. y Selman G. G. 1969. The anatomy of Paramecium aurelia, MacMillan, Londres, p. 10.
- Lau F.C., Bagchi M., Sen C.K. y Bagchi D. 2008. *Nutrigenomic basis of beneficial effects of chromium(III) on obesity and diabetes*, Molecular and Cellular Biochemistry 317(1-2):1–10.
- Linko Y.Y. y Hayakawa K. 1996. *Docosahexaenoic acid: A valuable nutraceutical?*, Trends in Food Science and Technology 7(2):59-63.
- Luna Pabello V.M. 2006. Atlas de ciliados y otros microorganismos frecuentes en sistemas de tratamiento aerobio de aguas residuales, Laboratorio de Microbiología Experimental, Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM, 111pp.

- Margulis L, Corliss O, Melkonian M y Champan J. 1990. Handbook of Protoctista. Ed Jones and Bartlett Publishers. USA. 914 pp.
- Maruyama C., Fujisawa H. y Takagi Y. 2001. *Age-associated survival and extinction in mixed cultures of Paramecium*, European Journal of Protistology 37(3):303–312.
- Montes Nava A.M. 2006. Efecto de la exposición a diversos metales en la sobrevivencia de Spirostomum intermedium y Paramecium caudatum, Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, 110pp.
- Murthy K.N.C., Vanitha A., Rajesha J., Swamy M.M., Sowmya P.R. y Ravishankar G.A. 2005. *In vivo antioxidant activity of carotenoids from Dunaliella salina - A green microalga*, Life Sciences 76(12):1381-1390.
- Nève J. 2002. *Selenium as a 'nutraceutical': how to conciliate physiological and supra nutritional effects for an essential trace element*, Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care 5(6):659-663.
- Norziah M.H. y Ching C.Y. 2000. *Nutritional composition of edible seaweed Gracilaria changgi*, Food Chemistry 68(1):69-76.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Edition, 2005. Method 34.1.08 AOAC Official Method 923.07. Lipids and lipids phosphorous (P₂O₅) in eggs. Wet Ashing Method.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Edition, 2005. Method 41.1.28 AOAC Official Method 969.33. Fatty acids in oils and fats. Preparation of methyl esters. Boron trifluoride method.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Edition, 2005. Method 4.8.02 AOAC Official Method 968.08. Minerals in animal feed and pet food. Atomic absorption spectrophotometric method.
- Ortiz J., Romero N., Robert P., Araya J., López-Hernández J., Bozzo C., Navarrete E., Osorio A. y Ríos A. 2006. *Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds Ulva lactuca and Durvillaea antarctica*, Food Chemistry 99(1):98–104.
- Osborn H.T. y Akoh C.C. 2002. *Structured Lipids—Novel Fats with Medical, Nutraceutical, and Food Applications*, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 1:93-103.
- Plaza M., Cifuentes A. e Ibáñez E. 2008. *In the search of new functional food ingredients from algae*, Trends in Food Science and Technology 19(1):31-39.
- Pon R.T. 1996. *Infusoria and Paramecium cultures*, Calquarium 38(10).
- Przybos E. y Fokin S. 2000. *Data on the occurrence of species of the Paramecium aurelia complex world-wide*, Protistology 1(4): 179–184.
- Rebolloso Fuentes M.M., Acien Fernández G.G., Sánchez Pérez J.A. y Guil Guerrero J.L. 2000. *Biomass nutrient profiles of the microalga Porphyridium cruentum*, Food Chemistry 70(3):345-353.

- Sajilata M.G., Singhal R.S. y KamatM.Y. 2008. *Supercritical CO₂ extraction of γ -linolenic acid (GLA) from Spirulina platensis ARM 740 using response surface methodology*, Journal of Food Engineering 84(2):321-326.
- Salazar M., Chamorro G.A., Salazar S. y Steele C.E. 1996. *Effect of Spirulina maxima Consumption on Reproduction and Peri- and Postnatal Development in Rats*, Food and Chemical Toxicology 34(4):353-359.
- Sheng J., Yu F., Xin Z., Zhao L., Zhu X. y Hu Q. 2007. *Preparation, identification and their antitumor activities in vitro of polysaccharides from Chlorella pyrenoidosa*, Food Chemistry 105(2):533-539.
- Silva Reyes C.A. 2008. Evaluación comparativa de la capacidad depredadora de Paramecium multimicronucleatum y Rotaria rotatoria sobre poblaciones de enterobacterias, Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, 61pp.
- Silva Reyes C.A. 2003. Evaluación comparativa de la eficiencia de eliminación de Escherichia coli empleando hipoclorito de sodio, plata coloidal y Paramecium caudatum, Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, 73pp.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. e Isambert A. 2006. *Commercial Applications of Microalgae*, Journal of Bioscience and Bioengineering 101 (2):87-96.
- Sullivan D. y Crowley R. 2006. *Development and validation of analytical methods for dietary supplements*, Toxicology 221(1):28–34.
- Tee E.-S. y Lim C.-L. 1991. *Carotenoid composition and content of Malaysian vegetables and fruits by the AOAC and HPLC methods*, Food Chemistry 41(3):309-339.
- Valcarce G., Muñoz L., Nusblat A., Nudel C. y Florin-Christensen J. 2001. *The Improvement of Milk by Cultivation with Ciliates*, Journal of Dairy Science 84(10):2136–2143.
- Van Wagtendonk W. J. 1974. Paramecium. A Current Survey, Elsevier Scientific Publishing Co., Holanda, Pp. 1, 3, 14-16.
- Wijendran V. y Hayes K.C. 2004. *Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health*, Annual Review of Nutrition 24:597–615.

9 Anexos

9.1 Anexo A. Medios de cultivo

Infusión de lechuga

Lechuga Romana fresca.....7 g
Agua destilada.....100 mL

El agua se coloca en un matraz Erlenmeyer y se agrega la lechuga cortada en trozos pequeños, la mezcla se pone a ebullición y una vez que comienza a hervir el agua se retira la infusión del fuego.

Infusión de trigo

Semillas enteras de trigo.....13 g
Agua destilada.....350 mL

El agua se coloca en un matraz Erlenmeyer y se agregan las semillas de trigo, la mezcla se pone a ebullición y se deja hervir por unos 10 min.

9.2 Anexo B. Técnicas de tinción

Hematoxilina de Harris

Reactivos:

Albúmina-glicerol de Mayer

Albúmina - 30 mL

Glicerol - 20 mL

Formol comercial - 3 gotas

Se diluyen 9 mL de mezcla con 1 mL de agua destilada

Cloruro de magnesio al 8 %

Fijador Nissenbaun (conservar en frasco ámbar)

Solución acuosa saturada de cloruro de mercurio - 10 mL

Ácido acético glacial - 2 mL

Formol comercial - 2 mL

tert-butanol - 10 mL

Formol al 5 %

Hematoxilina de Harris

Etanol al 50 %, al 70 %, al 96 % y absoluto

Xilol

Bálsamo de Canadá

Procedimiento:

1. Colocar en un portaobjetos una gota de albúmina-glicerol de Mayer, extender con un cubreobjetos y dejar secar, posteriormente agregar una gota concentrada de microorganismos.
2. Agregar una gota de fijador Nissenbaun o formol al 5 %.
3. Lavar con agua destilada dos veces.
4. Teñir con hematoxilina de Harris 5 minutos.
5. Lavar con agua de la llave y escurrir.
6. Lavar con agua destilada y escurrir.
7. Deshidratar con alcoholes introduciendo el portaobjetos en alcohol al 50 %, después al 70 % y por último al 96 % dejando el portaobjetos 5 min en las soluciones de 50 y 70 % y 10 min en la solución al 96 %.

8. Aclarar con xilol sumergiendo el portaobjetos durante 10 min.
9. Montar con bálsamo de Canadá.

Técnica de Klein (Nitrato de plata “en seco”)

Reactivos:

Nitrato de plata al 5 %.

Bálsamo de Canadá

Procedimiento:

1. Colocar una gota de cultivo sobre un cubreobjetos, esta se extiende con una aguja de disección y se deja secar.
2. Introducir el cubreobjetos en una solución de nitrato de plata al 5 % durante 5 min.
3. Lavar con agua destilada 2 veces.
4. Colocar el cubreobjetos en una caja Petri con agua destilada bajo una lámpara de rayos UV durante 5 min. Colocar una hoja blanca debajo de la caja Petri.
5. Lavar con agua destilada.
6. Dejar secar al aire.
7. Montar con bálsamo de Canadá.

Carbonato de plata piridinado

Reactivos:

Formol comercial

Piridina

Solución de Río-Hortega

Solución acuosa de nitrato de plata al 10 % - 50 mL

Solución acuosa de carbonato de sodio al 5 % - 150 mL (esta se va agregando poco a poco a la solución de nitrato de plata agitándola constantemente)

Agregar amoníaco al 25 % gota a gota y agitar hasta que el precipitado se disuelva, teniendo en cuenta de no agregar en exceso. Agregar agua destilada hasta un volumen total de 750 mL

Solución proteosa-peptona

Agua destilada – 96 mL

Proteosa-peptona (bacteriológica) – 4 g (esparcirla sobre la superficie del agua y dejar que se disuelva sin mezclar)

Formol - 0.5 mL

Tiosulfato de sodio al 5 %

Albúmina-glicerol de Mayer

Albúmina 30 mL

Glicerol 20 mL

Formol comercial 3 gotas

Se diluyen 9 mL de mezcla con 1 mL de agua destilada

Etanol al 70 %, al 96 % y absoluto

Xilol

Bálsamo de Canadá

Procedimiento:

1. Colocar en una cápsula de porcelana 3 mL de cultivo.
2. Fijar con 3 gotas de formol por 2 min.
3. Agregar 10 gotas de piridina.
4. Agregar 2 mL de la solución Río-Hortega.

5. Agregar 10-15 gotas de proteosa-peptona.
6. Agregar 20 mL de agua destilada.
7. Calentar sobre una placa de calentamiento a 60° C, hasta obtener un color amarillo-pardo.
8. Vaciar el contenido a otra cápsula de porcelana que contenga 15 mL de tiosulfato de sodio al 5 %.
9. Lavar con agua destilada (varias veces). Para ello se utiliza una micropipeta, teniendo cuidado de no tomar el material que está depositado en el fondo de la cápsula, donde se encuentran los especímenes impregnados.
10. Tomar una gota del fondo de la cápsula y poner sobre el portaobjetos y cubrirlo con el cubreobjetos.
11. Los protozoos se colocan en el portaobjetos y se agrega una pequeña gota de albúmina-glicerol de Mayer. El material se distribuye homogéneamente y se deja secar a temperatura ambiente por varias horas.
12. Cubrir la preparación con una mezcla alcohol-formol (8:2) dejar 1 min y lavar 2 min, dejar secar.
13. Deshidratar en una serie de alcoholes al 70 %, 96 % dejando el portaobjetos 3 min en cada alcohol y después 6 min en alcohol absoluto.
14. Sumergir el portaobjetos 1 min en xilol.
15. Montar con Bálsamo de Canadá.

Nigrosina-HgCl₂-Formol (NMF)

Reactivos:

Cloruro de magnesio al 8 %

Fijador-colorante

Solución Nissenbaun (conservar en frasco ámbar)

Solución acuosa saturada de cloruro de mercurio - 10 mL

Ácido acético glacial - 2 mL

Formol comercial - 2 mL

tert-butanol - 10 mL

Solución Deroux – Faidy (conservar en frasco ámbar)

Formol comercial - 2 mL

Nigrosina – 4 g

Agua destilada – 100 mL

Etanol al 70 %, 80 %, 96 % y absoluto.

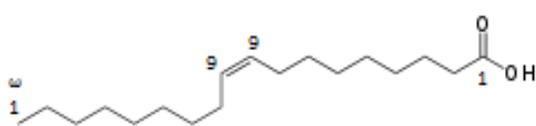
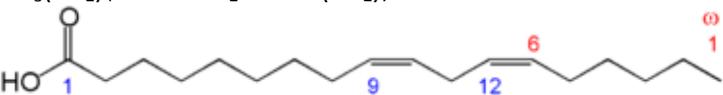
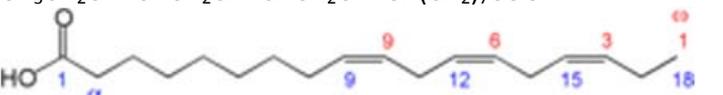
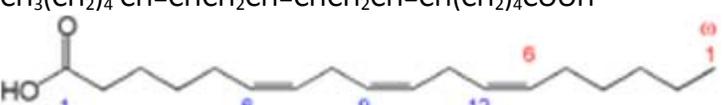
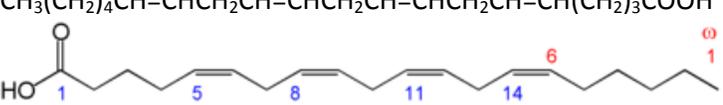
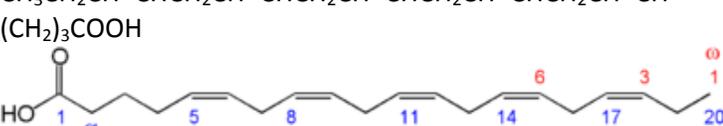
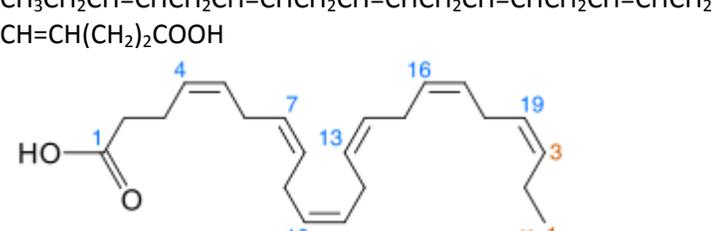
Xilol

Bálsamo de Canadá

Procedimiento:

1. Concentrar los protozoos centrifugando por 2 min a 500 rpm y decantando el sobrenadante o mediante micropipeteo observando en el microscopio.
2. Colocar 1 a 2 gotas del cultivo concentrado sobre un portaobjetos y agregar cloruro de magnesio al 8 % dejando por 5 a 10 min o hasta que el líquido se evapore.
3. Mezclar 12 partes de la solución Nissenbaun y una parte de solución Deroux-Faidy. Añadir 2 a 3 gotas de esta mezcla a una altura de 2 a 3 cm en posición perpendicular a la preparación.
4. Después de unos segundos, agregar varias gotas del fijador-colorante en uno de los extremos del portaobjetos, dejando que corra al centro del portaobjetos, después de 15 a 25 s, escurrir el exceso.
5. Deshidratar en alcoholes, dejando la preparación de 3 a 5 min en el alcohol al 70 %, después en el de 80 %, posteriormente en el de 96 % y por último en el absoluto.
6. Aclarar con xilol dejando la preparación 5 min dentro de este un par de veces.
7. Montar con bálsamo de Canadá.

9.3 Anexo C. Fórmula y estructura de ácidos grasos con actividad nutracéutica

Nombre común	Abreviación química	Fórmula semidesarrollada y estructural
Ácido oleico	18:1cΔ ⁹ (ω-9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ 
Ácido linoleico	18:2cΔ ^{9,12} (ω-6)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ 
Ácido α-linolénico	18:3cΔ ^{9,12,15} (ω-3)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ 
Ácido γ-linolénico	18:3cΔ ^{6,9,12} (ω-6)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ 
Ácido araquidónico	20:4cΔ ^{5,8,11,14} (ω-6)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ 
Ácido eicosapentanoico (EPA)	20:5cΔ ^{5,8,11,14,17} (ω-3)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ 
Ácido docosahexanoico (DHA)	22:6cΔ ^{4,7,10,13,16,19}	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ 

9.4 Anexo D. Límite de detección del método de absorción atómica

Límite de detección para los diferentes metales analizados:

Mg	0.054 mg/kg
K	-
Ca	8.240 mg/kg
Cr	0.031 mg/kg
Fe	1.454 mg/kg
Cu	0.022 mg/kg
Se	0.015 mg/kg