

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está 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 o titular de los Derechos Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida con
orientación en Biotecnología Marina**

**Bioprospección de extractos microalgales con potencial
aplicación biomédica**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

Presenta:

Ana Karen Vitela González

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Ana Karen Vitela González

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Codirectora de tesis

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Codirectora de tesis

Miembros del Comité

Dra. María del Carmen Maya Sánchez

Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas

Dra. Johana Bernáldez Sarabia



Dra. Ana Denise Re Araujo
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Ana Karen Vitela González** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Bioprospección de extractos microalgales con potencial aplicación biomédica

Resumen aprobado por:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Codirectora de tesis

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Codirectora de tesis

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que tienen la capacidad de producir diversos metabolitos con actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana y/o anticancerígena. Por lo anterior, ha incrementado la búsqueda de metabolitos con fines biomédicos a través de bioprospecciones para combatir enfermedades. El objetivo de esta investigación fue ampliar el conocimiento de la aplicación de extractos microalgales en el área biomédica. La producción masiva de biomasa se realizó con *Synechococcus elongatus*, *Porphyridium cruentum* y *Anagnostidinema lemermannii*. En los cultivos se evaluó la tasa de crecimiento, el tiempo de generación, la productividad y el rendimiento de biomasa. Los resultados mostraron que *A. lemermannii* presentó la mayor productividad. Se obtuvieron extractos orgánicos utilizando los solventes: diclorometano, metanol y hexano, así como agua, de la biomasa de los cultivos, y se evaluó su potencial aplicación en el área biomédica mediante pruebas de actividades antioxidante, neutralización del radical óxido nítrico, antimicrobiana y citocompatibilidad. Con base en los resultados obtenidos, se eligió el extracto metanólico de *P. cruentum*, ya que fue el único que presentó compatibilidad con la línea celular L929 (fibroblastos de ratón). Sin embargo, el extracto metanólico de *P. cruentum* no presentó actividad antioxidante, antiinflamatoria, ni antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ni *Escherichia coli*, a las concentraciones evaluadas: 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 mg/mL. En el ensayo de viabilidad celular (MTT), el extracto metanólico de *P. cruentum* disminuyó el crecimiento de células de cáncer pancreático al ser evaluado en la línea BxPC-3, lo que sugiere que este extracto puede ser una buena opción para evaluar su potencial aplicación anticancerígena.

Palabras clave: Microalgas, extractos, solventes, bioactividad, biomedicina

Abstract of the thesis presented by **Ana Karen Vitela González** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Marine Biotechnology.

Bioprospection of microalgal extracts with potential biomedical application

Abstract approved by:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

Thesis co-director

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña

Thesis co-director

Microalgae are photosynthetic microorganisms that have the ability to produce various metabolites with antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and/or anticancer activity. Therefore, the search for metabolites for biomedical purposes through bioprospecting to combat diseases has increased. The objective of this research was to expand the knowledge of the application of microalgal extracts in the biomedical area. Mass production of biomass was carried out with *Synechococcus elongatus*, *Porphyridium cruentum* and *Anagnostidinema lemermannii*. On the cultures, growth rate, generation time, productivity and biomass yield were evaluated. The results showed that *A. lemermannii* presented the highest productivity. Organic extracts were obtained using the solvents: dichloromethane, methanol and hexane, as well as water, from the biomass of the cultures, and their potential application in the biomedical area was evaluated through tests of antioxidant activities, neutralization of the nitric oxide radical, antimicrobial and cytocompatibility. Based on the results obtained, the methanolic extract of *P. cruentum* was chosen, since it was the only one that showed compatibility with the L929 cell line (mouse fibroblasts). However, the methanolic extract of *P. cruentum* did not show antioxidant, anti-inflammatory or antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* or *Escherichia coli*, at the concentrations tested: 0.3, 0.4, 0.5 and 0.6 mg/mL. In the cell viability test (MTT), the methanolic extract of *P. cruentum* decreased the growth of pancreatic cancer cells when evaluated in the BxPC-3 line, suggesting that this extract may be a good option to evaluate its potential anticancer application.

Keywords: Microalgae, extracts, solvents, bioactivity, biomedicine

Dedicatoria

A mi familia, por acompañarme con amor en todas mis metas.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica de Educación Superior de Ensenada, Baja California por permitirme realizar mis estudios de maestría en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina en la institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado por medio de la beca número 1065981 para realizar mis estudios de posgrado.

A mis codirectoras de tesis la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra y a la Dra. Ana Bertha Castro Ceseña por aceptarme en sus grupos de investigación y su apoyo incondicional, tanto en el ámbito académico como en el personal. Además, agradezco infinitamente el enseñarme a confiar en mí misma.

A los miembros de mi comité de tesis: La Dra. Ceres A. Molina Cárdenas por su apoyo, paciencia, compartirme su conocimiento y capacitarme durante la realización de los experimentos. La Dra. Johanna Bernáldez Sarabia por sus consejos y capacitación en cultivos de líneas celulares. La Dra. María del Carmen Maya Sánchez por su apoyo durante los avances de tesis.

A las personas que me ayudaron en todo momento: La M. en C. Fátima Castro Ochoa, por apoyarme en la realización de la parte experimental de la tesis y por sus consejos. A mis compañeros de laboratorio y amigos, de los cuales pude aprender mucho sobre la vida misma.

A mi familia por apoyarme siempre, incluso en la distancia.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Cultivo de microalgas	2
1.1.2 Compuestos con aplicación biomédica.....	3
1.2 Justificación	6
1.3 Hipótesis.....	6
1.4 Objetivos	6
1.4.1 Objetivo general.....	6
1.4.2 Objetivos específicos.....	7
Capítulo 2. Metodología.....	8
2.1 Estandarización de procedimientos y selección de extracto	8
2.2 Caracterización del crecimiento de microalgas	8
2.2.1 Incremento del volumen de los cultivos	8
2.2.2 Producción masiva en matraces Fernbach de 2 L.....	9
2.2.3 Cosecha de biomasa.....	9
2.3 Evaluación de la biomasa	10

2.3.1	Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación.....	10
2.3.2	Rendimiento y productividad.....	10
2.4	Obtención de extractos.....	11
2.4.1	Extractos acuosos.....	11
2.4.2	Extractos orgánicos.....	12
2.5	Criterios de selección de los extractos con potencial aplicación biomédica.....	12
2.5.1	Actividad antimicrobiana.....	13
2.5.2	Mantenimiento de líneas celulares.....	14
2.5.2.1	Ensayos de viabilidad celular.....	15
2.6	Ensayo final: Caracterización del extracto metanólico de <i>P. cruentum</i>	17
2.6.1	Actividad antioxidante.....	17
2.6.2	Capacidad de remoción del radical óxido nítrico.....	18
2.6.3	Cuantificación de citocinas en células HHSC-NASH.....	18
2.7	Caracterización química mediante FTIR.....	19
2.8	Perfil de ácidos grasos de la especie <i>P. cruentum</i>	19
2.9	Análisis estadístico.....	20
Capítulo 3. Resultados.....		21
3.1	Estandarización de procedimientos y selección de extracto.....	21
3.2	Caracterización del crecimiento de microalgas.....	21
3.2.1	Perfil de pH en los cultivos microalgales en cultivos de 100 mL.....	22
3.2.2	Tasa de crecimiento y tiempo de generación.....	22
3.2.3	Rendimiento y productividad de biomasa.....	24
3.3	Producción masiva en matraces Fernbach 2 L.....	24
3.3.1	Perfil de pH en los cultivos microalgales en cultivos de 2 L.....	25
3.3.2	Tasa de crecimiento y tiempo de generación.....	26
3.3.3	Rendimiento y productividad de la biomasa obtenida de la producción masiva.....	26

3.4	Criterios de selección del extracto con potencial aplicación biomédica	28
3.4.1	Actividad antimicrobiana	28
3.4.2	Viabilidad celular en fibroblastos de ratón L929 (supervivencia celular)	30
3.5	Ensayo final: Bioprospección del extracto metanólico de <i>P. cruentum</i> (MPC).....	33
3.5.1	Actividad antimicrobiana	33
3.5.2	Actividad antioxidante	33
3.5.3	Remoción de óxido nítrico	34
3.5.4	Cuantificación de citocinas en células HHSC-NASH.....	35
3.5.4.1	Viabilidad celular del extracto MPC en células HHSC-NASH.	36
3.5.5	Citotoxicidad del extracto metanólico de <i>P. cruentum</i> en células de cáncer pancreático	36
3.6	Caracterización del extracto metanólico de <i>P. cruentum</i> (MPC)	37
3.6.1	Identificación de grupos funcionales mediante FTIR	37
3.6.2	Perfil de ácidos grasos de la biomasa de <i>P. cruentum</i>	38
Capítulo 4.	Discusión.....	39
Capítulo 5.	Conclusiones	47
Literatura citada		48

Lista de figuras

- Figura 1.** Valores promedio y desviación estándar de las curvas de crecimiento de los cultivos mantenidos en un volumen de 100 mL de las especies *P. cruentum* (A), *S. elongatus* (B) y *A. lemermannii* (C) evaluadas a 550 y 680 nm. 21
- Figura 2.** Valores promedio y desviación estándar de los valores de pH de los cultivos de *A. lemermannii*, *P. cruentum* y *S. elongatus* mantenidos en un volumen de 100 mL de medio "f". 22
- Figura 3.** Tasa de crecimiento de los cultivos de 100 mL de las especies *P. cruentum*, *A. lemermannii* y *S. elongatus*. Las barras de error muestran una desviación estándar (n=3) y el nivel de significancia se denota como **** (p<0.0001). 23
- Figura 4.** Tiempo de generación de los cultivos de 100 mL de las especies *P. cruentum*, *A. lemermannii* y *S. elongatus*. Las barras de error muestran una desviación estándar (n=3) y el nivel de significancia se denota como *** (p<0.001), **** (p<0.0001). 23
- Figura 5.** Rendimiento de biomasa (A) y productividad de los cultivos (B) de las tres especies de microalga evaluadas, mantenidos en 100 mL de medio "f". Las barras de error muestran una desviación estándar (n=3) y el nivel de significancia se denota como *(p<0.05), *(p<0.01), *** (p<0.001), **** (p<0.0001). 24
- Figura 6.** Valores promedio y desviación estándar de las curvas de crecimiento evaluadas por densidad óptica a 550 nm y 680 nm para *P. cruentum* (A), *A. lemermannii* (B) y *S. elongatus* (C) mantenidas en 2 L de medio "f" 25
- Figura 7.** Valores promedio y desviación estándar del pH de las especies *A. lemermannii*, *P. cruentum* y *S. elongatus* mantenidos en matraces Fernbach con 2 L de medio "f" 26
- Figura 8.** Valores promedio y desviación estándar (n=3) de la tasa de crecimiento (A) y el tiempo de generación (B) de los cultivos de las especies *P. cruentum*, *A. lemermannii* y *S. elongatus*, mantenidos en 2 L de medio "f". El nivel de significancia se denota como *** (p<0.001), **** (p<0.0001). 27
- Figura 9.** Rendimiento de biomasa (A) y productividad de los cultivos (B) de las tres especies de microalga evaluadas, mantenidos en 2 L de medio "f". Las barras de error muestran una desviación estándar (n=3) y el nivel de significancia se denota como *(p<0.05), *(p<0.01), *** (p<0.001), **** (p<0.0001). 27
- Figura 10.** Fotografía de los halos de inhibición del extracto de diclorometano no filtrado (0.2 mg/disco) de la especie *A. lemermannii*, comparados con los halos de inhibición de un apósito comercial (0.2 mg de Ag) y el antibiótico carbencilina (100 µl/disco) contra la bacteria Gram negativa *E. coli*. 28
- Figura 11.** Fotografías de los halos de inhibición de los extractos microalgales (sin Kolliphor) de *P. cruentum* a la concentración de 2 mg/disco, contra las bacterias: *E. coli* (A), *K. pneumoniae* (B). 29
- Figura 12.** Porcentaje de la viabilidad celular de los extractos diclorometano, metanol, hexano y acuosos de las especies de microalgas: *P. cruentum*, *A. lemermannii* y *S. elongatus*. Donde DCM+K representa el control del extracto diclorometano más el emulsificante Kolliphor (K), Hex+K es el solvente hexano más Kolliphor y Met+K representa al control del extracto metanólico más el emulsificante Kolliphor, todos en una relación solvente y Kolliphor (1:0.125). Se realizó un ANOVA

- de dos vías: Las barras de error muestran una desviación estándar (n=3), y todos los extractos presentaron diferencias significativas ****($p < 0.0001$) con respecto al control (Monocapa L929), excepto el agua destilada (AD)..... 31
- Figura 13.** Promedio y desviación estándar (n=3) del porcentaje de viabilidad celular de los extractos metanólicos de las tres especies de microalga a las concentraciones: 0.3 mg/mL y 1 mg/mL en la línea celular L929. El nivel de significancia (ANOVA de dos vías) se denota como *($p < 0.05$), **** ($p < 0.0001$), prueba *a posteriori* de Tukey. Control PC: control *P. cruentum* (agua, etanol y Kolliphor), control AL: *A. lemermannii* (agua, etanol y Kolliphor) y control SE: *S. elongatus* (agua, etanol y Kolliphor)..... 32
- Figura 14.** Viabilidad celular del extracto metanólico de *P. cruentum* (extracto MPC) y el control PC etanol más Kolliphor (1mL:0.125mL) en la línea celular L929. Las barras de error muestran una desviación estándar (n=3) y el nivel de significancia se denota como *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), **** ($p < 0.0001$)..... 32
- Figura 15.** (A) Grafica de promedios de los halos de inhibición del extracto metanólico de *P. cruentum* (MPC) a las concentraciones: 0.3, 0.6 y 1 mg/mL contra la especie *S. aureus*. (B) Fotografía donde se observan las zonas de inhibición (diámetro) del extracto evaluado. 33
- Figura 16.** Capacidad antioxidante del extracto metanólico de *P. cruentum*. Porcentaje de inhibición de la oxidación del radical ABTS. Control negativo (agua, Kolliphor y etanol) denominado "Sin extracto". Las barras verticales representan la desviación estándar (n=3) y el nivel de significancia se denota como *** ($p < 0.001$). 34
- Figura 17.** Valores promedio y desviación estándar (n=3) del porcentaje de remoción de NO• del extracto metanólico de *P. cruentum* a las concentraciones: 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 1 mg/mL. El nivel de significancia se denota como *($p < 0.05$) *** ($p < 0.001$). 34
- Figura 18.** Evaluación de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-NASH tratados con el extracto metanólico de *P. cruentum* (MPC) y el control negativo (Kolliphor, etanol y agua) a una concentración de 0.3 mg/mL. 35
- Figura 19.** Evaluación de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-NASH tratados con el extracto metanólico de *P. cruentum* (MPC) y el control negativo (Kolliphor, etanol y agua) a una concentración de 0.6 mg/mL. 35
- Figura 20.** Porcentaje de viabilidad celular de las células HHSC-NASH, tratadas con el extracto metanólico de *P. cruentum* (MPC). Las barras de error muestran una desviación estándar (n=3) y el nivel de significancia se denota como *($p < 0.05$), **($p < 0.01$)..... 36
- Figura 21.** Porcentaje de viabilidad celular del extracto metanólico de *P. cruentum* (MPC) en la línea celular BxPC-3 (adenocarcinoma). Como controles experimentales: Monocapa BxPC-3 (control +) y etanol, Kolliphor más agua (control PC). Las barras de error muestran una desviación estándar (n=3) y el nivel de significancia se denota como *($p < 0.05$), *** ($p < 0.001$), **** ($p < 0.0001$)..... 37
- Figura 22.** Espectro FTIR del extracto metanólico de *P. cruentum*..... 37

Lista de tablas

Tabla 1. Condiciones del rotavapor BUCHI R-114.....	12
Tabla 2. Diámetro (cm) de los halos de inhibición de los extractos (diclorometano, metano, hexano y acuosos) filtrados y no filtrados, con o sin emulsificante (Kolliphor) de la especie <i>A. lemermannii</i> a una concentración de 0.2 mg/disco.	29
Tabla 3. Diámetro de los halos de inhibición (cm) de los extractos hexano, diclorometano, metanol (con o sin emulsificante Kolliphor) y acuosos de las especies de microalga: <i>P. cruentum</i> , <i>A. lemermannii</i> y <i>S. elongatus</i> contra las bacterias patógenas: <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aerous</i> y <i>K. pneumoniae</i>	30
Tabla 4. Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de la biomasa liofilizada de la especie <i>P. cruentum</i>	38

Capítulo 1. Introducción

Las microalgas son un grupo polifilético de organismos eucariotas y procariotas que incluyen diatomeas, algas verdes y cianobacterias (Khavari et al., 2021). Estos microorganismos fotosintéticos son de los principales componentes del fitoplancton marino y se encargan de realizar aproximadamente el 40% de la fotosíntesis global. Además, tienen una función clave en los ecosistemas acuáticos como productores primarios (Moreno-Garrido, 2008).

Las microalgas utilizan energía luminosa y nutrientes inorgánicos (dióxido de carbono, nitrógeno, fósforo, entre otros) para desarrollar y sintetizar biocompuestos como lípidos, proteínas, carbohidratos, pigmentos y polímeros que tienen un alto valor nutricional y funciones terapéuticas (Bhagavathy et al., 2011). Algunos ejemplos de estos compuestos microalgales son el ácido linoleico, ácido palmítico, vitamina E, vitamina B12, carotenos, ficocianina, luteína, zeaxantina, entre otros. Los compuestos obtenidos de algunas especies de microalgas exhiben propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (Harun et al., 2010; Kumar et al., 2019).

La presencia de estos compuestos bioactivos en la biomasa de las microalgas, hace de gran interés su aplicación en el área biomédica (Fu et al., 2019). Por lo que ha incrementado la búsqueda de compuestos bioactivos mediante bioprospecciones. La bioprospección, es la búsqueda sistemática de nuevas fuentes de compuestos químicos (De Morais et al., 2015). Las técnicas de extracción de compuestos bioactivos utilizadas comúnmente son la extracción sólido-líquido y la extracción líquido-líquido, para lo cual se utilizan solventes con diferente grado de polaridad, como diclorometano, metanol, etanol, hexano, cloroformo, agua, entre otros (Michalak y Chojnacka, 2015).

Los extractos microalgales que contienen compuestos bioactivos, pueden ser utilizados en la biomedicina para la formulación de fármacos o vacunas que presenten actividad antioxidante, antiinflamatoria o anticancerígena. Además, exhiben propiedades antimicrobianas, que pueden ayudar a resolver el problema actual de resistencia a los antibióticos por bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* (Hassoun-Kheir et al., 2020).

Los extractos de microalgas también pueden ser aplicados en la ingeniería de tejidos, al utilizar biomateriales como transporte de compuestos activos, los cuales deben presentar biocompatibilidad y biodegradabilidad para su potencial aplicación en el cuerpo humano, por ejemplo, en la cicatrización de

heridas cutáneas (McCauley et al., 2022). Con base en lo anterior, en este trabajo de tesis se llevó a cabo una bioprospección de extractos obtenidos de las microalgas *Porphyridium cruentum*, *Synechococcus elongatus*, y *Anagnostidinema lemermannii*, y se evaluó su potencial aplicación en biomedicina.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Cultivo de microalgas

Las microalgas son una fuente natural de compuestos terapéuticamente efectivos que pueden obtenerse de la biomasa o liberarse extracelularmente en el medio de cultivo (Bhagavathy et al., 2011). La producción de estos compuestos, así como la bioactividad de los mismos, varían según las condiciones del medio de cultivo, así como de las características de la especie de microalga seleccionada (Priyadarshani y Rath, 2012).

Las condiciones para el cultivo de microalgas son un factor importante que influyen en el metabolismo de estos microorganismos (De Morais et al., 2015). Se ha observado que la temperatura de incubación, el pH del medio de cultivo, el periodo de cultivo, la salinidad, la intensidad de la luz y los nutrientes presentes en el medio de cultivo influyen en el crecimiento de diferentes especies de microalgas (Noaman, 2004; Markou y Nerantzis, 2013).

La limitación de nutrientes en el medio de cultivo puede resultar en la producción de biocompuestos específicos, por ejemplo, la limitación del aporte químico de nitrógeno en el medio, puede hacer que las microalgas cambien su metabolismo para incrementar la producción de lípidos y carbohidratos (De Morais et al., 2015).

La irradiancia influye directamente en la composición bioquímica de la biomasa de microalgas. Por ejemplo, el contenido de ácidos grasos puede disminuir al incrementar la incidencia de la luz, esto es debido a que los lípidos son los principales componentes de los cloroplastos. El aumento de la energía de la luz exige una mayor actividad de los cloroplastos y en consecuencia incrementa la cantidad de lípidos en las células de las microalgas (Madhyastha et al., 2009; Guedes et al., 2010).

Debido a lo anterior, las microalgas presentan ventaja en cuanto al aprovechamiento de la energía solar y dióxido de carbono (CO₂), dando lugar a una alta tasa de crecimiento y un mayor rendimiento en comparación con las plantas superiores. Además, el cultivo de microalgas no compite por espacio en tierra cultivable para la producción de alimentos y se tiene la posibilidad de controlar la producción de ciertos compuestos bioactivos, mediante la manipulación de las condiciones de cultivo en un espacio controlado (Singh et al., 2011).

1.1.2 Compuestos con aplicación biomédica

Los compuestos bioactivos de las microalgas pueden obtenerse de metabolitos primarios (proteínas, ácidos grasos, carbohidratos) o de metabolitos secundarios (terpenos, compuestos fenólicos) (Bhattacharjee, 2016). Se han desarrollado diferentes métodos de extracción para obtener compuestos bioactivos de diferentes especies de microalgas. Uno de los métodos de extracción más comúnmente utilizados es el uso de solventes orgánicos como el metanol, etanol, cloroformo, hexano o agua como solvente acuoso. Estos métodos de extracción han sido utilizados para evaluar el potencial antimicrobiano, antioxidante y/o anticancerígeno de distintos compuestos. Se ha reportado que, en dependencia del tipo de solvente utilizado para la extracción, se pueden obtener distintos tipos y contenidos de compuestos bioactivos, por ende, se pueden tener distintas bioactividades (Hussein et al., 2020).

En las microalgas, normalmente se mantiene un equilibrio entre la oxidación, por especies reactivas de oxígeno (ROS) y la reducción por antioxidantes y enzimas antioxidantes (equilibrio redox). Sin embargo, el equilibrio se puede alterar debido a las condiciones de estrés ambiental, como la exposición a altas irradiancias, que incrementa la producción de ROS, debido a una cantidad excesiva de energía para las reacciones fotoquímicas, resultando en estrés oxidativo (Kavoosi y Amirghofran, 2016). Por lo que las microalgas se protegen a sí mismas a través de pigmentos, controlando el transporte de electrones fotosintéticos al favorecer al fotosistema I o al fotosistema II, así como a la activación del sistema antioxidante (Dring, 2005). De esta manera, las microalgas acumulan compuestos antioxidantes dentro de sus células y neutralizan a los radicales libres (Gürlek et al., 2020).

Las microalgas también son capaces de producir compuestos antiinflamatorios como la astaxantina, ficocianina y fucoxantina (Tabazard et al., 2020). La astaxantina ha demostrado tener la capacidad de eliminar radicales libres, y a su vez posee propiedades que protegen a la piel de la radiación UV, la degeneración relacionada con la edad y la mejora del sistema inmunológico (Skjanes et al., 2012).

En el cuerpo humano, el daño oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno a lípidos, ácidos nucleídos y proteínas puede producir enfermedades crónicas como cáncer, envejecimiento o prolongar la etapa de inflamación en la cicatrización de heridas (Baum et al., 2006).

En las heridas crónicas, al presentar una inflamación persistente, la función fisiológica de las células inmunitarias se ve perturbada, dando lugar a un ciclo continuo de infección, inflamación y reparación inadecuada (Wilkinson y Matthew, 2020). Por lo tanto, las heridas crónicas tienen un mayor riesgo de presentar infecciones por bacterias como: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli*, las cuales colonizan la matriz extracelular en forma de biopelículas bacterianas complejas y presentan resistencia a antibióticos (Zhang et al., 2020). El tratamiento de enfermedades infecciosas, especialmente causadas por patógenos resistentes a antibióticos, es uno de los mayores desafíos de atención médica en el mundo (Alsenani et al., 2020). Para abordar esto, se han evaluado los compuestos antimicrobianos presentes en las microalgas y se ha reportado que los ácidos grasos y carotenoides son responsables de la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas (Bashir et al., 2018).

Para ampliar el conocimiento de las propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas de las microalgas, ha incrementado la búsqueda mediante bioprospecciones de extractos de diferentes microalgas marinas y dulceacuícolas para evaluar su potencial uso en el área biomédica (Deniz et al., 2017). Entre las especies de microalgas de interés que podrían servir para potenciales terapias o medicamentos se encuentran *S. elongatus* y *P. cruentum* debido a su actividad antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana contra *E. coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp. y *P. aeruginosa*, entre otras (Kusmiyati y Agustini, 2007; Sánchez-Saavedra et al., 2010; Najdenski et al., 2013; Yilmaz et al., 2016; Fatima et al., 2017; Renugadevi et al., 2021; Zhuang et al., 2021).

Al extraer pigmentos de *A. variabilis*, *S. plantesis* y *S. elongatus* se evaluó su actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli*. Los extractos de la microalga *S. elongatus* tuvieron efecto contra ambas especies de bacterias, principalmente contra *E. coli*. Lo anterior respalda que *S. elongatus* tiene potencial para producir metabolitos de uso biomédico (Mishra y Tiwari et al., 2021).

Al analizar la actividad antibacteriana y antioxidante de la cianobacteria dulceacuícola *Anagnostidinema* sp. TRV57 con extractos obtenidos con butanol, diclorometano, etanol, etil-acetato, hexano y metanol se encontró que los extractos con etil-acetato, butanol y diclorometano presentaron actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* (Renugadevi et al., 2021). Respecto a la actividad antioxidante, los extractos con etil-acetato (74%), butanol (72%) y diclorometano (70%)

presentaron la mejor bioactividad a una concentración de 200 µg/mL. Los autores concluyeron que tanto la actividad antimicrobiana como la antioxidante de los extractos se deben a la presencia de ácidos grasos, especialmente el ácido láurico (Renugadevi et al., 2021).

Los resultados obtenidos al evaluar la actividad antimicrobiana y antioxidante de *P. cruentum* de extractos obtenidos con etanol, n-hexano, metanol y componentes volátiles indicaron que el extracto n-hexano tuvo mayor actividad antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. epidermidis* y *S. aureus*, siendo esta última la más susceptible. Respecto a la actividad antioxidante, concluyen que los extractos etanólicos tienen la capacidad de eliminar radicales libres. De acuerdo a los autores, estos resultados indican un alto potencial antimicrobiano y antioxidante de los extractos de la especie *P. cruentum*. (Yilmaz et al., 2016).

Además de producir compuestos antioxidantes, antiinflamatorios y antimicrobianos, las microalgas también exhiben propiedades antifúngicas y anticancerígenas (Gürlek et al., 2020). La inflamación crónica está directamente relacionada con la carcinogénesis en muchas entidades cancerosas como: el cáncer de pulmón, piel, esófago, gástrico, colorrectal y pancreático. Las interleucinas inducen directamente la señalización en células no inmunitarias y mantienen la homeostasis tisular. Esta señalización de las interleucinas en las células cancerosas puede convertirse en un mecanismo patológico del crecimiento tumoral, la diseminación metastásica y la progresión del cáncer (Briukhovetska et al., 2021).

Las propiedades citotóxicas y antiinflamatorias de los compuestos microalgales pueden inhibir el crecimiento de células cancerosas y tumores o afectar diferentes etapas de la carcinogénesis (Kok et al., 2006; Lai et al., 2008). Un ejemplo de la actividad de estos compuestos producidos por las microalgas son los pigmentos como la halocintiaxina y piridina, que han demostrado tener un efecto citotóxico en células cancerosas (Seddek et al., 2019). La acción de estos compuestos bioactivos, produce la inhibición del crecimiento de células cancerígenas pulmonares, hepáticas, nasofaríngeas, pancreáticas, y leucémicas (Seddek et al., 2011; Shanab et al., 2012; Somasekharan et al., 2016; Suh et al., 2018).

Existe poca información sobre la actividad anticancerígena de *S. elongatus*, sin embargo, se ha reportado actividad antiviral contra el virus de Epstein-Barr, causante de cáncer linfático y actividad contra células cáncer nasofaríngeo (Lai et al., 2008; Kok et al., 2011). Por lo anterior, la aplicación de los extractos microalgales en la biomedicina representa un área de oportunidad para la biotecnología, ya que se ha demostrado la capacidad de estos microorganismos al producir compuestos con bioactividades de interés.

Sin embargo, aún es poca la información que se conoce de las especies *P. cruentum*, *S. elongatus*, y *A. lemermannii* en el área biomédica.

1.2 Justificación

Las enfermedades derivadas del estrés oxidativo dan lugar a etapas de inflamación prolongada, el cáncer, enfermedades hepáticas y la inflamación crónica en la cicatrización de heridas; las cuales representan un reto en el área biomédica. La cicatrización de heridas, a su vez es afectada por agentes externos como bacterias patógenas. Dichas bacterias, representan un problema a nivel mundial, debido a su resistencia a antibióticos. Por estas razones, la búsqueda mediante bioprospecciones de compuestos naturales obtenidos de las microalgas, es un área de oportunidad que permite ampliar el conocimiento de los compuestos microalgales con bioactividades de interés que pueden ser aplicados como alternativas que contribuyan a la obtención de agentes terapéuticos de interés en biomedicina.

1.3 Hipótesis

Los extractos microalgales de las especies *Porphyridium cruentum*, *Synechococcus elongatus*, y *Anagnostidinema lemermannii* presentarán actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, anticancerígena y/o antioxidante.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar diferentes bioactividades de extractos microalgales con aplicación biomédica.

1.4.2 Objetivos específicos

- a) Producir y cosechar de manera masiva la biomasa microalgal de *Porphyridium cruentum*, *Synechococcus elongatus*, y *Anagnostidinema lemermannii*.
- b) Obtener extractos microalgales utilizando solventes con diferente grado de polaridad: hexano, diclorometano, metanol y agua.
- c) Realizar una bioprospección de bioactividades con interés biomédico.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Estandarización de procedimientos y selección de extracto

Se realizaron cultivos monoespecíficos no axénicos de las especies de microalgas *S. elongatus*, *P. cruentum* y *A. lemmermannii*, obtenidas de la Colección de Microalgas del Laboratorio de Biotecnología de Algas (BIOAL) del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), provistas por la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra del Departamento de Acuicultura.

2.2 Caracterización del crecimiento de microalgas

Para la preparación de los cultivos se utilizó medio de cultivo "f" descrito por Guillard y Ryther (1962). Los cultivos de las especies *S. elongatus* y *P. cruentum* se prepararon con 100 mL de agua de mar estéril, mientras que para *A. lemmermannii* se utilizaron 100 mL de agua dulce estéril. Se agregaron 7 mg de esferas de vidrio de 2 mm de diámetro (previamente esterilizadas) a todos los cultivos, con el propósito de ayudar a la disgregación de la biomasa celular. Las condiciones de esterilización fueron: 121 °C y 1.05 kg/m² de presión por 15 min.

Los cultivos se realizaron por triplicado y se mantuvieron a una temperatura de 22 ± 0.5 °C con iluminación continua suministrada por lámparas fluorescentes de luz blanca fría (Silvana F40 CW) a una irradiancia de 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y agitación manual diaria. La irradiancia fue medida con un radiómetro con sensor 4 π (Biospherical Instruments, QLS-100) y el pH fue medido utilizando un potenciómetro marca HANNA. El crecimiento de los cultivos se monitoreo diariamente mediante la toma de 1.5 mL de cada cultivo para medir la densidad óptica (DO) a 550 nm (DO₅₅₀) y 680 nm (DO₆₈₀), utilizando un espectrofotómetro HACH DR6000.

2.2.1 Incremento del volumen de los cultivos

Una vez que los cultivos mantenidos en 100 mL de medio "f" de las tres especies llegaron a la fase estacionaria, se utilizaron como inóculos para incrementar el volumen del cultivo a 200 mL en matraces

Erlenmeyer. Para esto, se tomaron 10 mL de cada cultivo y se transfirieron a un matraz con 190 mL de medio “f”, los cuales se tuvieron bajo las mismas condiciones ambientales mencionadas en el punto 2.2.

2.2.2 Producción masiva en matraces Fernbach de 2 L

Los cultivos monoespecíficos mantenidos en matraces Erlenmeyer con un volumen de 200 mL se utilizaron como inóculos para incrementar el volumen a 2 L en matraces Fernbach de 2.8 L. Los cultivos en Fernbach, se mantuvieron bajo las mismas condiciones descritas en la sección 2.2.

Los cultivos de *S. elongatus* y *P. cruentum* iniciaron con una densidad óptica de 0.022 y 0.024, mientras que el cultivo de *A. lemmermannii* inició con una DO de 0.049. Para mantener las densidades ópticas iniciales similares en todos los inóculos realizados en distintos tiempos, se utilizó la siguiente ecuación:

$$V_2 = \frac{V_1 C_2}{C_1} \quad (1)$$

donde V_1 es el volumen final, C_2 es la densidad óptica del día 0 del inóculo madre y C_1 la densidad óptica final del inóculo.

Una vez que los cultivos mantenidos en matraces Fernbach de 2 L llegaron a la fase estacionaria, se utilizaron como inóculos para sembrar lotes de 5 matraces Fernbach con 2 L de medio “f” de cada especie de microalga. Las condiciones ambientales de los cultivos y la caracterización del crecimiento fueron las ya descritas en el punto 2.2.

2.2.3 Cosecha de biomasa

Cuando los lotes de cultivos de las tres especies de microalgas llegaron a la fase estacionaria, se colectó la biomasa celular. El volumen total de cada cultivo fue distribuido en tubos cónicos de 500 mL y fueron centrifugados a 3226 rcf durante 20 min a 4 °C en una centrífuga Eppendorf 5810R. Con el fin de eliminar las sales presentes en el cultivo, el paquete celular fue resuspendido en 10 mL de agua destilada y transferido a tubos cónicos de 15 mL, se concentró la biomasa mediante centrifugación bajo las condiciones antes descritas y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, la biomasa obtenida fue

almacenada a -80 °C durante 10 h y se liofilizó a 0.100 mBar a - 83 °C en un equipo de marca LABCONCO FreeZone 6 Plus. Se conservó la biomasa liofilizada a -80 °C en atmósfera de nitrógeno hasta ser utilizada para la obtención de los extractos microalgales.

2.3 Evaluación de la biomasa

Se evaluó la producción de biomasa de los cultivos de *S. elongatus*, *P. cruentum* y *A. lemermannii* mantenidos a un volumen de 100 mL y 2 L con el fin de realizar una comparación en la producción al incrementar el volumen de cultivo. De igual manera, se evaluó la tasa de crecimiento y tiempo de generación de los cultivos mantenidos a dichos volúmenes para comparar las características de crecimiento de cada especie bajo las condiciones utilizadas.

2.3.1 Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación

Con los datos obtenidos de las evaluaciones de DO a 550 y 680 nm descritas en el punto 2.2. Se elaboraron las curvas de crecimiento de los cultivos mantenidos a un volumen de 100 mL y 2 L de cada una de las especies de microalga. Se calculó la tasa de crecimiento (μ : divisiones/día) y el tiempo de duplicación (Tg: días) utilizando las siguientes ecuaciones descritas por Fogg y Thake (1987):

$$\mu = \frac{\log_2 (N_2) - \log_2 (N_1)}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

$$Tg = \frac{1}{\mu} \quad (3)$$

donde N_1 es la DO inicial y N_2 la DO final. A su vez t_1 representa el día inicial y t_2 el día final del cultivo.

2.3.2 Rendimiento y productividad

Para determinar rendimiento se consideró el valor del peso seco total por día de los cultivos de 100 mL y 2 L de cada especie de microalga, se utilizó el procedimiento descrito por (Sorokin, 1973) y se siguió la ecuación 4.

Peso seco total

$$= \frac{(\text{Peso del tubo cónico de 15 ml} + \text{muestra liofilizada}) - (\text{Peso seco del tubo cónico})}{(\text{Volumen filtrado del cultivo})} \quad (4)$$

La productividad de la biomasa se obtuvo al relacionar la tasa de crecimiento y el peso seco total, siguiendo la ecuación 5 (Casian-González, 2020).

$$\text{Productividad de biomasa} = \text{Tasa de crecimiento (divisiones/día)} \times \text{Peso seco total (g/L)} \quad (5)$$

2.4 Obtención de extractos

2.4.1 Extractos acuosos

Para obtener los extractos acuosos se siguió la metodología descrita por Rubio-Elizalde et al. (2019) con algunas modificaciones: Se resuspendieron 200 mg de biomasa liofilizada de *A. lemermannii* en 250 mL de agua destilada a 75 °C. La solución se mantuvo en agitación durante 5 min a 3 rcf a 100 °C, posteriormente se llevó a temperatura ambiente y se centrifugó a 3226 rcf durante 20 min a 4 °C. A continuación, se descartó el precipitado y se tomaron dos alícuotas de 15 mL del sobrenadante. Con la finalidad de evaluar el efecto de filtrar los extractos, se filtró una de las alícuotas a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C con abertura de poro de 1 µm y de 4.7 cm de diámetro para eliminar restos celulares. Otra de las alícuotas no se filtró. Ambas alícuotas se conservaron en tubos Eppendorf de 50 mL de 4 a 6 horas a -80 °C, y se liofilizaron a 0.100 mBar a -83 °C en un liofilizador de marca LABCONCO FreeZone 6 Plus durante 24 h, una vez que se obtuvieron los extractos liofilizados se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Para obtener los extractos de las especies restantes (*P. cruentum* y *S. elongatus*) se mantuvo una relación 4:1 de biomasa liofilizada y el solvente utilizado (hexano, diclorometano o metanol). Se siguió la metodología descrita anteriormente y se conservaron los extractos liofilizados a las mismas condiciones hasta su uso.

2.4.2 Extractos orgánicos

Para la obtención de los extractos orgánicos se utilizaron solventes de diferente grado de polaridad: hexano, diclorometano y metanol. Se colocó 1 g de biomasa liofilizada de cada especie de microalga por separado en botellas ámbar (para evitar posibles daños a compuestos fotosensibles) con 250 mL de solvente. Las botellas ámbar se dejaron en agitación durante 24 h a 7 rcf en un agitador orbital Max Q Mini 4450 a 22 °C. Posteriormente, se centrifugaron a 3226 rcf durante 20 min a 4 °C y se colectó el sobrenadante. Se tomaron dos alícuotas de 15 mL de cada extracto, donde solo una de estas se filtró utilizando filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C de 4.7 cm de diámetro y 1 µm de abertura de poro para comparar el efecto de los extractos al ser filtrados o no filtrados. A continuación, se eliminó el solvente de los extractos filtrados y no filtrados mediante un evaporador rotativo BUCHI R-114, la presión y la temperatura de reflujo dependieron del solvente utilizado (tabla 1). Con una pipeta pasteur de vidrio se recuperó el extracto y se vertió en viales ámbar de 4 mL (previamente pesados) y se evaporó el solvente restante con atmósfera de nitrógeno. Una vez evaporado el solvente, los viales se dejaron durante 30 min a 22 °C, se pesaron y se congelaron a - 20 °C hasta su uso en ensayos posteriores.

El rendimiento de la extracción se evaluó mediante la diferencia de peso siguiendo la fórmula (4) indicada en la sección 2.3.2.

Tabla 1. Condiciones del rotavapor BUCHI R-114.

Solvente	Condiciones del rotavapor
Hexano	Presión: 360 mbar Temperatura de reflujo: 40 °C Baño María: 60 °C
Diclorometano	Presión: 808 mbar Temperatura de reflujo: 34 °C Baño maría: 60 °C
Metanol	Presión: 337 mbar Temperatura de reflujo: 40 °C Baño maría: 60 °C

2.5 Criterios de selección de los extractos con potencial aplicación biomédica

Para una potencial aplicación biomédica, además de bioactividades de interés como la actividad antimicrobiana, los extractos deben presentar viabilidad celular. Por lo que se realizaron a la par los ensayos de actividad antimicrobiana y viabilidad celular en la línea celular L929 (fibroblastos de ratón)

(ATCC, CRL-6364) y posteriormente se seleccionó el extracto que presentó las características necesarias para una potencial aplicación biomédica.

2.5.1 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los extractos acuosos y orgánicos de cada especie de microalga, se evaluó mediante el método de difusión de disco en agar (Balouri et al., 2016). Se seleccionaron bacterias patógenas Gram negativas: *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *K. pneumoniae* (ATCC 13883) y la bacteria Gram positiva *S. aureus* (ATCC 25923). Estas bacterias fueron obtenidas de la colección de bacterias del laboratorio BIOAL del CICESE, las cuales forman parte de los principales microorganismos causantes de infecciones hospitalarias (Hassoun-Kheir et al., 2020). Cada especie bacteriana fue sembrada en cajas Petri de 8.5 cm de diámetro con 20 mL de medio sólido Luria Bertani (LB), seleccionado debido a la diversidad de las bacterias utilizadas, ya que aporta los requerimientos nutricionales que estas necesitan (Liu et al., 2018). Las cajas Petri fueron incubadas a 37 °C durante 24 h, posteriormente se utilizaron para la formulación de los inóculos de cada especie de bacteria.

Para realizar los inóculos bacterianos se siguió la metodología descrita en Cárdenas-Carreón (2019), con algunas modificaciones, las cuales consistieron en vaciar asépticamente 2 mL de medio agar LB líquido sobre las cepas de bacterias previamente cultivadas en la caja Petri y con ayuda de una pipeta serológica se desprendieron el mayor número de colonias bacterianas y se transfirieron a tubos estériles con 6 mL de medio LB líquido para formar un inóculo bacteriano concentrado. Posteriormente, se tomaron alícuotas de los inóculos de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*, se transfirieron por separado a tubos estériles con 6 mL de medio LB líquido y se ajustó la turbidez del inóculo a 0.08 - 0.12 utilizando un espectrofotómetro Hach DR/3000 a una longitud de onda de 625 nm, lo que permitió tener una concentración de 1.5×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL. Se realizaron los cálculos correspondientes para que el inóculo bacteriano aportara 1×10^6 UFC/mL en 100 mL de medio de cultivo. Para esto, se vertieron 0.40 mL de los inóculos en matraces Erlenmeyer con 60 mL de medio LB estéril a una temperatura entre 37- 42 °C y se agitaron vigorosamente hasta obtener una mezcla homogénea de medio LB e inóculo de cada especie de bacteria.

Se realizó un ensayo preliminar, donde se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos filtrados y no filtrados, acuosos y orgánicos de la especie *A. lemermannii*. Para esto, se resuspendieron los extractos en el solvente utilizado para su extracción y se agregó Kolliphor como emulsificante a los extractos

orgánicos, posteriormente se impregnaron los sensidiscos (previamente esterilizados) de papel filtro Whatman® de 6 mm de diámetro (Sigma Aldrich cat. WHA2017006) con 30 µL de cada extracto a una concentración de 0.2 mg/disco. Como controles experimentales positivos se utilizaron antibióticos de amplio espectro: Carbenicilina (50 µg/disco) y Kanamicina (100 µg/disco), como controles negativos se utilizó el solvente correspondiente (hexano, diclorometano y metanol) más Kolliphor (30 µg/disco) y agua destilada (30 µl/disco). Posteriormente, los sensidiscos se dejaron secar en una campana de flujo laminar estéril a 22 °C, una vez que los extractos aplicados en los sensidiscos estuvieron totalmente embebidos en ellos y completamente secos, se colocaron sobre una capa solidificada de medio LB estéril (20 mL) en una caja Petri y se vertieron 8 mL de cada inóculo (por separado) sobre toda la superficie de la caja, formando una capa delgada y homogénea sobre los sensidiscos. Las cajas se dejaron solidificar a temperatura ambiente durante 20 min y posteriormente se incubaron a 37 °C durante 24 y 48 h, y se midió el halo de inhibición del crecimiento bacteriano en la periferia de los sensidiscos a las horas mencionadas.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos y orgánicos de *S. elongatus*, *P. cruentum* y *A. lemmermannii* se siguió la metodología anteriormente descrita. El ensayo se realizó por triplicado y se impregnaron los sensidiscos con los diferentes extractos microalgales a una concentración de 2 mg/disco, se utilizaron los mismos controles experimentales y se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano siguiendo el mismo procedimiento.

2.5.2 Mantenimiento de líneas celulares

Se trabajó dentro de una campana de flujo laminar (Purifier Class II Biosafety Cabinet, LABCONCO) con 3 líneas celulares: Fibroblastos de ratón L929, cáncer de páncreas BxPC-3 (Adenocarcinoma) y células estrelladas hepáticas humanas de donadores con esteatohepatitis no alcohólica (HHSC-NASH), las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio de cultivo celular del departamento de Innovación Biomédica de CICESE.

Las líneas celulares L929 (fibroblastos de ratón) (ATCC, CRL-6364) y BxPC-3 (cáncer pancreático: adenocarcinoma) (ATCC, 1687) se activaron mediante la descongelación de crioviales de cada línea en baño María a 37 °C. Mientras que las células HHSC-NASH ya se encontraban activas. El contenido del criovial se vertió en un tubo cónico con 9 mL de medio de cultivo previamente colocados, se utilizó el medio Iscove's Modified Dulbecco's Media suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico/antimicótico al 1% para la línea celular L929 y las células HHSC-NASH. Mientras que para la

línea BxPC-3 se utilizó el medio RPMI-1640, suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico/antimicótico al 1%. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 800 rcf durante 5 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido en 1 mL de medio de cultivo. A continuación, se agregó el paquete celular a una caja de cultivo (tratada para el crecimiento celular con un área de cultivo de 56.7 cm²) con 7 mL del medio de cultivo correspondiente para cada línea celular. Se mantuvieron los cultivos en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5% y se observó el crecimiento cada tercer día en un microscopio invertido, Axiovert 200, Zeiss.

Cuando el cultivo alcanzó el 80% de confluencia se realizó el proceso de tripsinización celular. Para esto se retiró el medio de cultivo de la caja con ayuda de una pipeta serológica de 10 mL, después se adicionaron 6 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X) para retirar restos celulares y el excedente de medio de cultivo, se retiró el PBS y se agregó 1 mL de tripsina (Tripsina-EDTA 0.25 %, rojo fenol de Gibco® a 1x) para separar las células de la caja en la cual estaban adheridas, se dejó en incubación a 37 °C al 5 % de CO₂ durante 4 min y posteriormente se agregaron 4 mL de medio de cultivo para inhibir la tripsina, se homogenizó la suspensión hasta eliminar agregados celulares y se tomó 1 mL de la suspensión homogenizada y se vertió una caja nueva con 7 mL de medio de cultivo correspondiente, y se dejó nuevamente en incubación a 37 °C al 5 % de CO₂.

2.5.2.1 Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular de los extractos de las tres especies de microalga, en las tres líneas celulares (L929, BxPC-3 y NASH), se determinó mediante el ensayo colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, M5655). Este ensayo permitió evaluar la viabilidad celular con base a la actividad metabólica de las células cultivadas, determinada por su concentración de formazán; producto insoluble de color azulado que presenta una absorbancia máxima de 570 nm (Nouri et al., 2000).

Se realizaron ensayos preliminares para evaluar la viabilidad celular de los extractos acuosos y orgánicos de la especie *A. lemermannii* en la línea celular L929. Los extractos fueron resuspendidos en el solvente con el que se hizo la extracción (hexano, diclorometano, metanol y agua), donde debido a la naturaleza lipofílica de los extractos orgánicos fue necesario utilizar un compuesto emulsificante para que los extractos puedan disolverse al momento de ponerlos en contacto con el medio de cultivo acuoso. Con este fin, se utilizó Kolliphor EL40®, el cual se agregó en una proporción 0.125:1 (Kolliphor: solvente) con base en los resultados obtenidos por Zertuche-Arias (2021). Para este ensayo, en una placa de 96 pozos se

sembraron por triplicado 7,500 células L929 por pozo en 100 μ L de medio Iscove's y se mantuvo a 37 °C, CO₂ al 5% durante 24 h. Posteriormente, se retiraron 10 μ L del medio de cultivo y se agregaron 10 μ L de los extractos de *A. lemermannii* a las concentraciones: 0.2 mg/pozo y 2 mg/pozo. Como blanco experimental se utilizaron células (L929) sin exposición a los extractos para evaluar el crecimiento celular. Como control experimental negativo se utilizaron células L929 expuestas a 20% de dimetil sulfóxido (DMSO) para obtener la lectura de absorbancia de células muertas (Escárrega-Payán, 2019). Además, se utilizaron como blancos los extractos en medio Iscove's sin células, con la finalidad de conocer la absorbancia de la pigmentación de los extractos evaluados. La placa se dejó en incubación bajo las mismas condiciones durante 24 h, posteriormente se agregaron 10 μ L de MTT a una concentración de 5 mg/mL a cada pozo y se incubó por 4 h a 37 °C, CO₂ al 5%. A continuación, se añadieron 100 μ L de la solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.01 M con 10% de dodecilsulfato sódico (SDS) y se incubó por 18 h a 37 °C, CO₂ al 5%. Finalmente se leyó la DO a 570 nm en un espectrofotómetro (Lector de placas Epoch, BioTek).

Para evaluar la compatibilidad celular de los extractos acuosos y orgánicos de las tres especies de microalgas: *S. elongatus*, *P. cruentum* y *A. lemermannii* en la línea celular L929 se siguió la metodología descrita anteriormente. Los extractos fueron suspendidos en el solvente correspondiente a su extracción y se agregó Kolliphor a los extractos orgánicos, a continuación, se incrementó la concentración de todos los extractos a 0.3 mg/mL. Una vez realizadas estas evaluaciones, en otra placa de 96 pozos se sembró la misma cantidad de células L929 (7,500 células/pozo) para evaluar solo los extractos metanólicos de las tres especies, resuspendidos en etanol, Kolliphor EL40® y agua a las concentraciones: 0.3 mg/mL y 1 mg/mL (Zertuche-Arias, 2020). Posteriormente, se sembraron 7,500 células L929/pozo en una placa de 96 pozos y se siguió la metodología ya descrita para evaluar la viabilidad celular de extracto metanólico de *P. cruentum* (MPC) resuspendido en etanol, Kolliphor EL40® y agua, a las concentraciones 0.4, 0.5 y 0.6 mg/mL.

Tras realizar los ensayos de biocompatibilidad en la línea L929 y los ensayos de actividad antimicrobiana, se seleccionó el extracto metanólico de *P. cruentum* (MPC) para evaluar sus potenciales aplicaciones biomédicas. Para esto, se evaluó su viabilidad celular en la línea celular BxPC-3 y en células NASH. En una placa de 96 pozos se sembraron 8,500 células BxPC-3/pozo y se evaluó mediante un ensayo de MTT (descrito anteriormente) el extracto MPC a concentraciones: 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mg/mL. Sin embargo, también se evaluó la concentración de 1 mg/mL para conocer el efecto al incrementar la concentración del extracto. Se evaluaron las mismas concentraciones del extracto MPC en las células NASH, para lo que se sembraron 4,000 células/pozo en una placa de 96 pozos. El número de células sembradas se determinó

dependiendo de la morfología de cada línea celular y el tiempo en el que el cultivo llegó al 80% de confluencia. La viabilidad celular de los ensayos realizados por MTT se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100 \quad (6)$$

donde la a $\text{Abs}_{\text{muestra}}$ es la absorbancia de los extractos evaluados y $\text{Abs}_{\text{control}}$ es la absorbancia del control de células solo con medio de cultivo (Kavoosi y Amirghofran, 2017).

2.6 Ensayo final: Caracterización del extracto metanólico de *P. cruentum*

2.6.1 Actividad antioxidante

Se evaluó la actividad antioxidante del extracto metanólico de *P. cruentum* (MPC) mediante el ensayo ABTS^{•+}, técnica colorimétrica que consiste en la producción del cromóforo ABTS (verde-azul) a través de la reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio (KPS) 0.87 mM. Una vez que la solución está oxidada se pone en contacto con las muestras potencialmente antioxidantes, para posteriormente cuantificar la decoloración de la solución mediante la lectura de la DO a 734 nm (Re et al., 1999).

Para generar el radical ABTS^{•+} se preparó una solución 1:1 en la que se colocaron 5 mL de ABTS y 5 mL de KPS 0.87 mM y se incubó en oscuridad durante 18 h. Posteriormente se ajustó la absorbancia a 0.7 ± 0.02 con agua destilada, siguiendo la metodología descrita por Rubio-Elizalde et al. (2019). Se evaluaron las concentraciones: 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 1 mg/mL del extracto MPC, como control se utilizó agua destilada y debido a la pigmentación que presentó el extracto se utilizaron blancos de color. Se tomaron 50 μL de cada muestra y se depositaron por triplicado en una placa de 96 pozos y se añadieron 150 μL de ABTS^{•+}, para los blancos de color se agregaron 50 μL de muestra por triplicado más 150 μL de agua destilada. Se incubó la placa durante 6 min en oscuridad a 22 °C y se leyó la absorbancia a 734 nm en un lector de placas Epoch, BioTek.

$$\text{Inhibición de la oxidación (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100 \quad (7)$$

donde $Abs_{control}$ es la absorbancia del control del ABTS⁺⁺ con agua destilada y $Abs_{muestra}$ es la absorbancia de la muestra (Kavoosi y Amirghofran, 2017).

2.6.2 Capacidad de remoción del radical óxido nítrico

Se determinó la capacidad de remoción del radical óxido nítrico (NO^{*}) del extracto MPC mediante el ensayo de nitroprusiato de sodio (SNP).

Se evaluaron las concentraciones: 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 1 mg/mL del extracto MPC. Se colocaron 33.6 µL de cada concentración en una placa de 96 pozos, en seguida se agregaron 66.4 µL de SNP (2.5 mM) a cada pozo, como controles se utilizaron 33.6 µL de la solución en la que se encontraba resuspendido el extracto (etanol, Kolliphor y agua destilada) más 66.4 µL de SNP, para los blancos de cada concentración se colocaron 33.6 µL de muestra más 66.4 µL de agua destilada. La placa se incubó en luz a 22 °C durante 60 min, posteriormente se agregaron 100 µL de reactivo de Griess 1X y se incubó en oscuridad durante 15 min, finalmente se procedió a leer la absorbancia a 540 nm en un lector de placas Epoch, BioTek.

El porcentaje de remoción de NO^{*} se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} & \text{Remoción del radical óxido nítrico (\%)} \\ & = \frac{Abs_{control} - (Abs_{muestra} - Abs_{blanco})}{Abs_{control}} \times 100 \end{aligned} \quad (8)$$

donde $Abs_{control}$ es la absorbancia del reactivo de Griess y SNP, $Abs_{muestra}$ es la absorbancia del reactivo de Griess, SPN y el extracto MPC y Abs_{blanco} son los valores de absorbancia del blanco (Kavoosi y Amirghofran, 2017).

2.6.3 Cuantificación de citocinas en células HHSC-NASH

Se evaluó el efecto del extracto MPC en la modulación de citocinas en células estrelladas hepáticas humanas de un donador con esteatohepatitis no alcohólica (HHSC-NASH). La cuantificación de citocinas se realizó con el kit LEGENDplex™ Human Th Cytokine, el cual es un panel de ensayo múltiple basado en microesferas. Este panel permite la cuantificación simultánea de 12 citocinas humanas, incluidas: IL-2, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 17A, 17F, 22, IFN-γ y TNF-α, que son secretadas colectivamente por linfocitos, siendo las

subpoblaciones: Th1, Th2, Th9, Th17 y Th22, células que juegan un papel central en la inmunorregulación y la inmunoestimulación, Th1 produce IL-2 e interferón (IFN) y están involucradas en la inmunidad celular, otro ejemplo son las células Th2, que producen IL-4, IL-5 e IL-13 y están involucradas en la inmunidad humoral (Saito et al., 2010).

Las células HHSC-NASH fueron mantenidas como se indica en el punto 2.5.2. Una vez que el cultivo presentó el 80% de confluencia en la Monocapa, se sembraron 120,000 células/pozo en una placa de 12 pozos y se dejó en incubación durante 24 h a 37 °C, CO₂ al 5%. Posteriormente, las células se pusieron en contacto con el extracto MPC a las concentraciones: 0.3 mg/mL y 0.6 mg/mL y se incubó nuevamente la placa a 37 °C, CO₂ al 5%. Transcurridas 24 h, se tomó 1 mL del sobrenadante del cultivo celular y se mantuvo a -80 °C hasta su uso en el kit LEGENDplex™ Human Th Cytokine. Al finalizar, la lectura de las muestras se hizo mediante un citómetro de flujo Attune NXT (BRVY) y se procedió al análisis de datos usando LEGENDplexTMSoftware de BioLegend.

2.7 Caracterización química mediante FTIR

Se realizó la caracterización química del extracto MPC mediante análisis por espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), para esto se usó un espectrómetro marca Agilent modelo Cary 630, equipado con reflectancia total atenuada mediante el accesorio GladiATR™ con punta de diamante (ATR-FTIR).

Se evaluó el extracto MPC: resuspendido en metanol puro ACS, concentrado en etanol más Kolliphor (1:0.125) y resuspendido en etanol más Kolliphor a una concentración de 1 mg/mL (diluido con agua destilada). Los espectros abarcaron un intervalo de longitud de onda desde 400 a 4000 cm⁻¹. Para identificar compuestos presentes en las muestras, los espectros obtenidos se compararon con los espectros disponibles en la base de datos de la biblioteca ST Japan Spectral Library for Resolutions PRO.

2.8 Perfil de ácidos grasos de la especie *P. cruentum*

Con la finalidad de ampliar la caracterización química del extracto MPC se evaluó la composición de ácidos grasos de la especie seleccionada: *P. cruentum*.

En viales ámbar de 5 mL previamente lavados y calcinados en una mufla a 470 °C, se pesaron 50 mg de biomasa liofilizada y se realizó la extracción de lípidos por el método Folch et al. (1957), utilizando una solución de diclorometano-metanol (2:1) más butilhidroxitolueno (BHT) al 0.01%. Se realizó la saponificación de los lípidos con una solución metanólica al 90% de KOH 0.3 N y se dejó en baño María por 30 min a 60 °C. Posteriormente, cuando las muestras se encontraron a temperatura ambiente, se adicionaron 600 µL de agua y 400 µL de hexano, para la extracción de lípidos insaponificables. A continuación, se acidificaron las muestras con HCL 6 N y se agregó hexano para la separación de los lípidos saponificables.

La metilación de las muestras se realizó mediante el método de Metcalfe et al. (1966) donde se utilizó trifloruro de boro en metanol al 14%, en seguida se evaluó la composición de los ácidos grasos con un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A equipado con una columna capilar (Agilent J&W GC Columns, 123-3232 DB-FFAP de 30 m de longitud por 320 µm de diámetro, y grosor de la película de 0.25 µm), y un detector de flama ionizado, como gas de acarreo se utilizó hidrógeno. El volumen de inyección de la muestra fue de 1 µL, con concentración de 10 mg/mL, la temperatura inicial del horno fue de 120 °C, se aumentó hasta llegar a 190 °C (9 °C min⁻¹), posteriormente se incrementó la temperatura hasta 230 °C (3 °C min⁻¹) donde se mantuvo por 4 min. La identificación de los ácidos grasos se realizó por la comparación de los tiempos de retención con los del estándar, 37 “Component Supelco®” FAME Mix SIGMA”. Las cantidades de ácidos grasos de las muestras se calcularon por medio del programa MATLAB®.

2.9 Análisis estadístico

Para todos los análisis estadísticos realizados se probaron las hipótesis que fundamentan la estadística paramétrica: normalidad de los datos, homocedasticidad e independencia de los datos.

Los resultados de la tasa de crecimiento, tiempo de generación, pH y el rendimiento de biomasa de cada especie fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. En el caso de encontrar diferencias significativas se utilizó una prueba *a posteriori* de Tukey. Para el análisis estadístico de los datos se usó el programa STATISTICA® versión 14.0 (StatSoft, 2020).

Los resultados de los ensayos de viabilidad celular, actividad antimicrobiana, antioxidante y remoción de NO* fueron analizados por ANOVA de dos vías en el programa GraphPad Prism 9. El nivel de significancia de las pruebas estadísticas fue de $p < 0.05$.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Estandarización de procedimientos y selección de extracto

3.2 Caracterización del crecimiento de microalgas

En las curvas de crecimiento de los cultivos mantenidos en un volumen de 100 mL de las tres especies de microalgas evaluadas, a una densidad óptica de 550 y 680 nm, se observó que ninguno de los cultivos presentó fase de acondicionamiento. La duración de la fase exponencial fue de 4, 8 y 11 días para *S. elongatus*, *A. lemermannii* y *P. cruentum*, respectivamente, mientras que la fase estacionaria fue de 10 días para *A. lemermannii*, 12 días para *P. cruentum* y 15 días para *S. elongatus* (Figura 1).

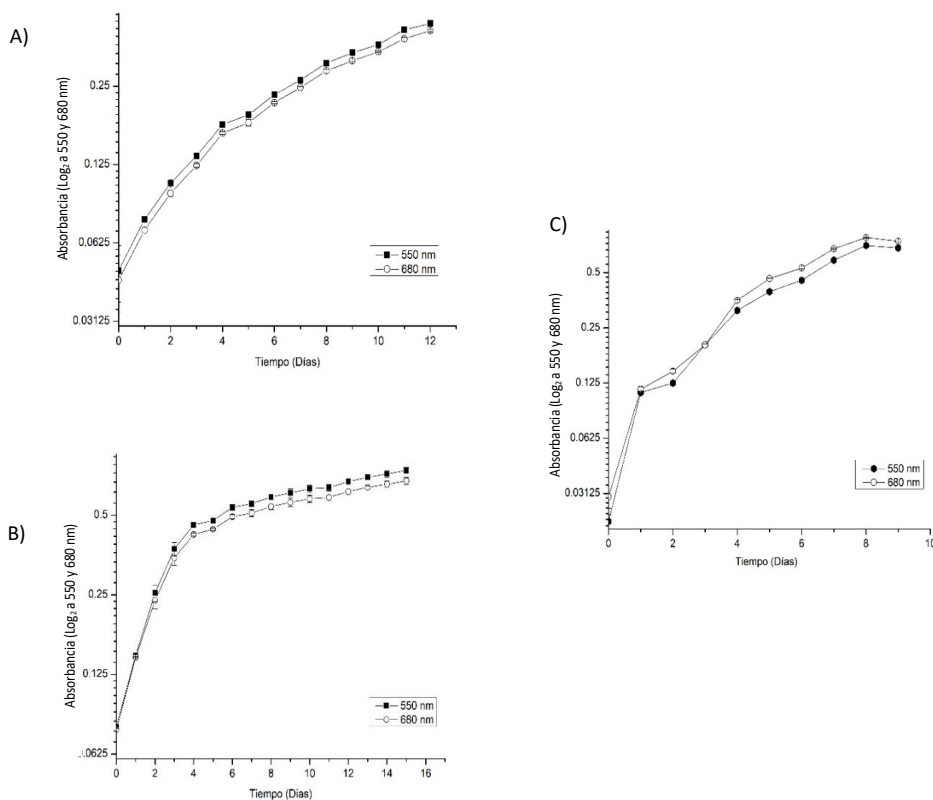


Figura 1. Valores promedio y desviación estándar de las curvas de crecimiento de los cultivos mantenidos en un volumen de 100 mL de las especies *P. cruentum* (A), *S. elongatus* (B) y *A. lemermannii* (C) evaluadas a 550 y 680 nm.

3.2.1 Perfil de pH en los cultivos microalgales en cultivos de 100 mL

Los cultivos mantenidos en un volumen de 100 mL de las tres especies de microalgas evaluadas, presentaron valores de pH que oscilaron entre 8.0 a 10.1. Siendo la cianobacteria *A. lemermannii*, la especie que presentó los valores de pH mayores en comparación con *P. cruentum* y *S. elongatus* (Figura 2).

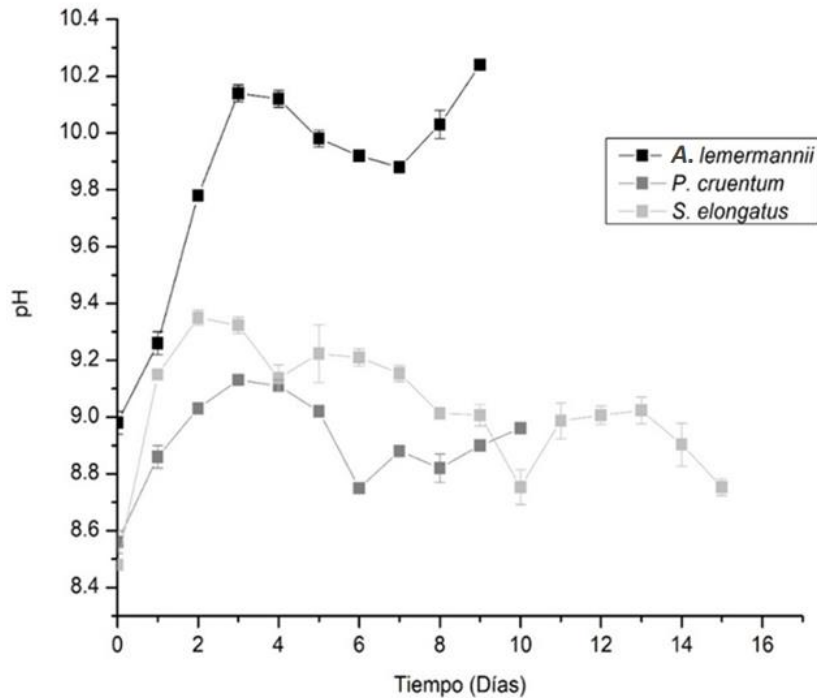


Figura 2. Valores promedio y desviación estándar de los valores de pH de los cultivos de *A. lemermannii*, *P. cruentum* y *S. elongatus* mantenidos en un volumen de 100 mL de medio "F".

3.2.2 Tasa de crecimiento y tiempo de generación

La tasa de crecimiento de cada especie de microalga presentó diferencias significativas ($p < 0.05$). Las especies que presentaron la tasa de crecimiento más alta en ambas longitudes de onda (550 y 680 nm) fueron *A. lemermannii* (0.62 divisiones/día) y *S. elongatus* (0.63 divisiones/día). Mientras que *P. cruentum* presentó 0.26 divisiones/día (Figura 3).

El tiempo de generación de los cultivos mantenidos en un volumen de 100 mL presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) al ser evaluado a una longitud de onda de 680 nm. A esta longitud *S. elongatus* fue

la especie que presentó el tiempo de generación menor. Al ser evaluados a una longitud de onda de 550 nm, las especies *P. cruentum* y *A. lemermannii* no presentaron diferencias significativas (Figura 4).

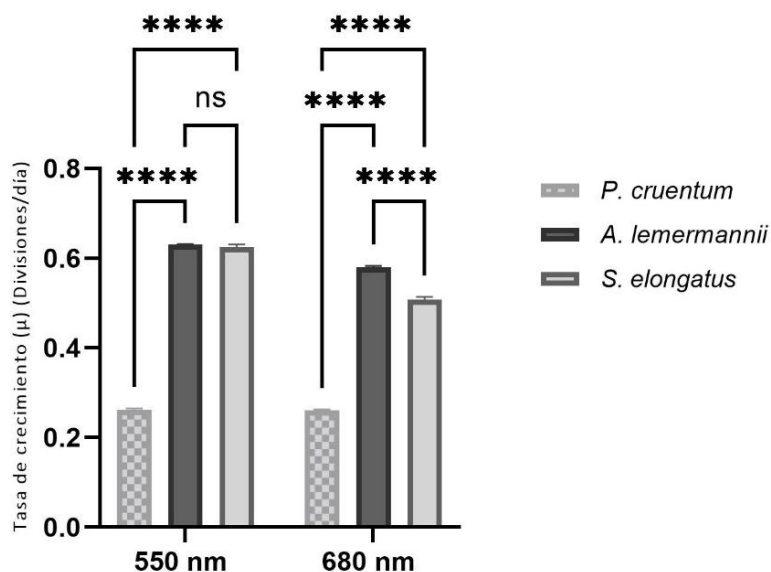


Figura 3. Tasa de crecimiento de los cultivos de 100 mL de las especies *P. cruentum*, *A. lemermannii* y *S. elongatus*. Las barras de error muestran una desviación estándar (n=3) y el nivel de significancia se denota como **** ($p < 0.0001$).

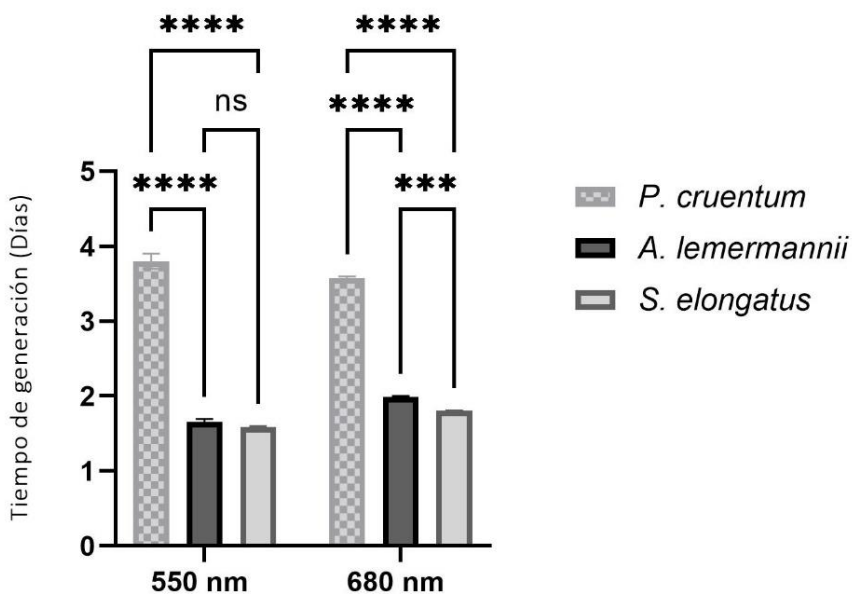


Figura 4. Tiempo de generación de los cultivos de 100 mL de las especies *P. cruentum*, *A. lemermannii* y *S. elongatus*. Las barras de error muestran una desviación estándar (n=3) y el nivel de significancia se denota como *** ($p < 0.001$), **** ($p < 0.0001$).

3.2.3 Rendimiento y productividad de biomasa

El rendimiento de biomasa obtenido en los cultivos de 100 mL de las tres especies de microalga presentó diferencias significativas ($p < 0.05$). Las especies que tuvieron los valores mayores de rendimiento fueron *A. lemermannii* (0.41 g/L) y *P. cruentum* (0.31 g/L) (Figura 5, A).

La productividad evaluada para las tres especies de microalgas presentó diferencias significativas ($p < 0.05$), siendo *A. lemermannii* la especie que presentó la productividad mayor en comparación con *S. elongatus* y *P. cruentum*, las cuales, no presentaron diferencias significativas entre sí (Figura 5, B).

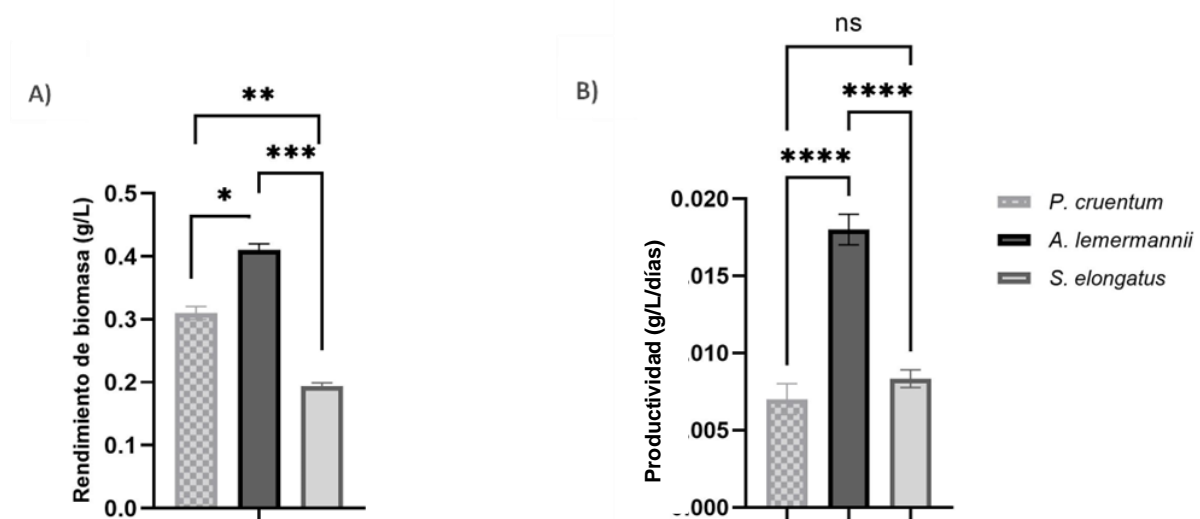


Figura 5. Rendimiento de biomasa (A) y productividad de los cultivos (B) de las tres especies de microalga evaluadas, mantenidos en 100 mL de medio "f". Las barras de error muestran una desviación estándar ($n=3$) y el nivel de significancia se denota como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), **** ($p < 0.0001$).

3.3 Producción masiva en matraces Fernbach 2 L

La curva de crecimiento de cada especie de microalga mantenida en Fernbach de 2 L mostró que *A. lemermannii* llegó a la fase estacionaria el día 9 del cultivo, *P. cruentum* el día 12 del cultivo y *S. elongatus* el día 14 del cultivo (Figura 6).

3.3.1 Perfil de pH en los cultivos microalgales en cultivos de 2 L

Al evaluar los valores de pH de los cultivos mantenidos en un volumen de 2 L de medio "f" se observó que la especie *A. lemermannii* presentó los valores de pH mayores en comparación con las otras dos especies (*P. cruentum* y *S. elongatus*). Se observó un decremento en los valores de pH en los cultivos de las tres especies después de la fase estacionaria (Figura 7).

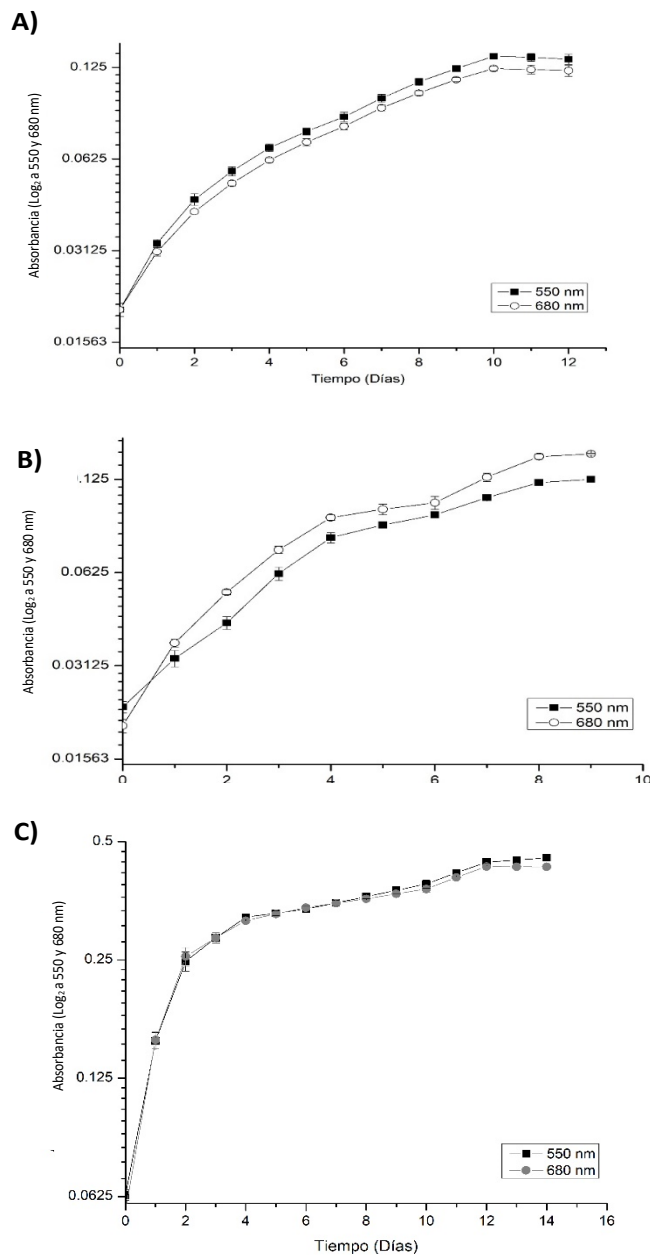


Figura 6. Valores promedio y desviación estándar de las curvas de crecimiento evaluadas por densidad óptica a 550 nm y 680 nm para *P. cruentum* (A), *A. lemermannii* (B) y *S. elongatus* (C) mantenidas en 2 L de medio "f".

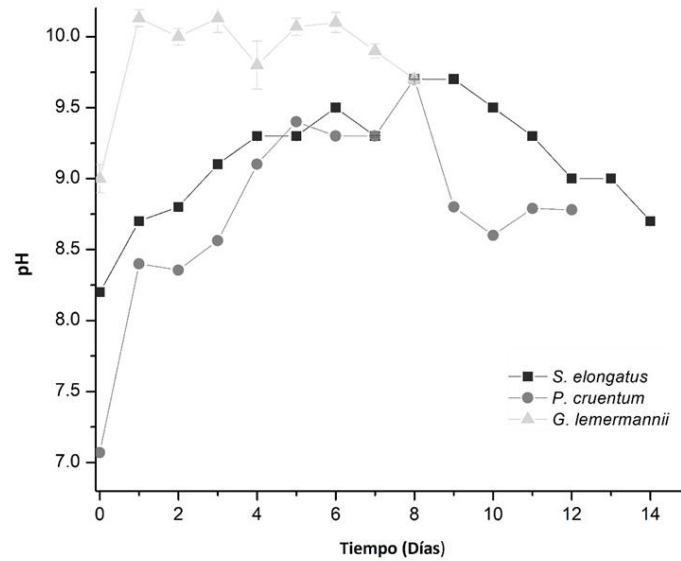


Figura 7. Valores promedio y desviación estándar del pH de las especies *A. lemermannii*, *P. cruentum* y *S. elongatus* mantenidos en matraces Fernbach con 2 L de medio "F".

3.3.2 Tasa de crecimiento y tiempo de generación

La tasa de crecimiento evaluada a 550 y 680 nm mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las especies evaluadas. *S. elongatus* fue la especie que presentó la tasa de crecimiento más alta en comparación con *P. cruentum* y *A. lemermannii*. De igual manera, se observó que a una longitud de onda de 550 nm, las especies *P. cruentum* y *A. lemermannii* no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$).

Al evaluar el tiempo de generación de los cultivos mantenidos en un volumen de 2 L, se observó que *S. elongatus* presentó un menor tiempo de generación (2 días) al ser evaluada a las dos longitudes de onda (550 y 680 nm), en cambio, *P. cruentum* presentó el mayor tiempo de generación: 3.44 días y 3.42 días al ser evaluada a 550 nm y 680 nm respectivamente (Figura 8).

3.3.3 Rendimiento y productividad de la biomasa obtenida de la producción masiva

El rendimiento de biomasa incrementó al aumentar el volumen de los cultivos de *P. cruentum*, *A. lemermannii* y *S. elongatus*. Las especies presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), siendo *A. lemermannii*, la especie que presentó el mayor rendimiento de biomasa (1.58 g/L).

Al evaluar la productividad de biomasa, *A. lemermannii* y *S. elongatus* no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), por lo tanto, ambas especies fueron las que presentaron la productividad de biomasa más alta, en comparación con la especie: *P. cruentum* (Figura 9).

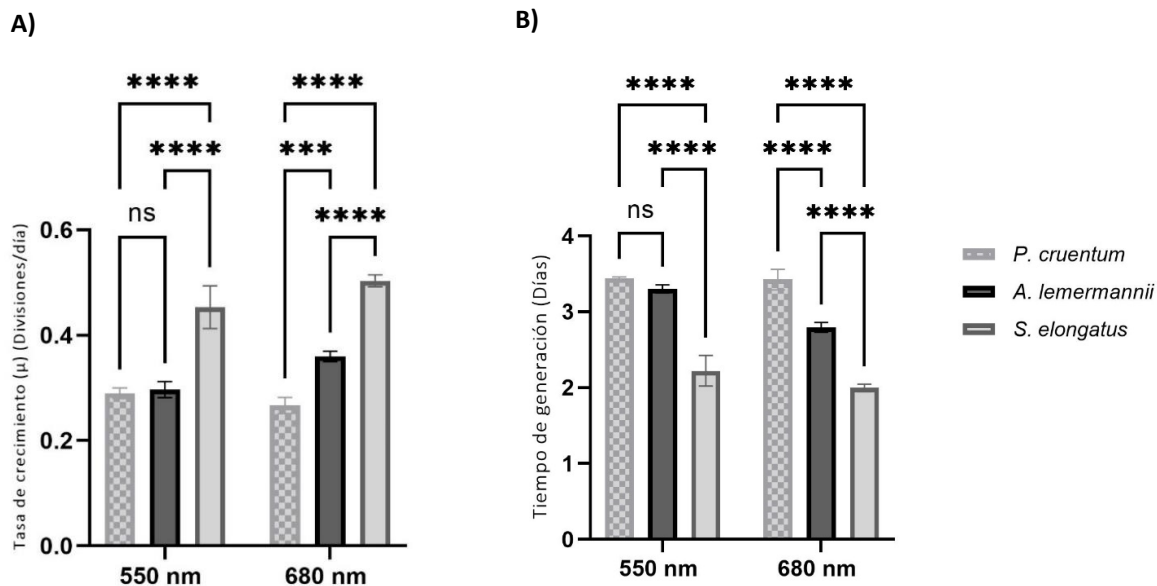


Figura 8. Valores promedio y desviación estándar ($n=3$) de la tasa de crecimiento (A) y el tiempo de generación (B) de los cultivos de las especies *P. cruentum*, *A. lemermannii* y *S. elongatus*, mantenidos en 2 L de medio "f". El nivel de significancia se denota como *** ($p < 0.001$), **** ($p < 0.0001$).

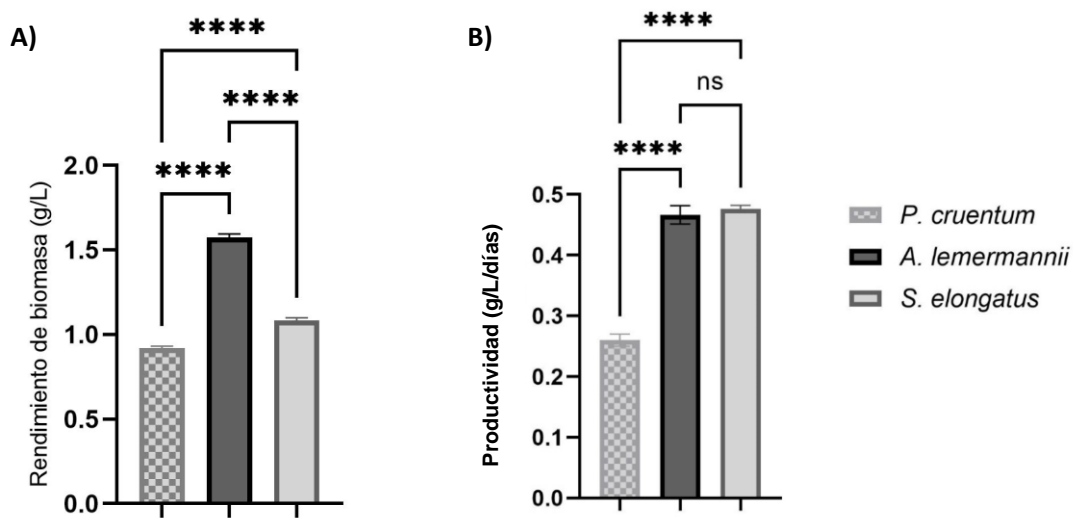


Figura 9. Rendimiento de biomasa (A) y productividad de los cultivos (B) de las tres especies de microalga evaluadas, mantenidos en 2 L de medio "f". Las barras de error muestran una desviación estándar ($n=3$) y el nivel de significancia se denota como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), **** ($p < 0.0001$).

3.4 Criterios de selección del extracto con potencial aplicación biomédica

3.4.1 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los extractos filtrados y no filtrados de las especies *P. cruentum*, *A. lemermannii* y *S. elongatus* resuspendidos en el solvente que se utilizó para su extracción (diclorometano, metanol, hexano y agua) no presentaron actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* a ninguna de las concentraciones evaluadas: 0.2 mg/disco y 2 mg/disco (Figura 10).

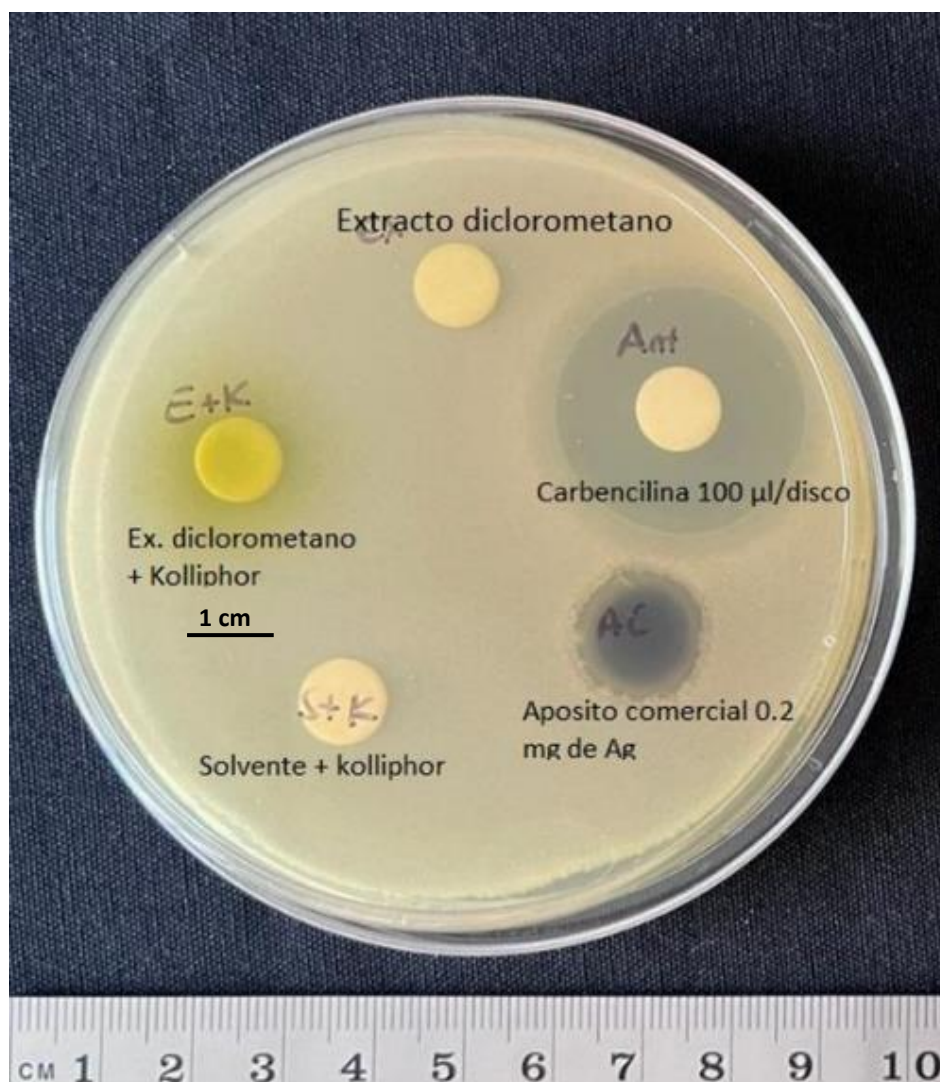


Figura 10. Fotografía de los halos de inhibición del extracto de diclorometano no filtrado (0.2 mg/disco) de la especie *A. lemermannii*, comparados con los halos de inhibición de un apósito comercial (0.2 mg de Ag) y el antibiótico carbencilina (100 µl/disco) contra la bacteria Gram negativa *E. coli*.

Tabla 2. Diámetro (cm) de los halos de inhibición de los extractos (diclorometano, metano, hexano y acuosos) filtrados y no filtrados, con o sin emulsificante (Kolliphor) de la especie *A. lemermannii* a una concentración de 0.2 mg/disco.

Solvente	Filtrado	Emulsificante (Kolliphor®)	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aerous</i>	<i>K. neumoniae</i>
Diclorometano	+	+	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
Metanol	+	-	-	-	-	-
		+	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
Hexano	+	+	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
	-	+	-	-	-	-
Acuoso	+	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
Apósito comercial			1.57 ± 0.23 ***	1.53 ± 0.06 ***	1.3 ± 0.10 ***	1.46 ± 0.15 ***
Antibiótico (control positivo)			2.73 ± 0.12	2.74 ± 0.21	2.53 ± 0.16	2.53 ± 0.25

(-) No se presentó halo de inhibición. El análisis estadístico ANOVA de una vía: se denota como *** ($p < 0.001$), *a posteriori* de Tukey.

Con base a los resultados anteriores, se seleccionaron los extractos no filtrados de las tres especies de microalgas evaluadas. Los cuales, no mostraron actividad antimicrobiana a la concentración de 2 mg/disco contra las bacterias patógenas: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aerous* y *K. neumoniae* (Figura 11).

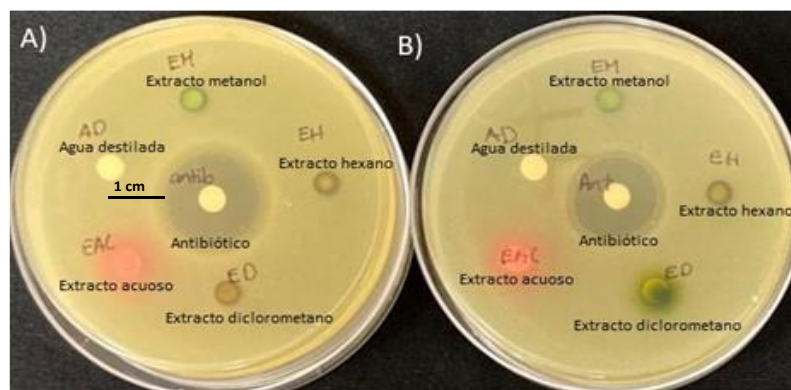


Figura 11. Fotografías de los halos de inhibición de los extractos microalgales (sin Kolliphor) de *P. cruentum* a la concentración de 2 mg/disco, contra las bacterias: *E. coli* (A), *K. neumoniae* (B).

Tabla 3. Diámetro de los halos de inhibición (cm) de los extractos hexano, diclorometano, metanol (con o sin emulsificante Kolliphor) y acuosos de las especies de microalga: *P. cruentum*, *A. lemermannii* y *S. elongatus* contra las bacterias patógenas: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aerous* y *K. pneumoniae*.

Especie	Solvente	Emulsificante (Kolliphor®)	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aerous</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>P. cruentum</i>	Hexano	+	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
	Diclorometano	+	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
	Metanol	+	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
	Acuoso		-	-	-	-
	<i>A. lemermannii</i>	Hexano	+	-	-	-
-			-	-	-	-
Diclorometano		+	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
Metanol		+	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
Acuoso		-	-	-	-	
<i>S. elongatus</i>		Hexano	+	-	-	-
	-		-	-	-	-
	Diclorometano	+	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
	Metanol	+	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
	Acuoso		-	-	-	-
	Control negativo			-	-	-
Antibiótico (cm)			2.5 ± 0.20	2.4 ± 0.17	2.6 ± 0.23	2.5 ± 0.12

(-) No presentó halo de inhibición. El análisis estadístico ANOVA de una vía: se denota como *** ($p < 0.001$), *a posteriori* de Tukey.

3.4.2 Viabilidad celular en fibroblastos de ratón L929 (supervivencia celular)

Los extractos (diclorometano, hexano, metano y acuosos) de las tres especies de microalgas resultaron citotóxicos para la línea celular L929 (fibroblastos de ratón) a una concentración de 0.3 mg/mL. Todos los extractos evaluados presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al Monocapa celular (sin tratamiento). Los extractos metanólicos de las especies *P. cruentum* y *A. lemermannii* fueron los que presentaron un porcentaje de supervivencia celular mayor en comparación a los extractos de diclorometano, hexano y acuosos. De igual manera, se observó que los solventes diclorometano y hexano

más el emulsificante (sin extracto) disminuyen por si solos el porcentaje de células capaces de metabolizar el MTT (Figura 12).

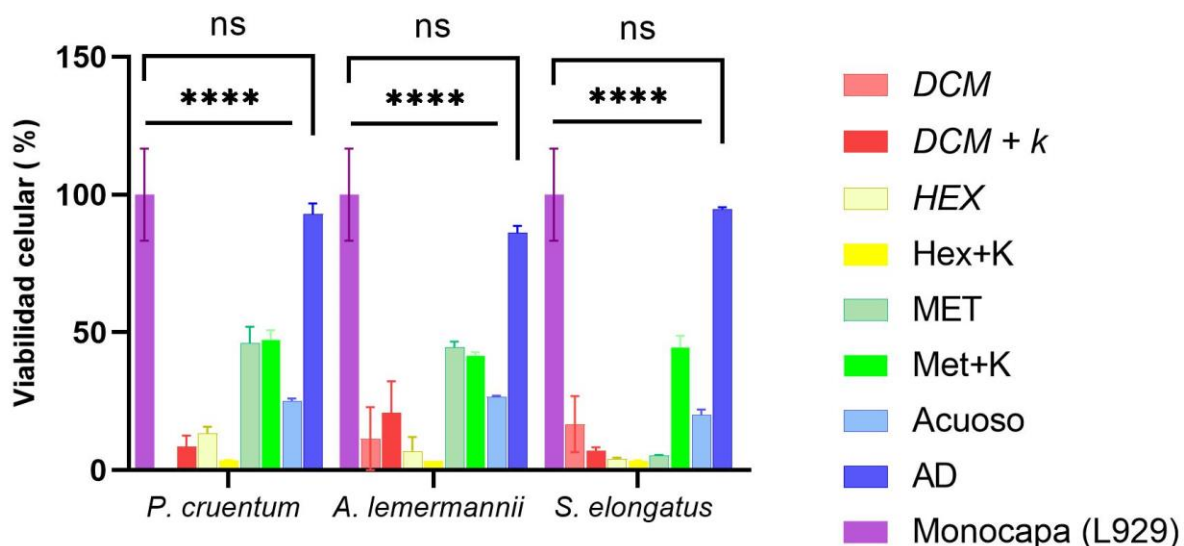


Figura 12. Porcentaje de la viabilidad celular de los extractos diclorometano, metanol, hexano y acuosos de las especies de microalgas: *P. cruentum*, *A. lemermannii* y *S. elongatus*. Donde DCM+K representa el control del extracto diclorometano más el emulsificante Kolliphor (K), Hex+K es el solvente hexano más Kolliphor y Met+K representa al control del extracto metanólico más el emulsificante Kolliphor, todos en una relación solvente y Kolliphor (1:0.125). Se realizó un ANOVA de dos vías: Las barras de error muestran una desviación estándar (n=3), y todos los extractos presentaron diferencias significativas ****($p < 0.0001$) con respecto al control (Monocapa L929), excepto el agua destilada (AD).

A partir de los resultados de la Figura 12, se seleccionaron los extractos metanólicos de las tres especies de microalga: *P. cruentum*, *A. lemermannii* y *S. elongatus* y se evaluó la compatibilidad celular en la línea celular L929 (fibroblastos de ratón) al ser resuspendidos en etanol y Kolliphor (1ml:0.125ml).

Se observó que a una concentración de 0.3 mg/mL el extracto metanólico de *P. cruentum* no presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a las células blanco (fibroblastos L929 sin extracto). A la concentración de 1 mg/mL, el extracto metanólico de *P. cruentum* presentó un porcentaje de supervivencia celular mayor, en comparación con los extractos metanólicos de las especies *A. lemermannii* y *S. elongatus* (Figura 13).

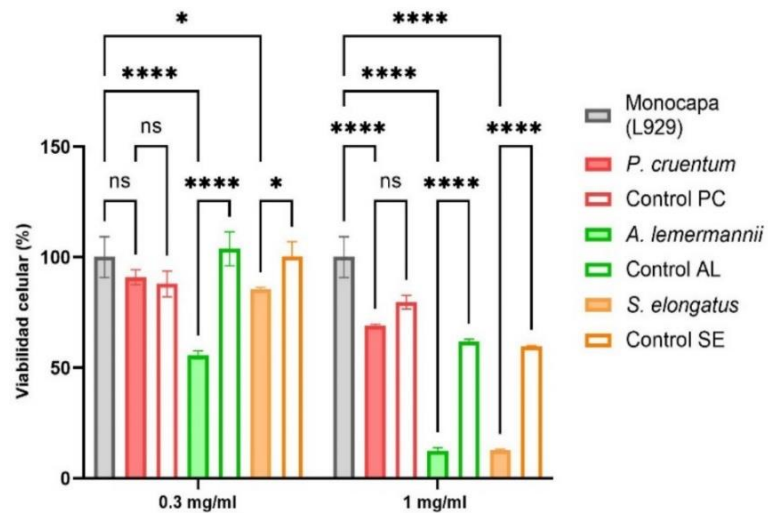


Figura 13. Promedio y desviación estándar (n=3) del porcentaje de viabilidad celular de los extractos metanólicos de las tres especies de microalga a las concentraciones: 0.3 mg/mL y 1 mg/mL en la línea celular L929. El nivel de significancia (ANOVA de dos vías) se denota como *(p<0.05), **** (p<0.0001), prueba *a posteriori* de Tukey. Control PC: control *P. cruentum* (agua, etanol y Kolliphor), control AL: *A. lemermannii* (agua, etanol y Kolliphor) y control SE: *S. elongatus* (agua, etanol y Kolliphor).

A partir de los resultados de la figura 13, se seleccionó el extracto metanólico de la especie *P. cruentum* (MPC). Al evaluar su viabilidad celular en los fibroblastos de ratón L929 a las concentraciones: 0.4, 0.5 y 0.6 mg/mL, se observó que hay diferencias significativas (p<0.05) entre las diferentes concentraciones y control experimental (Monocapa L929). Al igual, se observó que al incrementar la concentración del extracto MPC disminuyó el porcentaje de viabilidad celular (Figura 14).

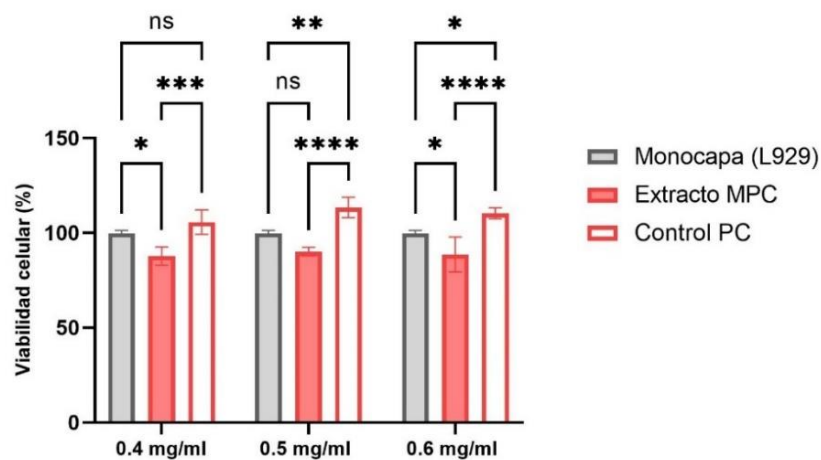


Figura 14. Viabilidad celular del extracto metanólico de *P. cruentum* (extracto MPC) y el control PC etanol más Kolliphor (1mL:0.125mL) en la línea celular L929. Las barras de error muestran una desviación estándar (n=3) y el nivel de significancia se denota como *(p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001), **** (p<0.0001).

3.5 Ensayo final: Bioprospección del extracto metanólico de *P. cruentum* (MPC)

3.5.1 Actividad antimicrobiana

Los resultados mostraron que el extracto metanólico de *P. cruentum* (MPC) a las concentraciones 0.3, 0.6 y 1 mg/mL, no presentó actividad antimicrobiana contra las especies de bacterias patógenas utilizadas: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* (Figura 15).

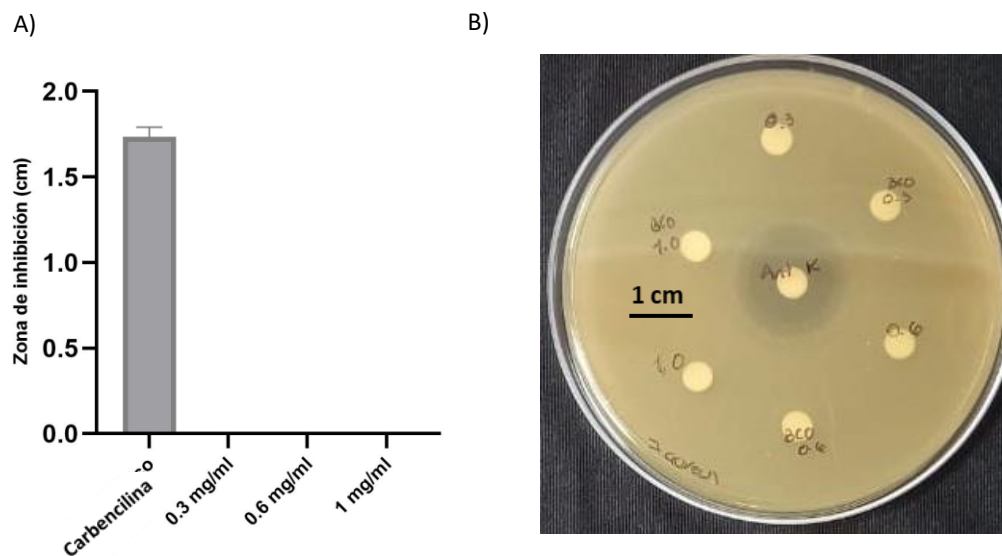


Figura 15. (A) Gráfica de promedios de los halos de inhibición del extracto metanólico de *P. cruentum* (MPC) a las concentraciones: 0.3, 0.6 y 1 mg/mL contra la especie *S. aureus*. (B) Fotografía donde se observan las zonas de inhibición (diámetro) del extracto evaluado.

3.5.2 Actividad antioxidante

Tras evaluar la actividad antioxidante del extracto MPC se observó que a las concentraciones: 0.3, 0.4 y 0.5 mg/mL, los porcentajes de inhibición de la oxidación del ABTS fueron menores al 10%, y no se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a los controles experimentales utilizados (etanol, Kolliphor y agua). A las concentraciones 0.6 y 1 mg/mL del extracto MPC se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control experimental y el porcentaje de inhibición a la concentración más alta (1 mg/mL) fue a la concentración 1 mg/mL (17%) (Figura 16).

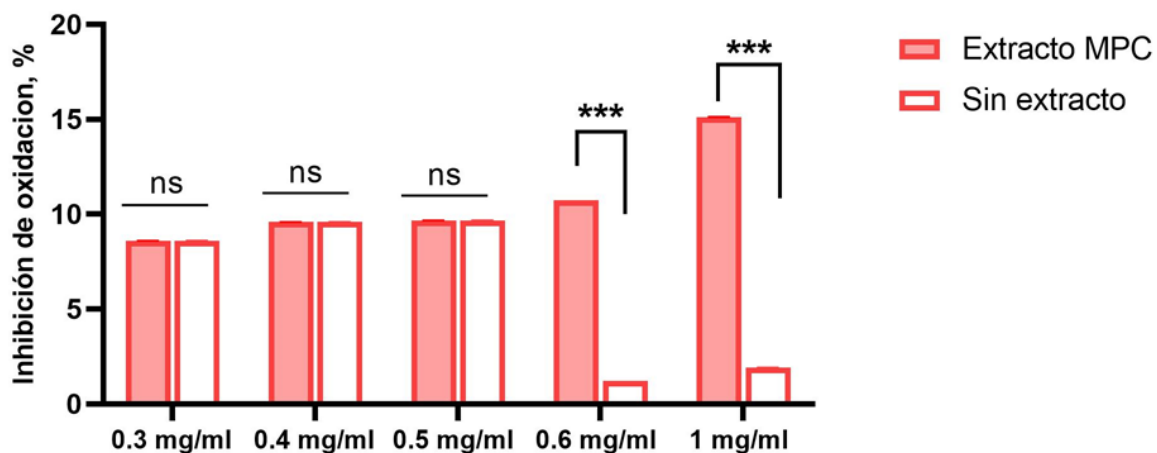


Figura 16. Capacidad antioxidante del extracto metanólico de *P. cruentum*. Porcentaje de inhibición de la oxidación del radical ABTS. Control negativo (agua, Kolliphor y etanol) denominado “Sin extracto”. Las barras verticales representan la desviación estándar (n=3) y el nivel de significancia se denota como *** (p<0.001).

3.5.3 Remoción de óxido nítrico

El extracto MPC presentó 3.3%, 10.8 %, 9.3%, 13.6% y 28.5% de remoción NO* a las concentraciones 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 1 mg/mL, respectivamente. Se observaron diferencias significativas (p<0.05) entre las concentraciones, con excepción de las concentraciones 0.4 y 0.5 mg/mL, ya que no hubo diferencias significativas (p<0.05) entre sí. De igual manera, se observó un incremento en el porcentaje de remoción de NO* al incrementar la concentración a 1 mg/mL (Figura 17).

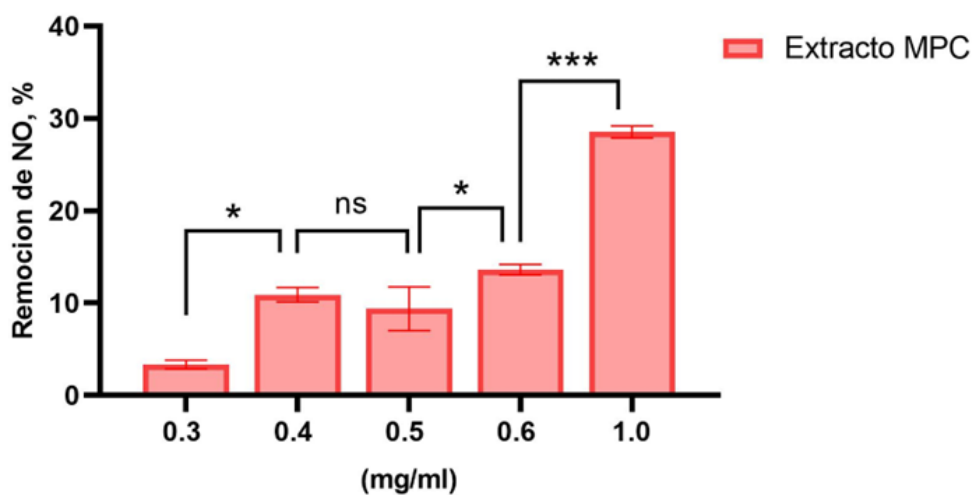


Figura 17. Valores promedio y desviación estándar (n=3) del porcentaje de remoción de NO* del extracto metanólico de *P. cruentum* a las concentraciones: 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 1 mg/mL. El nivel de significancia se denota como * (p<0.05) *** (p<0.001).

3.5.4 Cuantificación de citocinas en células HHSC-NASH

Al evaluar la concentración de citocinas solubles presentes en el medio de cultivo de las células HHSC-NASH tratadas con el extracto MPC a 0.3 y 0.6 mg/mL se observó un incremento en las IL-4, IL5, IL9 y IL-22 en las células NASH tratadas con el extracto MPC a la concentración de 0.3 mg/mL (Figura 18). A la concentración de 0.6 mg/mL, se incrementó la concentración de las citocinas IL-4, IL-22 y IL-13 presentes en el medio cultivo de las células HHSC-NASH (Figura 18 y 19).

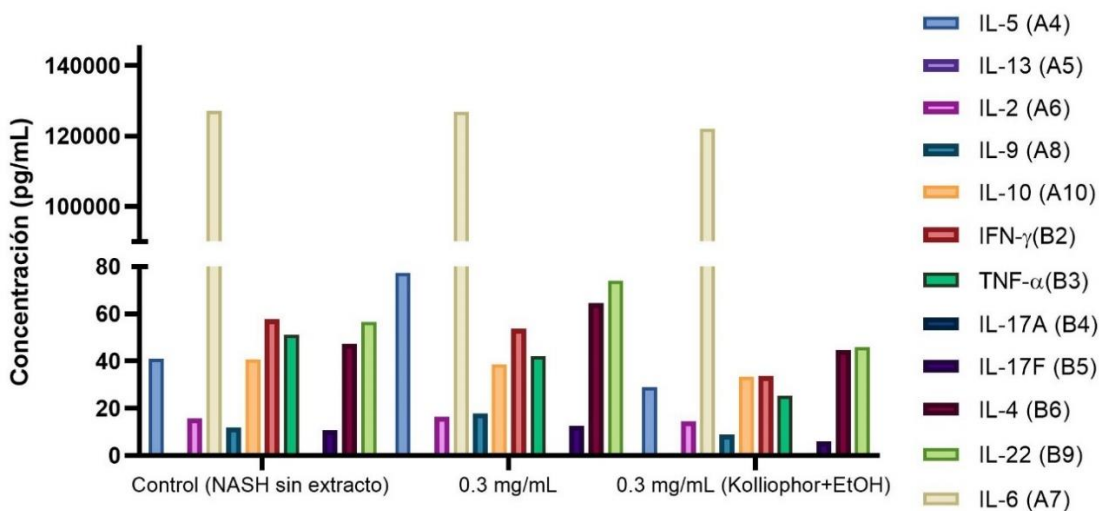


Figura 18. Evaluación de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-NASH tratados con el extracto metanólico de *P. cruentum* (MPC) y el control negativo (Kolliphor, etanol y agua) a una concentración de 0.3 mg/mL.

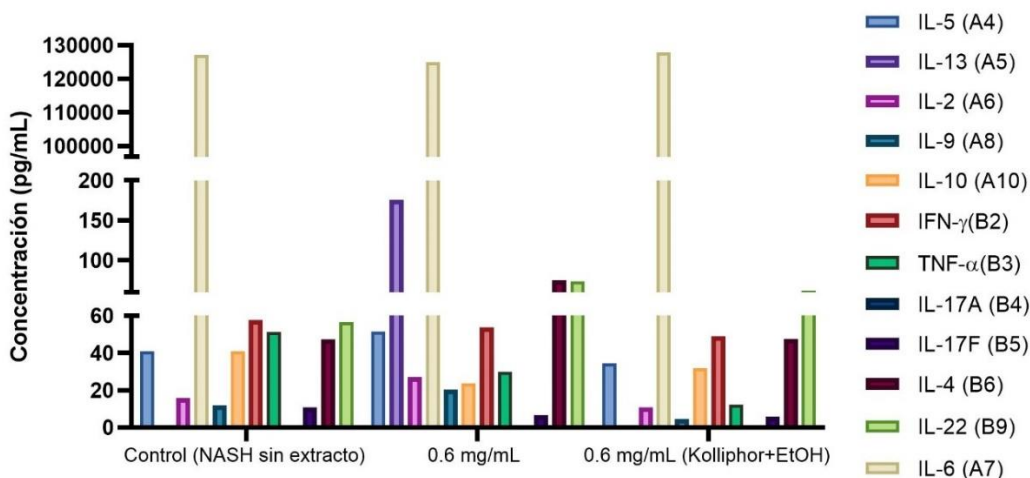


Figura 19. Evaluación de citocinas solubles detectadas en cultivos de HHSC-NASH tratados con el extracto metanólico de *P. cruentum* (MPC) y el control negativo (Kolliphor, etanol y agua) a una concentración de 0.6 mg/mL.

3.5.4.1 Viabilidad celular del extracto MPC en células HHSC-NASH.

La viabilidad celular del extracto MPC en las células HHSC-NASH no presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control (Monocapa HHSC-NASH) y el control experimental negativo (Kolliphor, etanol y agua) denominado “Sin extracto” en la Figura 20. Se observó que el control experimental (sin extracto) a la concentración de 1 mg/mL incrementó la supervivencia celular de las células HHSC-NASH (Figura 20).

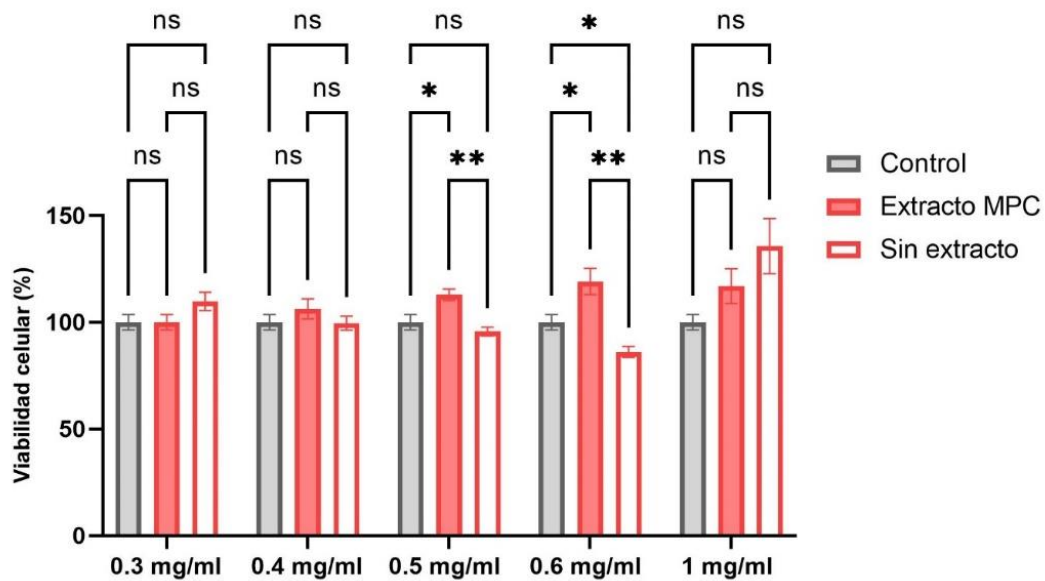


Figura 20. Porcentaje de viabilidad celular de las células HHSC-NASH, tratadas con el extracto metanólico de *P. cruentum* (MPC). Las barras de error muestran una desviación estándar ($n=3$) y el nivel de significancia se denota como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$).

3.5.5 Citotoxicidad del extracto metanólico de *P. cruentum* en células de cáncer pancreático

El extracto MPC demostró tener potencial aplicación anticancerígena. Tras evaluar la supervivencia celular de células de cáncer pancreático BxPC-3 (Adenocarcinoma) tratadas con el extracto MPC a las concentraciones: 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 1 mg/mL disminuyó el porcentaje de supervivencia celular. El extracto MPC presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control experimental y la Monocapa BxPC-3 (Figura 21).

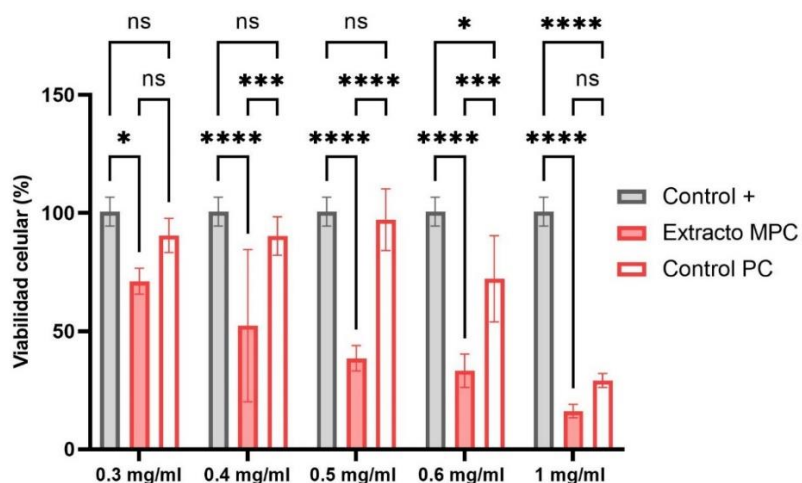


Figura 21. Porcentaje de viabilidad celular del extracto metanólico de *P. cruentum* (MPC) en la línea celular BxPC-3 (adenocarcinoma). Como controles experimentales: Monocapa BxPC-3 (control +) y etanol, Kolliphor más agua (control PC). Las barras de error muestran una desviación estándar ($n=3$) y el nivel de significancia se denota como * ($p<0.05$), *** ($p<0.001$), **** ($p<0.0001$).

3.6 Caracterización del extracto metanólico de *P. cruentum* (MPC)

3.6.1 Identificación de grupos funcionales mediante FTIR

En el espectro del extracto metanólico de *P. cruentum*, se detectaron bandas de absorción espectral a una frecuencia de 1031 cm^{-1} (esqueleto C-C), 1155 cm^{-1} (amina, estiramiento C-N), 1471 cm^{-1} (anillo, estiramiento C=C-C), 1731 cm^{-1} (ácido carboxílico C=O), 2148 cm^{-1} (estiramiento C≡C), 2850 cm^{-1} (estiramiento C-H), 2900 cm^{-1} (estiramiento C-H (CH_3)), 3355 cm^{-1} (amino primario N-H) (Figura 22).

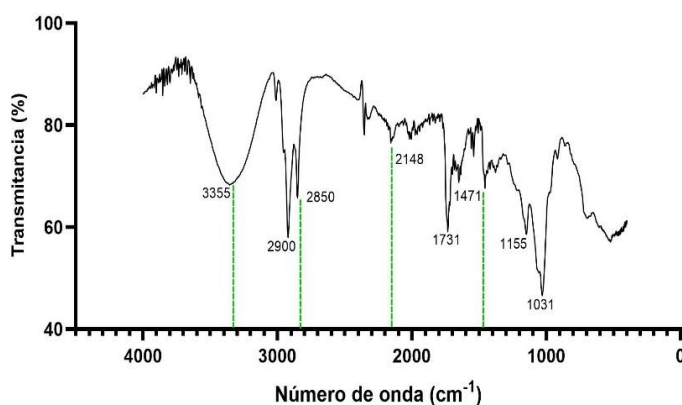


Figura 22. Espectro FTIR del extracto metanólico de *P. cruentum*.

3.6.2 Perfil de ácidos grasos de la biomasa de *P. cruentum*

La especie *P. cruentum* presentó 73.3% de ácidos grasos saturados (SSA) por sus siglas en inglés, 3.4% de monoinsaturados (MUFA) y 23.2% de poliinsaturados (PUFA). Siendo el ácido palmítico el más abundante (30.31%), seguido por el ácido behénico (22.34 %) y el ácido heneicosílico (17.73%) (Tabla 4).

Tabla 4. Valores promedio y desviación estándar del porcentaje de ácidos grasos de la biomasa liofilizada de la especie *P. cruentum*.

Composición de ácidos grasos		<i>P. cruentum</i> (%)		
SFA			±	DE
C4:0	Ácido butanoico	0.08	±	0.01
C10:0	Ácido cáprico	1.07	±	0.22
C11:0	Ácido undecílico	0.00	±	0.00
C12:0	Ácido láurico	0.02	±	0.00
C13:0	Ácido tridecílico	0.39	±	0.16
C14:0	Ácido mirístico	0.28	±	0.04
C15:0	Ácido pentadecanoico	0.18	±	0.02
C16:0	Ácido palmítico	30.31	±	0.54
C17:0	Ácido margárico	0.08	±	0.01
C18:0	Ácido esteárico	0.73	±	0.03
C20:0	Ácido araquídico	0.07	±	0.01
C21:0	ácido heneicosílico	17.73	±	0.37
C22:0	Ácido behénico	22.34	±	0.86
C24:0	Ácido lignocérico	0.05	±	0.01
MUFA				
C14:1	Ácido miristoleico	0.01	±	0.00
C16:1	Ácido palmitoleico	2.35	±	0.39
C17:1	Ácido heptadecanoico	0.05	±	0.02
C24:1	Ácido nervónico	0.05	±	0.04
C18:1n9	Ácido oleico	0.82	±	0.12
C20:1n9	Ácido eicosenoico	0.17	±	0.02
PUFA				
C18:2n6 C	Ácido linoleico	6.05	±	0.18
C18:3n6	Ácido gamma-linolénico	0.11	±	0.01
C18:3n3	Ácido alfa-linolénico	0.07	±	0.01
C20:2n6	Ácido eicosadienoico	1.66	±	0.11
C20:3n6	Ácido dihomo-gamma linolénico	0.49	±	0.03
C20:4n6 ARA	Ácido araquidónico	14.60	±	0.31
C20:5n3 EPA	Ácido eicosapentaenoico	0.08	±	0.01
C22:6n3 DHA	Ácido docosaheptaenoico	0.16	±	0.02
	TOTAL	100.00		
	Σ SFA	73.32	±	0.57
	Σ MUFA	3.44	±	0.57
	Σ PUFA	23.23	±	0.52

DE: Desviación estándar.

Capítulo 4. Discusión

Las microalgas modifican su composición bioquímica, su crecimiento y el rendimiento del cultivo en función de los cambios ambientales como el pH, la temperatura, la irradiancia, así como la cantidad y tipo de forma química de los nutrientes (González-Muños, 2006). Las especies de microalgas que se evaluaron en este trabajo mantuvieron un intervalo de pH de 7.0 a 10.1. Para *A. lemermannii* se presentaron los valores de pH mayores (8.9 – 10.1). Se han reportado valores de pH altos en cultivos de *A. lemermannii* donde no se ha suministrado CO₂ adicional. En el trabajo realizado por Casian-González (2020), se obtuvieron valores de pH similares (8.7 -10.4) para esta especie mantenida en agua dulce a 20 ± 2 °C, con una irradiancia de 200 μmol/m²/s y los cultivos llegaron a la fase estacionaria al día 9 del cultivo. Sin embargo, *A. lemermannii* evaluada en el presente trabajo presentó una tasa de crecimiento menor (0.36 ± 0.01 divisiones/día) y un tiempo de generación mayor (2.79 ± 0.06 días), en comparación con los valores de la tasa de crecimiento (1.31 ± 0.15) y el tiempo de generación (0.77 ± 0.08) obtenidos por Casian-González (2020).

En este trabajo se aplicó una irradiancia de 100 μmol/m²/s a los cultivos de las tres especies de microalgas estudiadas. La especie *S. elongatus* llegó a la fase estacionaria al día 15 de cultivo y con valores de densidad óptica mayores respecto a lo obtenido para la misma especie por Sánchez-Saavedra et al. (2010), quienes usaron similares condiciones de cultivo, excepto por la irradiancia suministrada (75 μE/m²/s). Sin embargo, aunque el cultivo evaluado en este trabajo presentó valores mayores de DO, los valores de la tasa de crecimiento (0.50 divisiones/día) fueron menores a los indicados por Sánchez-Saavedra et al. (2010) (0.70 divisiones/día). Se ha reportado que, en las distintas especies de microalgas, por efecto de la irradiancia se producen modificaciones en el crecimiento, en la producción de metabolitos, en el tamaño de las células y en el contenido de pigmentos. El aumento de la irradiancia de la luz, mejora la capacidad fotosintética de las células, lo que da como resultado una mayor tasa de crecimiento. Sin embargo, cuando se presenta una saturación del flujo de fotones, hay un efecto de inhibición en el crecimiento celular, causado por la exposición a una alta intensidad de luz (You et al., 2004).

Las curvas de crecimiento de los cultivos de *P. cruentum* presentaron una respuesta similar a la reportada por Sánchez-Saavedra et al. (2010) y Ruiz-Güereca et al. (2019), pero con una fase de crecimiento exponencial más corta (12 días), con respecto a la reportada por Sánchez-Saavedra et al. (2010), lo que implica menor tiempo para llegar a la fase estacionaria del cultivo. You et al. (2004), evaluaron el efecto de suministrar irradiancias superiores a 70 μmol/m²/s al cultivo de *P. cruentum*, donde al incrementar la

irradiancia disminuyó la tasa de crecimiento. Para diversas especies de microalgas, se ha encontrado que el crecimiento, el contenido de proteínas, pigmentos, ácidos grasos, compuestos fenólicos, la productividad de biomasa y la biosíntesis de metabolitos específicos cambian en respuesta a las condiciones del medio de cultivo (Román et al., 2002; Deng et al., 2019).

Para extraer los diversos compuestos bioactivos presentes en la biomasa de las microalgas evaluadas se utilizaron solventes con diferente grado de polaridad. En otros estudios se ha visto que, al momento de aislar los metabolitos secundarios de interés, se acumulan en pequeñas cantidades dentro de la célula y su distribución es altamente restringida en comparación con los metabolitos primarios (Gonzalez-Davis, 2010). Debido a la estructura de las células de las microalgas, la pared celular actúa como barrera para la liberación de los metabolitos, por lo que es necesario que la biomasa pase por un proceso mecánico como la sonicación o la molienda con mortero de cerámica para degradar y romper la pared celular, dando lugar a una mayor accesibilidad del solvente al interior de la célula, mejorando la eficiencia de extracción (Yap et al., 2014).

En el presente estudio, se realizó la extracción de los metabolitos microalgales utilizando solventes de diferente grado de polaridad, siendo el hexano el solvente más polar, seguido del diclorometano, metanol, y agua (apolar). Al utilizar solventes orgánicos, los extractos presentaron una naturaleza lipofílica, lo que dificultó incorporar los extractos a soluciones acuosas, por lo que fue necesario utilizar un agente emulsificante que permitiera solubilizar de manera homogénea los extractos en agua y así realizar las evaluaciones de viabilidad celular, actividad antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena. Para esto se utilizó un surfactante industrial llamado Kolliphor, el cual es elaborado mayormente con polietileno glicol (PEG) ricinoleato, aceite de castor y óxido de etileno (BASF, 2019). Los ésteres de PEG con ácidos grasos forman la parte hidrofóbica, mientras que la parte de PEG libre y glicerol etoxilado forman la parte hidrofílica, permitiendo solubilizar moléculas lipofílicas en soluciones acuosas (Zertuche, 2021).

La selección de estos solventes se basó en estudios previos en el equipo de trabajo, donde los extractos de las especies *P. cruentum* y *S. elongatus* presentaron actividad antimicrobiana contra las especies de interés: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* (Sánchez-Saavedra et al., 2010). Sin embargo, se desconoce la concentración a la que se encontraban los extractos mencionados, por lo que se comenzó con evaluar nuestros extractos a una concentración de 0.2 mg/disco, comparándolo con un apósito comercial (con 0.2 mg de plata). Los extractos orgánicos y acuosos evaluados en este trabajo no presentaron actividad antimicrobiana, por lo que se incrementó la concentración a 2 mg/disco. Sin

embargo, tampoco se obtuvieron resultados positivos, lo que se puede atribuir a que las especies de bacterias patógenas antes mencionadas presentan una alta resistencia a distintos antibióticos y las concentraciones utilizadas no tuvieron efecto alguno (Caldwell, 2020).

Alsenani et al. (2020) utilizaron acetato de etilo, acetonitrilo, acetona, cloroformo, metanol, etanol, diclorometano, hexano, agua más metanol entre otros solventes de extracción y evaluaron la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en disco, contra bacterias patógenas que incluyen a *S. aureus* y *E. coli*, donde no obtuvieron resultados positivos a la concentración de 1 mg/mL. Maadane et al. (2021) evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos microalgales y demostraron que a una concentración de 2.6 mg/mL y 4.3 mg/mL inhiben bacterias Gram positivas. Najdenski et al. (2013) evaluaron que *P. cruentum* a una concentración de 7.0 mg/mL inhibe el crecimiento de la bacteria *S. aureus*. Lo que indica que la concentración influye directamente en los resultados obtenidos al momento de evaluar las bioactividades de los extractos. Sánchez-Saavedra et al. (2010), realizaron la extracción de compuestos de las especies *P. cruentum* y *S. elongatus* utilizando como solventes de extracción hexano, diclorometano y metanol. Los resultados mostraron que el extracto de diclorometano de *P. cruentum* inhibió el crecimiento de las bacterias *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, los extractos con hexano, diclorometano y metanol de la especie *S. elongatus* presentaron actividad contra *S. aureus* y los extractos con hexano y diclorometano fueron activos contra *K. pneumoniae*. En el presente trabajo se evaluaron los extractos obtenidos con diclorometano, metanol, hexano y agua de *P. cruentum*, *S. elongatus* y *A. lemermannii* a las concentraciones: 0.2 mg/mL y 2 mg/mL. Los resultados mostraron que no tuvieron actividad antimicrobiana a estas concentraciones. Además, al realizar el ensayo con *S. aureus* (bacteria Gram positiva) presentó resistencia al antibiótico carbencilina (50 µL/disco). En el trabajo de Sánchez-Saavedra et al. (2010) se utilizó carbencilina como control contra *S. aureus*, donde no presentó resistencia. Se ha encontrado que *S. aureus* posee genes que codifican para resistencia a antibióticos, los cuales pueden transmitirse de célula a célula mediante procesos de conjugación (Arnedo, 2017). Por lo tanto, *S. aureus* pudo presentar resistencia a los compuestos antimicrobianos de las microalgas evaluadas, siendo otro posible factor que influyó en el resultado obtenido de falta de actividad antimicrobiana en este trabajo.

Además de la actividad antimicrobiana, la biocompatibilidad de los extractos es primordial al ser incorporados en biomateriales con aplicación biomédica (Cárdenas-Carreón, 2019). Por ello, se evaluó la citotoxicidad de los extractos de las tres especies de microalgas mediante ensayos de MTT en la línea celular de fibroblastos L929. Los fibroblastos son células clave en los ensayos de viabilidad celular, ya que forman parte de diversos sistemas conectivos. Una función clave de los fibroblastos inactivos, es su capacidad para diferenciarse en fibroblastos activos a través de la respuesta a los factores de crecimiento,

por lo que exhiben propiedades de proliferación, migración y producción de factores de crecimiento y matriz extracelular. Por lo tanto, también exhiben una prolífica actividad de síntesis de proteínas y actividad contráctil que es crucial para acciones como el cierre de heridas y la producción de tejido conectivo (Chang et al., 2002). Actualmente, se conoce que los fibroblastos son células versátiles y ampliamente estudiadas *in vitro* debido a su facilidad de aislamiento y cultivo, ya que presentan resistencia ante el estrés severo, convirtiéndolos en un modelo de estudio en la biología molecular (Kalluri et al., 2016).

La evaluación de la citotoxicidad es el primer paso para evaluar la biocompatibilidad de los materiales, ya que es importante evaluar la respuesta al cuerpo “extraño”, debido a que células inmunes, plaquetas, células endoteliales y fibroblastos participan en la disposición espacial y temporal para restaurar el tejido funcional e integrarse con el material (Hanna et al., 2018). Se emplean diferentes métodos para evaluar la citotoxicidad *in vitro*, tal como la evaluación de los cambios en la permeabilidad de la membrana celular, ensayos de replicación y evaluaciones funcionales. La selección de una prueba apropiada depende de las condiciones de la prueba y la composición química de los materiales (Gerlier y Thomasset, 1986). Por lo que el ensayo MTT con fibroblastos murinos L929 utilizado en este estudio, fue seleccionado debido a que al ser un ensayo colorimétrico para medir la actividad metabólica celular, presenta ventajas como simplicidad, precisión y se obtienen resultados en corto tiempo (días). La reducción de la sal amarilla de metil tetrazolio por la enzima deshidrogenasa mitocondrial produce cristales de formazán en las células viables, lo que provoca un cambio de color azul oscuro. A continuación, se mide la densidad óptica de la solución coloreada con un espectrofotómetro, donde la cantidad de cristales de formazán producidos tiene una correlación directa con el número total de células viables (Ahangari et al., 2022).

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron con extractos suspendidos en el solvente utilizado para su extracción, donde todos los extractos evaluados a una concentración de 0.3 mg/mL presentaron citotoxicidad, independientemente del solvente utilizado. Sin embargo, los extractos metanólicos fueron los que presentaron menor porcentaje de citotoxicidad. Por lo anterior, se tomó la decisión de cambiar el solvente en el que se encontraban resuspendidos los extractos por etanol, Kolliphor y agua. Este cambio de estrategia fue basado en los resultados obtenidos por Zertuche-Arias (2021), quien encontró que el etanol, Kolliphor (1:0.125) y agua usados presentaron viabilidad celular en la línea L929 de fibroblastos de ratón. Debido a que los extractos metanólicos fueron los que presentaron menor citotoxicidad, se evaluaron nuevamente a las concentraciones de 0.3 mg/mL y 1 mg/mL. Sin embargo, el extracto de *P. cruentum* a la concentración de 0.3 mg/mL, fue el único que no presentó diferencias en la citotoxicidad con respecto al tratamiento control (Monocapa celular L929), mientras que los extractos metanólicos de

A. lemermannii y *S. elongatus* presentaron citotoxicidad a la misma concentración. Al incrementar la concentración a 1 mg/mL aumentó la citotoxicidad de los extractos de las tres especies. Por lo anterior, se seleccionó el rango de concentraciones de 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 1 mg/mL del extracto de *P. cruentum* para realizar las evaluaciones de actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante y anticancerígena bajo las concentraciones que presentaron viabilidad celular. Nicolail et al. (2017) realizaron la evaluación de la toxicidad de extractos de 13 especies de microalgas en fibroblastos humanos. Los resultados mostraron que el extracto de *Porphyridium* sp. no presentó toxicidad en la línea celular L929. Soltani et al. (2016) evaluaron la toxicidad de extractos acuosos de diferentes especies de microalga. Se encontró que *Synechococcus* sp. presentó toxicidad en la línea celular L929 a una concentración de 10 mg/mL. Los resultados obtenidos en esta investigación, difieren de lo obtenido por Nicolail et al. (2017) y Soltani et al. (2016). Estas diferencias, son debidas a que varias especies de microalgas producen toxinas que pueden ser activas a dosis muy bajas. Por ejemplo, las cianobacterias pueden producir metabolitos secundarios (citotoxinas) que pueden tener efectos nocivos para la salud humana (Tredici et al., 2009). En esta investigación se utilizaron extractos metanólicos de la cianobacteria *A. lemermannii* y se presentó toxicidad en concentraciones de 0.3 mg/mL en la línea celular L929. Además de la capacidad de cada especie de microalgas para producir toxinas, se ha reportado que la toxicidad está directamente relacionada con la cantidad de biomasa y el tipo de solvente utilizado (Nicolail et al., 2017).

La capacidad inflamatoria se evaluó en términos de remoción de óxido nítrico, el cual es donado por el nitroprusiato de sodio, mediador proinflamatorio quimioatrayente de células del sistema inmunológico (Sharma et al., 2007). Los resultados mostraron que el extracto metanólico de *P. cruentum* no presentó actividad antiinflamatoria a las concentraciones evaluadas, ya que la concentración más alta (1 mg/mL) presentó porcentajes de remoción inferiores al 30%, mientras que a la concentración más baja (0.3 mg/mL) presentó menos del 10% de remoción de óxido nítrico. De igual manera, al evaluar la actividad antioxidante del extracto metanólico de *P. cruentum*, se encontró que no presenta actividad antioxidante a las contracciones evaluadas, ya que mediante el ensayo con el radical ABTS, se observó que a la concentración más alta (1 mg/mL) el porcentaje de inhibición de la oxidación fue del 15%. En el trabajo realizado por Casas-Arrojo et al. (2021) se obtuvo 30% de inhibición de la oxidación del radical ABTS a una concentración de 200 µg/mL de biomasa de *P. cruentum*. Diferencia que se puede atribuir a que en el trabajo realizado por Casas-Arrojo et al. (2021) se realizó la extracción específica de polisacáridos, los cuales promueven la actividad antioxidante, lo que sugiere un mecanismo de protección celular contra especies reactivas de oxígeno (Tannin-Spitz et al., 2005). Además, la administración *in vivo* de los polisacáridos exocelulares de *P. cruentum* a ratones ha resultado en un aumento de la población de macrófagos y un aumento de la enzima fosfatasa ácida (Werner y Jolles, 1996). Según Rudic et al. (2011),

la actividad antioxidante observada para la biomasa de *P. cruentum* utilizando el ensayo ABTS es atribuida a los carotenoides, ya que representan la mayor parte de la capacidad antioxidante de las microalgas. Sin embargo, también intervienen otros compuestos como enzimas, vitaminas, polisacáridos y ácidos grasos poliinsaturados (Guedes et al., 2013). En *P. cruentum*, las ubiquinonas y los polisacáridos sulfatados son los principales contribuyentes a la capacidad antioxidante. Por lo tanto, es posible la ausencia de estos compuestos en el extracto metanólico de *P. cruentum* evaluado en este trabajo, lo que da como resultado, la ausencia de actividad antioxidante.

En otros estudios, se encontró que los polisacáridos sulfatados de *P. cruentum*, mostraron propiedades antiinflamatorias y que, al tener contacto con células endoteliales de arteria coronaria humana, inhiben el estrés oxidativo inducido por el factor de necrosis tumoral (TNF α) y mejoran la función endotelial (Levy-Ontman et al., 2017). Las propiedades antiinflamatorias de los polisacáridos, inhiben el desarrollo de eritema, tal efecto inhibitorio disminuye la liberación de citocinas inflamatorias y la inducción de óxido nítrico, reduciendo la permeabilidad de los vasos sanguíneos (Miguel et al., 2021).

La cuantificación de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias se realizó en células estrelladas hepáticas humanas de donadores con esteatohepatitis no alcohólica (HHSC-NASH), la cuál es una enfermedad crónica caracterizada por inflamación grasa difusa, inflamación lobulillar y fibrosis perisinusoidal (Harrison et al., 2002). En este trabajo se observó un incremento en la IL-13 (A15) a las 24 h de contacto con el extracto metanólico de *P. cruentum* a una concentración de 0.6 mg/mL. La IL-13 fue descubierta junto con IL-4, producidas por Th2. Sin embargo, además de las células T, otros tipos de células producen IL13, incluidos los mastocitos, los macrófagos y las células dendríticas, relacionadas directamente con la proinflamación (Kumar et al., 2011). Otra área importante de investigación es el campo del cáncer, donde, según el tipo de célula tumoral en cuestión, la IL-13 o los receptores de la IL-13 pueden inhibir o promover el crecimiento de células tumorales. Se ha demostrado una potente actividad antitumoral tanto para la IL-4 como para la IL-13 en ratones. También se demostraron efectos antiproliferativos en células de cáncer de mama humano, carcinoma de células renales por parte de la IL-13 (Blais et al., 1996). Por lo tanto, dirigirse al sistema de receptores IL-13, puede resultar eficaz en el tratamiento de varias neoplastias malignas (Margaret et al., 2006).

El extracto metanólico de *P. cruentum* no resultó citotóxico para las células NASH tras ser evaluado mediante el ensayo de viabilidad celular (MTT). Sin embargo, al evaluar la viabilidad celular del extracto metanólico de *P. cruentum* en células de cáncer pancreático BxPC3, los resultados mostraron reducción en la proliferación de las células cancerígenas. Al evaluar el extracto a 0.3 mg/mL disminuyó 30% la viabilidad

celular, mientras que a 0.6 mg/mL suprimió hasta un 70% la replicación de las células cancerosas adherentes. Los resultados obtenidos en este trabajo son comparables con los resultados obtenidos por Somasehkar et al. (2016), ya que evaluaron la viabilidad celular en la línea BxPC3 de un extracto de microalgas. Estos autores encontraron que el extracto de microalgas no inhibió el crecimiento de las células cancerígenas a una concentración de 2 mg/mL. Sin embargo, se encontró que el extracto de microalgas disminuyó el 60% la viabilidad celular a la concentración de 5 mg/mL. Estos resultados muestran que el extracto de microalgas usado por Somasehkar et al. (2016) es una concentración 5 veces mayor que las concentraciones del extracto metanólico evaluado en este trabajo con *P. cruentum*. Por lo anterior, hace evidente que el extracto metanólico de *P. cruentum* presenta una potencial aplicación anticancerígena.

El obtener bajos porcentajes de actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana depende de la naturaleza de los compuestos presentes en el extracto metanólico de *P. cruentum*, los cuales, fueron extraídos con metanol, solvente de naturaleza polar utilizado comúnmente para la extracción de lípidos y ácidos grasos (Ramos et al., 2020). Por lo anterior, se evaluó la composición de ácidos grasos de la biomasa de *P. cruentum*, para conocer el porcentaje de su composición y conocer que posibles compuestos que se encuentran en el extracto metanólico de *P. cruentum*. Los resultados mostraron que la biomasa de *P. cruentum* evaluada en este trabajo se compone en un 73.3% de ácidos grasos saturados, los cuales no son comúnmente aplicados en el área biomédica. Siendo los ácidos grasos poliinsaturados aquellos que han demostrado tener actividad antioxidante, antimicrobiana y anticancerígena (Conde et al., 2022). *P. cruentum* acumula grandes cantidades de lípidos, especialmente ácido araquidónico (C20:4n6 ARA) (acumulado en un 36% de ácidos grasos totales) y cantidades notables de ácido eicosapentaenoico (C20:5n3 EPA) (Reboloso et al., 2000). En el trabajo realizado por Asgharpour et al. (2015) se observó que la temperatura, la intensidad de luz y las concentraciones de nitrato suministrado al cultivo influyen directamente en la producción de ácidos grasos. Estos autores indican que obtuvieron 33% de ácidos grasos saturados, 5.4% de ácidos grasos monoinsaturados y 55.2% de ácidos grasos poliinsaturados a una temperatura de 20 °C y una irradiancia de 140 mol/m²/s. Además, la proporción de EPA aumentó considerablemente cuando se redujo la intensidad de luz, mientras que ARA incrementó ligeramente de 23.4 % a 23.9%. Un resultado similar se encontró por Akimoro et al. (1998), quienes observaron que existió un incremento en la producción de ARA y EPA de *P. cruentum* al disminuir la intensidad de luz, y mantener el cultivo a una temperatura de 30 °C. En el presente trabajo, se obtuvo un porcentaje de ácidos grasos insaturados mayor a los reportados comúnmente para la especie *P. cruentum*, lo que podría indicar estrés en el cultivo. Los valores del contenido de ácidos grasos insaturados pudieron influir al evaluar las diferentes bioactividades (antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante y anticancerígena).

Se realizó un análisis del extracto metanólico de *P. cruentum* mediante FTIR, lo que permitió identificar diferentes vibraciones en los grupos funcionales de las moléculas presentes en el extracto evaluado, al ser excitadas a distintas frecuencias o número de onda (Monsoor et al., 2001). La estructura de los ácidos grasos está compuesta por una cadena hidrocarbonada lineal, que se caracteriza por la presencia de un grupo carboxilo. La fórmula básica de una molécula de ácido graso saturado es $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ (Drabløs et al., 2004). Con respecto a los componentes de los ácidos grasos, en la guía de interpretación de espectros infrarrojo por Monsoor et al. (2001) se indica que en la banda de absorción espectral a una frecuencia de $1700-1725 \text{ cm}^{-1}$ se detectan la vibración de estiramiento del enlace $\text{C}=\text{O}$ del ácido carboxílico. En la banda de $2915-2935 \text{ cm}^{-1}$ se detecta la vibración de estiramiento del enlace $\text{C}-\text{H}$ para CH_2 . Mientras que en la banda de $2950-2970 \text{ cm}^{-1}$ se detecta el enlace $\text{C}-\text{H}$ para el metilo CH_3 . En los resultados obtenidos con el FTIR con el extracto metanólico de *P. cruentum*, se detectaron bandas de vibración de $1031, 1731, 2148, 2850$ y 2900 cm^{-1} , lo que indica la presencia de ácidos grasos. Mientras que, el perfil de ácidos grasos evaluado por cromatografía de gases para *P. cruentum*, mostró una mayor proporción de ácidos grasos saturados. Diversos estudios muestran que los ácidos grasos que tienen actividad antimicrobiana son los poliinsaturados (Deniz et al., 2017; Alsenani et al., 2020). Es posible que debido al alto contenido de ácidos grasos saturados evaluados en la biomasa de *P. cruentum*, éstos influyeron en los resultados obtenidos en la falta de actividad antimicrobiana, baja actividad antioxidante y antiinflamatoria, ya que hasta donde se conoce, no se ha reportado el uso de ácidos grasos saturados con estas bioactividades.

Capítulo 5. Conclusiones

Al realizar la caracterización de las tres especies de microalgas evaluadas: *S. elongatus*, *P. cruentum* y *A. lemermannii*, la especie que presentó una mayor productividad de biomasa fue *A. lemermannii*.

Al realizar las evaluaciones de viabilidad celular en la línea celular L929 (fibroblastos de ratón), los extractos metanólicos fueron seleccionados debido a su compatibilidad con los fibroblastos de ratón. Sin embargo, a las concentraciones utilizadas en el ensayo, no se presentó actividad antioxidante ni antiinflamatoria, y los extractos no presentaron actividad antimicrobiana contra las bacterias: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*.

El extracto metanólico de *P. cruentum* incrementó la liberación de citocinas proinflamatorias en las células NASH a las concentraciones 0.3 mg/mL y 0.6 mg/mL.

El extracto metanólico de *P. cruentum* disminuyó el crecimiento de células de cáncer pancreático (BxPC-3) lo que muestra una potencial aplicación anticancerígena.

Literatura citada

- Ahangari, Z., Naseri, M., Yadegari, Z., Nakhaee, M., Najafi, F., Feli, M. 2022. Comparative evaluation of the viability of L929 murine fibroblasts in the presence of different concentrations of propolis with and without vitamin C as a storage medium for avulsed teeth. *Journal of Dental Materials and Techniques*, 11(4), 240-248.
- Akimoto, M., Shirai, A., Ohtaguchi, K., Koide, K. 1998. Carbon dioxide fixation and polyunsaturated fatty acid production by the red alga *Porphyridium cruentum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 73(2), 269-278. <https://doi.org/10.1007/BF02785661>
- Alsenani, F., Tupally, K. R., Chua, E. T., Eltanahy, E., Alsufyani, H., Parekh, H. S., Schenk, P. M. 2020. Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. *Saudi Pharmaceutical Journal*. doi:10.1016/j.jsps.2020.11.010
- Asgharpour, M., Rodgers, B., Hestekin, J. 2015. Eicosapentaenoic acid from *Porphyridium Cruentum*: Increasing growth and productivity of microalgae for pharmaceutical products. *Energies*, 8(9), 10487–10503. doi:10.3390/en80910487
- Balouri, M., Sadiki, M., Ibensouda, S.K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6, 71-19. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005
- BASF. 2019. Kolliphor® EL. Technical information, 03_111139e-04, 1-5. Recuperado el 19 de junio del 2020, de <https://pharma.basf.com/products/kolliphor-el>
- Baum, C. L., Arpey, C. J. 2006. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatologic Surgery*, 31(6), 674–686. doi:10.1111/j.1524-4725.2005.31612
- Bhagavathy, S., Sumathi, P., Jancy Sherene Bell, I. 2011. Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1), S1–S7. doi:10.1016/s2221-1691(11)60111-1.
- Bhattacharjee, M. 2016. Pharmaceutically valuable bioactive compounds of algae. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(6), 43. doi:10.22159/ajpcr.2016.v9i6.1450
- Blais Y, Gingras S, Haagensen DE, Labrie F, Simard J. 1996. Interleukin-4 and interleukin-13 inhibit estrogen-induced breast cancer cell proliferation and stimulate GCDPF-15 expression in human breast cancer cells. *Mol. Cell Endocrinol*. 121:11–18
- Briukhovetska, D., Dörr, J., Endres, S., Libby, P., Dinarello, C. A., Kobold, S. 2021. Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nature Reviews Cancer*, 21(8), 481–499. doi:10.1038/s41568-021-00363-z
- Caldwell, M. D. 2020. Bacteria and antibiotics in wound healing. *Surgical Clinics*, 100(4), 757-776.
- Cárdenas-Carreón, A. A. 2019. Desarrollo y evaluación in vitro de andamios a base de colágeno y compuestos fitoquímicos para cicatrización. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 91 pp.

- Casas-Arrojo, V., Decara, J., de los Ángeles Arrojo-Agudo, M., Pérez-Manríquez, C., Abdala-Díaz, R. T. 2021. Immunomodulatory, antioxidant activity and cytotoxic effect of sulfated polysaccharides from *Porphyridium cruentum* (SF Gray) Nägeli. *Biomolecules*, 11(4), 488.
- Casian-González, K. 2020. Bioprospección de microalgas con potencial para la producción de biodiesel. (Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada). <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3327>
- Chang, H. Y. 2002. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 12877–12882.
- Conde, T., Lopes, D., Łuczaj, W., Neves, B., Pinto, B., Maurício, T., Domingues, M. R. 2022. Algal lipids as modulators of skin disease: a critical review. *Metabolites*, 12(2), 96.
- De Morais, M. G., Vaz, B. da S., de Morais, E. G., Costa, J. A. V. 2015. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *BioMed Research International*, 2015, 1–15. doi:10.1155/2015/835761
- Deng, X., Chen, B., Xue, C., Li, D., Hu, X., Gao, K. 2019. Biomass production and biochemical profiles of a freshwater microalga *Chlorella kessleri* in mixotrophic culture: Effects of light intensity and photoperiodicity. *Bioresource Technology*, 273, 358-367
- Deniz, I., García-Vaquero, M., Imamoglu, E. 2017. Trends in red biotechnology: Microalgae for pharmaceutical applications. En *Microalgae-based Biofuels and Bioproducts*, 429-460 pp. Woodhead Publishing <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00018-2>
- Drabløs, F., Feyzi, E., Aas, P. A., Vaagbø, C. B., Kavli, B., Bratlie, M. S., Krokan, H. E. 2004. Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair*, 3(11), 1389–1407. doi:10.1016/j.dnarep.2004.05.004
- Dring, M. J. 2005. Stress resistance and disease resistance in seaweeds: the role of reactive oxygen metabolism. *Advances in Botanical Research*, 175–207. doi:10.1016/s0065-2296(05)43004-9
- Escárrega-Payán, E. A. 2019. Evaluación del efecto inhibitorio en la proliferación de líneas celulares de cáncer pancreático, usando componentes proteicos de caracoles de la familia *Conidae*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 83 pp.
- Fátima, N., Ahmad, I. Z., Chaudhry, H. 2017. Alterations in the antibacterial potential of *Synechococcus* spp. PCC7942 under the influence of UV-B radiations on skin pathogens. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(7), 1657-1662.
- Fogg, G.E., B. Thake. 1987. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. University of Wisconsin Press. Wisconsin. 259 pp.
- Fu, W., Nelson, D. R., Mystikou, A., Daakour, S., Salehi-Ashtiani, K. 2019. Advances in microalgal research and engineering development. *Current Opinion in Biotechnology*, 59, 157–164. doi:10.1016/j.copbio.2019.05.013
- Gerlier, D., Thomasset, N. 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods*, 94(1-2), 57–63. doi:10.1016/0022-1759(86)90215-2

- González-Davis, O. 2010. Bioprospección de cianobacterias y microalgas como agentes de biocontrol contra *Vibrio campbellii* M1 y su uso en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 107 pp.
- González-Muñoz, J. A. 2006. Evaluación del crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae), cultivada con medio F/2 y fertilizantes agrícolas. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 64 pp.
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., Gião, M. S., Malcata, F. X. 2013. Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteria. *Food Chemistry*, 138(1), 638–643. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.106
- Guedes, A. C., Meireles, L. A., Amaro, H. M., Malcata, F. X. 2010. Changes in lipid class and fatty acid composition of cultures of *Pavlova lutheri*, in response to light intensity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(7), 791–801. doi:10.1007/s11746-010-1559-0
- Guillard, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, Nueva York. 29-60 pp. doi: 10.1007/978-1-4615-8714-9_3
- Gürlek, C., Yarkent, Ç., Köse, A., Tuğcu, B., Gebeloğlu, I. K., Öncel, S. Ş., Elibol, M. 2020. Screening of antioxidant and cytotoxic activities of several microalgal extracts with pharmaceutical potential. *Health and Technology*, 10(1), 111-117
- Hannan, R. T., Peirce, S. M., Barker, T. H. 2018. Fibroblasts: Diverse cells critical to biomaterials integration. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 4(4), 1223–1232.
- Harrison, S. A., Kadakia, S., Lang, K. A., Schenker, S. 2002. Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium. *The American Journal of Gastroenterology*, 97(11), 2714-2724. [https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(02\)05486-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(02)05486-2)
- Harun, R., Singh, M., Forde, G. M., Danquah, M. K. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(3), 1037–1047. doi:10.1016/j.rser.2009.11.004
- Hassoun-Kheir, N., Stabholtz, Y., Kreft, J.-U., de la Cruz, R., Romalde, J. L., Nesme, J., Paul, M. 2020. Comparison of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: A systematic review. *Science of The Total Environment*, 140804. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.1408
- Hussein, H. A., Syamsumir, D. F., Radzi, S. A. M., Siong, J. Y. F., Zin, N. A. M., Abdullah, M. A. 2020. Phytochemical screening, metabolite profiling and enhanced antimicrobial activities of microalgal crude extracts in co-application with silver nanoparticle. *Bioresources and Bioprocessing*, 7(1), 1-17.
- Imran Bashir, K. M., Lee, J. H., Petermann, M. J., Shah, A. A., Jeong, S. J., Kim, M. S., Cho, M. G. 2018. Estimation of antibacterial properties of chlorophyta, rhodophyta and haptophyta microalgae species. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 46(3), 225-233. <https://doi.org/10.4014/mbl.1802.02015>

- Kalluri, R. 2016. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16(9), 582–598. doi:10.1038/nrc.2016.73
- Kavoosi, G., Amirghofran, Z. 2016. Chemical composition, radical scavenging and anti-oxidant capacity of *Ocimum basilicum* essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 29(2), 189–199. doi:10.1080/10412905.2016.1213667
- Khavari, F., Saidijam, M., Taheri, M., Nouri, F. 2021. Microalgae: therapeutic potentials and applications. *Molecular Biology Reports*. doi:10.1007/s11033-021-06422-w
- Kok, Y. Y., Chu, W. L., Phang, S. M., Mohamed, S. M., Naidu, R., Lai, P. J., Khoo, A. S. B. 2011. Inhibitory activities of microalgal extracts against Epstein-Barr virus DNA release from lymphoblastoid cells. *Journal of Zhejiang University Science B*, 12(5), 335-345.
- Kumar, J., Singh, D., Tyagi, M. B., Kumar, A. 2019. Cyanobacteria: Applications in biotechnology. In *Cyanobacteria*. Academic Press, pp 327-346. doi:10.1016/B978-0-12-814667-5.00016-7
- Kusmiyatli, K., Agustini, N. W. S. 2007. Antibacterial activity assay from *Porphyridium cruentum* microalgae. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 8(1). doi:10.13057/biodiv/d080110
- Lacueva-Arnedo, M. 2017. Resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus*. Evolución y perspectiva actual. Tesis de Maestría. Universidad Complutense de Madrid. 21 pp.
- Lai, P. J., Chu, W. L., Naidu, R., Khoo, A. S. B., Kok, Y. Y., Shar, M. M., Phang, S. M. 2008. Antiproliferative activity of microalgal extracts on nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells. *Malaysian Journal of Science*, 27(2), 19-31.
- Levy-Ontman, O., Huleihel, M., Hamias, R., Wolak, T., Paran, E. 2017. An anti-inflammatory effect of red microalga polysaccharides in coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis*, 264, 11-18.
- Liu, J., Xiao, J., Li, F., Shi, Y., Li, D., Huang, Q. 2018. Chitosan-sodium alginate nanoparticle as a delivery system for H-polylysine: preparation, characterization and antimicrobial activity. *Food Control*. 91, 302-310. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.04.020
- Maadane, A., Merghoub, N., Mernissi, N. E., Ainane, T., Amzazi, S., Bakri, I. W. 2021. Antimicrobial activity of marine microalgae isolated from Moroccan coastlines. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 1257-1260. doi: 10.15414/jmbfs.2017.6.6.1257-1260
- Madhyastha, H. K., Sivashankari, S., Vatsala, T. M. 2009. C-phycocyanin from *Spirulina fussiformis* exposed to blue light demonstrates higher efficacy of in vitro antioxidant activity. *Biochemical Engineering Journal*, 43(2), 221–224. doi:10.1016/j.bej.2008.11.001
- Magro, F. G., Freitag, J. F., Bergoli, A., Cavanhi, V. A. F., Colla, L. M. 2021. Microalgae consortia cultivation using effluents for bioproduct manufacture. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 20(3), 865–886. doi:10.1007/s11157-021-09587-9
- Markou, G., Nerantzis, E. 2013. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1532–1542. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.07.

- Matsui, M. S., Muizzuddin, N., Arad, S., Marenus, K. 2003. Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. *Applied Biochemistry Biotechnology* 104(1), 13-22. doi: 10.1385/ABAB:104:1:13
- McCauley, J. I., Ortega, J. S., Gentile, C., Ralph, P. J. 2022. Microalgal applications in biomedicine and healthcare. En: *Algae-Based Biomaterials for Sustainable Development*. Elsevier, pp. 133-156. doi:10.1016/B978-0-323-96142-4.00012-9
- Mentink-Kane, M. M., Wynn, T. A. 2004. Opposing roles for IL-13 and IL-13 receptor alpha2 in health and disease. *Immunological Reviews*, 202(1), 191–202. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00210.x
- Metcalfe, L. D., Schmitz, A. A., Pelka, J. R. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, 38(3), 514–515. doi:10.1021/ac60235a044
- Miazek, K., Kratky, L., Sulc, R., Jirout, T., Aguedo, M., Richel, A., Goffin, D. 2017. Effect of organic solvents on microalgae growth, metabolism and industrial bioproduct extraction: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1429. doi:10.3390/ijms18071429
- Michalak, I., Chojnacka, K. 2015. Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Sciences*, 15(2), 160–176. doi:10.1002/elsc.201400191
- Miguel, S. P., Ribeiro, M. P., Otero, A., Coutinho, P. 2021. Application of microalgae and microalgal bioactive compounds in skin regeneration. *Algal Research*, 58. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2211926421002149>.
- Mishra, B., Tiwari, A. 2021. Cultivation of *Anabena variabilis*, *Synechococcus elongatus*, *Spirulina platensis* for the production of C-Phycocyanin, C-Phycocerythrin and *Thalassiosira*, *Skeletonema*, *Chaetoceros* for fucoxanthin. *Syst Microbiol and Biomanuf* 1, 356–361. doi: 10.1007/s43393-020-00020-w
- Monsoor, M., Kalapathy, U., Proctor, A. 2001. Determination of polygalacturonic acid content in pectin extracts by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 74(2), 233–238. doi:10.1016/s0308-8146(01)00100-5
- Moreno-Garrido, I. 2008. Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology*, 99(10), 3949–3964. doi:10.1016/j.biortech.2007.05.04
- Najdenski, H. M., Gigova, L. G., Iliev, I. I., Pilarski, P. S., Lukavský, J., Tsvetkova, I. V., Kussovski, V. K. 2013. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(7), 1533-1540.
- Niccolai, A., Bigagli, E., Biondi, N., Rodolfi, L., Cinci, L., Luceri, C., Tredici, M. R. 2016. In vitro toxicity of microalgal and cyanobacterial strains of interest as food source. *Journal of Applied Phycology*, 29(1), 199–209. doi:10.1007/s10811-016-0924-2.
- Noaman, M. N. 2004. Effect of potassium and nitrogen fertilizers on the growth and biomass of some halophytes grown under high levels of salinity. *Journal of Agronomy*, 3(1), 25–30.
- Nouri, A.M., Thompson C., Cannell, H., Symes M., Purkiss S., Amirghofran Z. 2000. Profile of epidermal growth factor receptor (EGFr) expression in human malignancies: effects of exposure to EGF and

- its biological influence on established human tumor cell lines. *International Journal Molecular Medicine*, 6, 495–500. doi: 10.3892/ijmm.6.4.495
- Priyadarshani, I. Rath, B. 2012. Commercial and industrial applications of micro algae—a review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(4), 89–100.
- Ramos, L. F., Soto, A. R., Huaynate, A. I. O., Gallegos, M. A. C. 2020. Extracción e identificación de lípidos polares de las microalgas *Nannochloropsis oceanica* y *Desmodesmus asymmetricus*. *Revista Colombiana de Química*, 49(2), 3-11.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical Biology and Medicine*, 26 (9-10), 1231-1237. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Reboloso Fuentes, M. 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*, 70(3), 345–353. doi:10.1016/s0308-8146(00)00101-1
- Renugadevi, K., Nachiyar, V. C., Zaveri, M. 2021. Bioactivity of dodecanoic acid extracted from *Geitlerinema* spp. TRV57. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 55(1), 224-231.
- Román, R. B., Alvarez-Pez, J. M., Fernández, F. A., Grima, E. M. 2002. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*, 93(1), 73-85.
- Rubio-Elizalde, I., Bernáldez-Sarabia, J., Moreno-Ulloa, A., Vilanova, C., Juárez, P., Licea-Navarro, A., Castro-Ceseña, A. B. 2019. Scaffolds based on alginate-PEG methyl ether methacrylate-*Moringa oleifera*-*Aloe vera* for wound healing applications. *Carbohydrate Polymers*, 206, 455-467. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.11.027
- Rudic, V., Cepoi, L., Rudi, L., Chiriac, T., Nicorici, A., Todosichiuc, A., Gutsul, T. 2011. Synthesis of CdSe nanoparticles and their effect on the antioxidant activity of *Spirulina platensis* and *Porphyridium cruentum* cells. In *Nanotechnologies and Biomedical Engineering* (pp. 354-356).
- Ruiz-Güereca, D. A., Licea-Navarro, A. F., Sánchez-Saavedra, M. 2019. Evaluación de la actividad antimicobacteriana de microalgas dulceacuícolas y marinas. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 54(1), 82-90.
- Saito, S., Nakashima, A., Shima, T., Ito, M. 2010. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(6), 601-610. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x
- Sánchez-Saavedra, M.P., Licea-Navarro, A., Bernáldez-Sarabia, J. 2010. Evaluation of the antibacterial activity of different species of phytoplankton. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45(3), 531-536.
- Seddek, N. H., Fawzy, M. A., El-Said, W. A., Ahmed, M. M. R. 2019. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and characterization of bioactive substances from freshwater blue-green algae. *Global Nest Journal*, 21, 328-336.
- Shanab, S. M., Mostafa, S. S., Shalaby, E. A., Mahmoud, G. I. 2012. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(8), 608-615.

- Sharma, J. N., Al-Omran, A., Parvathy, S. S. 2007. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, 15(6), 252-259.
- Singh, A., Nigam, P. S., Murphy, J. D. 2011. Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology*, 102(1), 10–16. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.031
- Skjånes, K., Rebours, C., Lindblad, P. 2012. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(2), 172–215. doi:10.3109/07388551.2012.681625
- Soltani, N., Latifi, A. M., Alnajjar, N., Dezfulian, M., Shokarvi, S., Heydari, M., Choopani, A. 2016. Biochemical and physiological characterization of tree microalgae spp. as candidates for food supplement. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 3(1), 377-381.
- Somasekharan, S. P., El-Naggar, A., Sorensen, P. H., Wang, Y., Cheng, H. 2016. An aqueous extract of marine microalgae exhibits antimetastatic activity through preferential killing of suspended cancer cells and anticolony forming activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2016/9730654
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. En: J. Stein (Ed.). *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, pp. 321-344.
- Suh, S. S., Hong, J. M., Kim, E. J., Jung, S. W., Kim, S. M., Kim, J. E., Kim, S. 2018. Anti-inflammation and anti-cancer activity of ethanol extract of antarctic freshwater microalga, *Micractinium* sp. *International Journal of Medical Sciences*, 15(9), 929. doi: 10.7150/ijms.26410.
- Tannin-Spitz, T., Bergman, M., van-Moppes, D., Grossman, S., Arad, S. Malis. (2005). Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *Journal of Applied Phycology*, 17(3), 215–222. doi:10.1007/s10811-005-0679-7
- Tredici, M. R., Biondi, N., Ponis, E., Rodolfi, L., Zittelli, G. C. 2009. Advances in microalgal culture for aquaculture feed and other uses. *New technologies in aquaculture* (pp. 610-676). Woodhead Publishing. doi:10.1533/9781845696474.3.610.
- Werner, G. H., Jolles, P. 1996. Immunostimulating agents: What Next?. A review of their present and potential medical applications. *European Journal of Biochemistry*, 242(1), 1–19. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0001r.x
- Wilkinson, H. N., Hardman, M. J. 2020. Wound healing: Cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology*, 10(9). Recuperado de: <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsob.200223>.
- Yap, B. H., Crawford, S. A., Dumsday, G. J., Scales, P. J., Martin, G. J. 2014. A mechanistic study of algal cell disruption and its effect on lipid recovery by solvent extraction. *Algal Research*, 5, 112-120.
- Yilmas, F. F., Demirel, Z., Karabay-Yavasoglu, N. U., Ozdemir, G., Meltem, C. D. 2017. Antimicrobial and antioxidant activities of *Porphyridium cruentum*. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, (1), 1-7.

- You, T., Barnett, S. M. 2004. Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochemical Engineering Journal*, 19(3), 251-258.
- Zertuche-Arias, T. 2021. Desarrollo y evaluación in vitro de hidrogeles con actividad antioxidante para su aplicación en la regeneración ósea. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 65 pp.
- Zhang, X., Shu, W., Yu, Q., Qu, W., Wang, Y., Li, R. 2020. Functional biomaterials for treatment of chronic wound. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 516. Recuperado de: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00516/full>.
- Zhuang, D., He, N., Khoo, K. S., Ng, E. P., Chew, K. W., Ling, T. C. 2021. Application progress of bioactive compounds in microalgae on pharmaceutical and cosmetics. *Chemosphere*, 132932. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.132932