



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

"Caracterización biológica y estructural de pigmentos obtenidos por optimización de la microalga *Navicula incerta* bajo diferentes condiciones de cultivo"

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

M.C. Ricardo Iván González Vega

Hermosillo, Sonora

Enero de 2021

APROBACIÓN

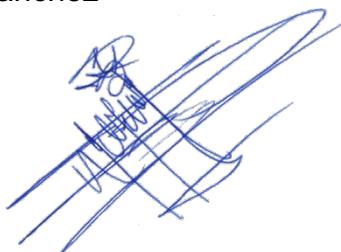
“Caracterización biológica y estructural de pigmentos obtenidos por optimización de la microalga *Navicula incerta* bajo diferentes condiciones de cultivo”

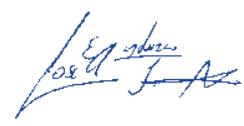
Ricardo Iván Glez Vega

M.C. Ricardo Iván González Vega


Dra. Carmen Lizette Del Toro Sánchez
Directora de tesis


Dr. Francisco Javier Cinco Moroyoqui
Secretario


Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
Sinodal


Dr. José Antonio López Elías
Secretario


Dr. Saúl Ruiz Cruz
Sinodal

Hermosillo, Sonora

Enero de 2021

Hermosillo, Sonora a 8 de enero de 2021.

Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada **“Caracterización biológica y estructural de pigmentos obtenidos por optimización de la microalga *Navicula incerta* bajo diferentes condiciones de cultivo”**, en los sucesivo LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de **Doctor en Ciencias de los Alimentos**, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

A T E N T A M E N T E



LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA

Ricardo Iván Glez Vega

Ricardo Iván González Vega

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar un trabajo tan importante como lo es un proyecto de tesis doctoral, lleno de dificultades es inevitable que te aborde un sentimiento muy humano de egocentrismo que lleva al alumno a concentrar la mayor parte del mérito en el aporte que ha realizado. No obstante, cuando se analiza objetivamente todo el camino recorrido te das cuenta de forma inmediata que la magnitud del aporte hubiese sido imposible sin el apoyo y participación de un grupo muy extenso de personas e instituciones, así como diversos departamentos que te han abierto las puertas, facilitando el material y conocimientos para culminar satisfactoriamente el trabajo de tesis. Es por ello, que aprovecho este espacio para ser justo y resaltar el profundo agradecimiento a todas las personas involucradas en este proyecto, porque este proyecto ha sido una colaboración de un grupo reconocido de personas. Gracias.

Un agradecimiento muy especial y sincero a la **Dra. Carmen Lizette Del Toro** por aceptarme y tenerme la confianza para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Su apoyo, conocimiento y confianza en el proyecto y su capacidad para guiar mis ideas por buen camino, ha sido un pilar invaluable, no sólo en esta tesis, sino también en mi formación como investigador y director de tesis. Es una persona que considero más allá de mi directora, es mi mentora, ayudó a forjar mi carácter, psicóloga y terapeuta; por escuchar tanto mis problemas personales, emocionales como académicos. Agradezco el tiempo y esfuerzo invertido, no solo para la realización de este proyecto de tesis, sino también, cuando la he necesitado, ayudándome cuando y donde fuese necesario. Me permito expresar que me siento como su “clon” con todo respeto, ya que aplico todas las estrategias y dinámicas que he aprendido de usted para la formación y dirección de mis alumnos de licenciatura y maestría. Gracias por aguantar mis ideas de hacer más y más cosas, y mi forma tan hiperactiva de querer trabajar. Así mismo, las ideas propias por haberme facilitado siempre los medios para llevar a cabo mis ideas locas en el laboratorio durante el desarrollo de esta tesis. Siempre enmarcadas bajo su orientación que han sido clave del excelente trabajo que

desarrolla, con la cual no se habría concebido sin su siempre oportuna participación.
GRACIAS.

Agradezco de manera especial al **Dr. José Antonio López Elías** por permitir que esta tesis se desarrollara en el marco de un proyecto de colaboración entre su grupo de investigación del laboratorio de acuicultura y el grupo de investigación de la **Dra. Liz. Del Toro**. Un profundo agradecimiento por su amabilidad y disponibilidad durante mis estancias en su grupo, durante las cuales tuve todo el apoyo y soporte a nivel personal y profesionales de todo las personas del laboratorio par lograr los objetivos perseguidos. Gracias por dejarme trabajar a su lado y por contribuir en gran parte a mi formación profesional y humana. Tantos años de amistad no se pueden expresar con palabras, pero desde que fui su estudiante de servicio social, tesista de licenciatura, y sinodal de tesis de doctorado, para mi ha sido un guía muy importante para mi formación como investigador. Gracias por ser mi guía durante todo este tiempo, acompañarme, apoyo y tener la paciencia que siempre valoraré, principalmente por creer en mi y en mi trabajo. Gracias por haberme dado el último empujón, mis más sincero reconocimiento. Espero haya cambiado su perspectiva de mi, de aquel muchacho “emo” que llegó un día a pedir servicio social hasta el día de hoy. Gracias.

A mis sinodales, los **Doctores Saúl Ruiz Cruz, Francisco Javier Cinco Moroyoqui y Dr. Ramón Enrique Zepeda Robles** por permitir que esta tesis se desarrollara en colaboración entre grupos de investigación diferentes. Agradecer su amabilidad y disponibilidad durante las diferentes estancias en sus respectivos laboratorios, ya sean dentro de la Universidad de Sonora como del Instituto Tecnológico de Sonora. Muchas gracias por permitirme participar en una experiencia tan placentera e importante para mi formación como investigador. La disponibilidad y generosidad para compartir su experiencia y amplio conocimiento sobre el curso que tomó este proyecto. El aporte y colaboración individual fue de gran ayuda durante mi estancia en sus laboratorios. Agradeciendo la atención brindada en las rápidas respuestas a las diferentes inquietudes surgidas que se ven reflejadas en los resultados de este proyecto.

Al **Dr. Ramón Alfonso Moreno Corral** del **Departamento de Polímeros y Materiales** por su siempre atenta y efectiva colaboración, durante mi visita a su laboratorio y, en general, durante toda la parte de caracterización espectroscópica de los compuestos que se estudiaron en este proyecto. Su paciencia y experiencia nos permitió obtener resultados a priori difícilmente alcanzables. Por su amabilidad y amistad brindada mis más sincero agradecimiento.

Al **Dr. José Luis Cárdenas López** por el tiempo y conocimientos brindados en la parte más fuerte de una investigación, el análisis de estadístico y diseño de experimentos. Hizo que despertara un profundo cariño por la estadística aplicada y me alentó a seguir profundizando. Su participación es muy significativa ($p < 0.000001$).

A los **Doctores Francisco Wong Corral** y **Jesús Borboa** por el apoyo logístico y de amistad brindada incondicionalmente en la realización de mi tesis de Doctorado.

Para todos los miembros del **Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos**: Primeramente y no puede faltar el agradecimiento a **Coty y Gloria**, por aguantarme otros 4 años más de doctorado. Profesores, compañeros, amigos y personal administrativo

Agradecimientos a **todos mis amigos** que no podré mencionar porque, realmente son muchas amistades las que he cosechado en estos últimos años y se extendería demasiado la lista. No los olvidé están incluidos en cada decisión que he tomado y en cada resultado de este proyecto. Cuyos consejos me permitieron dar los primeros pasos en mi carrera profesional y personal, un paso a la vez, con tropiezos o sin tropiezos estuvieron conmigo en cada instante que los necesité. Se han convertido en una base sólida de con los cuales afrontaré el futuro y reforzaré mi presente.

Un agradecimiento muy especial y merecido al grupo de investigación al cual pertenezco. A mi **familia académica “Antioxidantes team”** con quienes compartí risas, lagrimas y discusiones de carácter científico, generalmente enriquecedoras, la

calidad de personas que son. Muchas Gracias. A la Dra. Liz, Dra. Aline, Lily, Mafer, Isabel, Fátima, Raquel, Andrea, Alejandra, Sofía, Benito, Diana y Daniela.

A los **caballeros de la materia gris gris gris: Rueda, Encinas y Claudia**. Y no podría faltar el niño rata (yo). Por ser parte de mis mejores amigos, brindarme cachetadas cuando las necesité y su apoyo en toda mi trayectoria. Y que dios se apiade de nosotros!!.

A mis **compañeros de generación**, por compartir su amistad, compañerismo, conocimientos y sufrimientos durante la estancia en el posgrado. **Liliana Maribel Perez-Perez, José Jesús Encinas-Arzate, Luz Raquel Bourne-Murrieta, Fátima Rocío Méndez-Mayboca, Mariela Menchaca-Armenta y Daniel Valenzuela**.

A mis **amigos y compañeros del laboratorio de acuicultura**, por soportarme y compartir el tiempo, festejos y emociones. **Maestro Álvaro, Diana Fimbres, Rubria, Jonathan, AnaLu, Emmanuel, Diana medina, Angélica, Perla, Norma, MariLu y José Luis**.

A mis **amigos**, por compartir conmigo emociones, risas, angustias, tiempo y conocimientos. **Samara, Emma, Rocío, Rose, Brisa, Ana Gaby, Alfonso, Sra. de Gertrudis (Odie), Isabel, Cadena, Machuy, Ale, Karo, Aaron, Chang, teresita y Viviana**. Si alguien faltó, siga participando.

A mis alumnos de servicio social, estancia de investigación, licenciatura y maestría un profundo agradecimiento por su amistad; depositar su confianza en mi para su desarrollo profesional: **Rubria, Diana, Daniela, Andrea, Alejandra, Sofía, Benito, Jesús y Jonathan**.

Agradecimiento especial al conejo más importante en mi vida **Valeria Gándara Ledezma** por su apoyo y cariño incondicional durante casi tres años en mi estancia

doctoral. Te considero como una de mis mejores amigas y espero conservar nuestra amistad hasta que el tiempo nos separe.

Agradecimientos especiales a mis mejores amigos. A **Sara Dennis, Charly y Wendy** a quien conozco sus inicios de sus carreras. A quienes estimo mucho. Se han convertido en todos unos profesionistas durante todo este tiempo. Además, constituyen una parte muy importante de mi.

Agradecimientos muy especiales. El tiempo para conocer a una persona nunca es suficiente. Sin embargo, hay ocasiones que en poco tiempo se toma mucho cariño y confianza. El tiempo para tener una amistad es relativo y lo que importa es la calidad del tiempo que se convive: **Fernando (Georgy), Lorenzo y César.**

Gracias a mi familia por ser los promotores de mis sueños, muchas gracias por cada día confiar en mi y creer en mis expectativas. Gracias a mis padres por ser como un oasis en el desierto donde encontraba confort cuando me sentía perdido. Por su anhelo de mejorar mi vida, por sus consejos y cada una de sus palabras de aliento. Gracias a Dios por conservar a mis padres cerca de mi y darme fuerza durante todos estos años para brincar y pasar todos los obstáculos físicos y psicológicos que he cursado. Gracias a la vida por subir un escalón más. La conciencia es otro estado de la materia que se alberga en cada uno de nosotros y florece para ser mejores personas cada día. Nos pone a reflexionar sobre la vida que llevamos, la vida pasada y futura.

Finalmente, sólo me queda agradecer a todas las instituciones, centros de investigación y departamentos que prestaron sus instalaciones para la realización de este proyecto. A la **Universidad de Sonora**, así como los **Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos**, al **departamento de Ciencias de la Salud**, al **Centro de Investigación e Innovación Biotecnológica, Agropecuaria y Ambiental**, por proporcionarme un espacio para la realización de una parte de la tesis doctoral con la ayuda del Dr. Saúl Ruiz Cruz y su grupo de trabajo. Al **Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora**, por

proporcionar el espacio para realizar la parte del estudio de cultivo de almeja. Así como al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por haber financiado mis estudios tanto de maestría como de doctorado otorgándome una beca de manutención.



**Espero seguir cosechando conocimiento, colaboradores,
experiencia y lo más importante en la vida, amistades**

“Lo que conocemos es una gota y lo que ignoramos un océano”

Autor: Dark

DEDICATORIA

*A Dios, gracias por prestarme vida y permitirme alcanzar el máximo grado académico
en mi vida profesional.*

A mi familia, por su apoyo incondicional durante todo este tiempo.

*José Luis y Mayela. Con respeto y profundo agradecimiento, por su apoyo, su
confianza y por creer en mí. Los quiero mucho.*

*José Luis y Nidia. Los mejores hermanos, por apoyarme y porque siempre están ahí
para mí, ya sea para molestarme o para pasar un buen rato, con todo el cariño de
siempre.*

Petra Vega. A mi abuela, Gracias por todo.

*A mi sobrina Axel por ser la primer persona a quien saluda antes que a todos y por
sus extrañas pero agradables conversaciones.*

*A mis mejores amigos con profundo cariño. Soy afortunado por contar con el apoyo,
cariño y comprensión incondicional que me han brindado todos ustedes, tanto en mi
vida personal como profesional lo mejor para cada uno de ustedes, los quiero mucho.*



“De tenebris lux non est in praesidio”

CONTENIDO

	Página
APROBACIÓN	i
DERECHOS DE AUTOR	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	ix
CONTENIDO	x
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABLAS	xvi
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	7
Generalidades de las microalgas.....	7
Optimización estadística para la producción de pigmentos.....	9
Estudios recientes sobre <i>Navicula incerta</i>	11
Principales pigmentos de las microalgas.....	11
Ficobilinas.....	12
Clorofila.....	12
Carotenoides.....	15
Función fisiológica de los pigmentos en las microalgas.....	17
Prevención de Enfermedades Crónicas no Transmisibles (ECNT)	18
Actividades biológicas de los pigmentos de microalgas.....	19
Actividad antioxidante.....	19
Mecanismos de inhibición de radicales libres.....	21
Actividad antiinflamatoria.....	22
Actividad anticancerígena y antiproliferativa.....	23
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS GENERAL	28
Objetivos particulares.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Obtención de la microalga y condiciones de cultivo.....	29
ETAPA I	
Optimizar la producción de pigmentos y biomasa de la microalga <i>Navicula incerta</i> cultivada bajo diferentes condiciones de cultivo.....	31
Determinación del crecimiento y producción de biomasa.....	31
Cinética de crecimiento.....	31
Composición química.....	32
Determinación de pigmentos.....	32
Optimización estadística y metodología de superficie de respuesta.....	33
Análisis estadístico de la ETAPA I.....	35

ETAPA II

Determinación de la toxicidad y caracterización biológica (actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa) de extractos de <i>N. incerta</i>	36
Extracción de pigmento de <i>N. incerta</i>	36
Bioensayo de toxicidad aguda mediante nauplios de <i>Artemia salina</i>	36
Asociación de los diferentes grupos sanguíneos ABO y Rh con la acción citotóxica y efecto protector sobre daño oxidativo en eritrocitos humanos.....	39
Acción citotóxica.....	39
Efecto protector sobre daño oxidativo en eritrocitos humanos.....	39
Actividad antioxidante.....	40
FRAP.....	40
DPPH.....	41
ABTS.....	42
Actividad antihemolítica.....	42
Detección de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> (Screening antiinflamatorio)	43
Inhibición de la encima pancreática porcina (EPP).....	43
Inhibición del ensayo de desnaturalización de albúmina (actividad antiartrítica)	44
Uso de la membrana de glóbulos rojos para evaluar la actividad antiinflamatoria: Ensayo de estabilización de la membrana plasmática... ..	45
Ensayo de hemólisis inducida por calor.....	45
Ensayo de hemólisis inducida por hipotonicidad.....	46
Evaluación de los cambios morfológicos de los glóbulos rojos inducidos por el calor y el daño por hipotonicidad por microscopía óptica.....	47
Actividad antiproliferativa de los extractos de <i>N. incerta</i> sobrelíneas celulares humanas.....	47
Análisis Estadístico de la ETAPA II.....	48
<hr/>	
ETAPA III	
Identificación y caracterización de los pigmentos extraídos de la microalga <i>Navicula. incerta</i>	49
Caracterización por espectrofotometría y espectroscopía.....	49
Análisis espectrofotométrico Ultravioleta-Visible (UV-Vis).....	49
Espectroscopía infrarroja-transformada de Fourier (FT-IR).....	49
Perfil de metabolitos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)....	49
Preparación de muestras para estudio de RMN.....	49
Análisis de RMN.....	50
Perfilado metabolómico.....	51
Análisis multivariable.....	51
Análisis estadístico de la ETAPA III.....	52
RESULTADOS Y DISCUSIONES	53

ETAPA I	
Optimización para la producción de pigmentos y biomasa de la microalga <i>Navicula incerta</i> cultivada bajo diferentes condiciones de cultivo	53
Cinéticas y tasas promedio de crecimiento.....	53
Composición química.....	56
Optimización para la producción de pigmentos.....	59
Diseño central compuesto, modelado y metodología de superficie de respuesta.....	59
ETAPA II	
Determinación de la toxicidad y caracterización biológica de extractos de <i>Navicula incerta</i>	69
Ensayos toxicológicos.....	69
Bioensayo de toxicidad aguda mediante nauplios de <i>Artemia salina</i>	69
Acción citotóxica de extractos de <i>N. incerta</i> sobre los diferentes grupos sanguíneos ABO y Rh presentes en la membrana plasmática de eritrocitos.....	72
Asociación de diferentes grupos sanguíneos ABO y Rh con el efecto protector sobre eritrocito humano contra el estrés oxidativo.....	76
Actividad antioxidante.....	81
Poder antioxidante redactor férrico (FRAP).....	81
Actividad anti-radical libre.....	83
Actividad protectora sobre daño oxidativo en eritrocitos humanos.....	85
Detección de actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	88
Inhibición de la enzima pancreática porcina (EPP).....	88
Ensayo de desnaturalización de albúmina (BSA) (actividad antiartrítica)	91
Ensayo de estabilización de membrana.....	93
Ensayo de hemólisis inducida por calor.....	93
Ensayo de hemólisis inducida por hipotonicidad.....	94
Cambios morfológicos de glóbulos rojos inducidos por el daño por calor e hipotonicidad por microscopía óptica.....	95
Actividad anti-proliferativa.....	98
ETAPA III	
Caracterización estructural	103
Caracterización espectrofotométrica.....	103
Espectrofotometría de ultravioleta visible (UV-Vis).....	103
Caracterización espectroscópica.....	105
Espectroscopía infrarroja transformada de fuerier (FT-IR).....	105
Asignaciones de picos de metabolitos por Resonancia Magnética Nuclear (¹ H NMR y ¹³ C NMR) y correlación espectroscópica mediante RMN 1H, 2D-COSY, HSQC, DEPT-135.....	109
Análisis multivariado.....	120

CONCLUSIONES.....	129
RECOMENDACIONES.....	130
REFERENCIAS.....	131

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Estructura de (a) ficocianina y (b) ficoeritrina.....	13
2	Estructura de la clorofila: (a) Clorofila a y (b) clorofila b.....	14
3	Estructuras de los carotenoides a) β -caroteno, b) licopeno, c) astaxantina, d) cantaxantina, e) criptoxantina, f) zeaxantina y g) luteína.....	16
4	Proceso de carcinogénesis y efecto de los fitoquímicos durante cada paso del desarrollo de tumores malignos (Kotecha, et al., 2016).	20
5	Descripción general del efecto anticancerígena y antiproliferativa de los carotenoides provenientes de microalgas.	25
6	Efecto de los diferentes medios limitantes en nitrógeno y diferentes niveles de salinidad sobre la cinética de crecimiento, densidad celular y tasas de crecimiento de <i>N. incerta</i>	54
7	Efecto de los diferentes medios limitantes en nitrógeno y diferentes niveles de salinidad sobre el rendimientos de biomasa de <i>Navicula incerta</i>	54
8	Gráfica de correlación para los valores experimentales vs predichos para la producción de pigmentos de <i>N. incerta</i> ...	66
9	Gráfico de superficie de respuesta de pigmentos de <i>N. incerta</i>	67
10	Hemólisis directa en eritrocitos del grupo sanguíneo A, B y O positivos a diferentes concentraciones de extractos de <i>N. incerta</i>	73
11	Hemólisis directa en eritrocitos O positivos y O negativos...	75
12	Actividad antihemolítica de extractos de <i>N. incerta</i> contra la hemólisis oxidativa de diferentes tipos de sangre ABO y Rh inducidos por AAPH.	77
13	Actividad eritroprotectora sobre el daño oxidativo en eritrocitos humanos.	86
14	Actividad anti-inflamatory por inhibición de elastasa	89
15	Micrografías de los cambios morfológicos de eritrocitos por inducción de calor e hipotonicidad.....	96
16	Micrografías que muestran el efecto de los diferentes extractos obtenidos de <i>N. incerta</i> sobre las líneas celulares A549, HeLa y ARPE-19.....	99
17	Micrografías que muestran el efecto diferentes extractos obtenidos de <i>N. incerta</i> sobre las líneas celulares PC3, LS-180 y ARPE-19.....	102
18	Variación de los espectros de absorción de diferentes extractos obtenidos de la microalga <i>N. incerta</i>	104

19	Espectros de FT-IR de extractos de la diatomea <i>Navicula incerta</i> utilizando diferentes solventes.	106
20	Espectros de FT-IR de estándares de fucoxantina y β – Caroteno. Los estándares fueron disueltos en metanol.....	108
21	Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN ^1H).....	111
22	Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN- ^{13}C).....	112
23	Análisis de correlación espectroscópica en dos dimensiones (RMN ^1H ; 2D-COSY)	116
24	Espectroscopía de RMN 1H-13C (HSQC)	118
25	DEPT 135.	119
26	Análisis de componentes principales (PCA).....	112
27	Señales del espectro de 1H-RMN mostrados en agrupamiento jerárquico.....	125
28	PCA y regresión lineal de señales del espectro de ^1H -RMN.	127
29	Discriminación por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) de señales del espectro de ^1H -RMN.....	128

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
1	Condiciones de cultivo y medios experimentales de la microalga <i>Navicula incerta</i>	30
2	Matriz para la optimización de la producción de pigmentos de la microalga <i>Navicula incerta</i> realizada mediante un Diseño Central Compuesto (DCC).	34
3	Clasificación de toxicidad de extractos en <i>A. salina</i>	38
4	Efecto de los diferentes medios limitantes en nitrógeno y niveles de salinidad sobre la composición química de <i>N. incerta</i>	57
5	Matriz de Diseño Central Compuesto (DCC). Optimización para la producción de pigmentos de la microalga <i>Navicula incerta</i>	60
6	Ecuaciones polinomiales de segundo orden para tres factores respuesta en términos de factores codificados.....	61
7	Modelo para la producción de clorofila <i>a</i>	62
8	Modelo para la producción de clorofila <i>b</i>	63
9	Modelo para la producción de carotenoides totales.	64
10	Promedio de nauplios de <i>Artemia salina</i> vivos y muertos.....	70
11	Grado de toxicidad de extractos de <i>N. incerta</i> a diferentes concentraciones.....	71
12	Asociación del grupo sanguíneo ABO y el factor Rhesus (Rh) con actividad antihemolítica del extracto de <i>N. incerta</i>	79
13	Poder antioxidante reductor férrico de extractos obtenidos de la microalga <i>N. incerta</i>	82
14	Porcentaje de inhibición para los radicales DPPH, ABTS y AAPH expuestos a diferentes extractos de <i>N. incerta</i> mediante un ensayo de su capacidad antiradical libre.	84
15	Detección de la actividad antiinflamatoria in vitro de extractos de la microalga <i>Navicula incerta</i>	90
16	Actividad anti-proliferativa (IC ₅₀) de extractos obtenidos de <i>Navicula incerta</i> sobre diferentes líneas celulares.	101
17	Identificación de metabolitos y su H NMR (400 MHz, Metanol-D) asignado de <i>Navicula incerta</i> de tres extractos diferentes.....	113
18	Análisis multivariado de correlación para los diferentes extractos de <i>N. incerta</i>	123

RESUMEN

La microalga *Navicula incerta* es una diatomea bentónica que se encuentra distribuida en Baja California, México, comúnmente utilizada en el área de nutrición acuícola. Estudios previos han reportado que las microalgas contienen pigmentos con alta actividad biológica. Sin embargo, los pigmentos de *N. incerta* no han sido reportados. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue caracterizar biológica y estructuralmente los pigmentos obtenidos por optimización de la microalga *N. incerta* bajo diferentes condiciones de cultivo. Para ello, se llevó a cabo la optimización de las condiciones de cultivo (concentración de nitrógeno, salinidad, edad del cultivo y tipo de solvente) para la obtención de pigmentos mediante la metodología de superficie de respuesta. Se realizó una extracción por solventes (acetónico, metanólico y etanólico) asistida por ultrasonido del tratamiento optimizado para observar el efecto citotóxico sobre *Artemia salina*, asociación de los grupos sanguíneos ABO y Rh con la acción citotóxica y la actividad antihemolítica. Por último, los extractos se caracterizaron biológica (actividad antioxidante, antihemolítica antiinflamatoria y antiproliferativa) y estructuralmente (UV-Vis, IR y RMN-H¹). Las mejores condiciones de cultivo fueron: 0.44 mol·L⁻¹ de nitrógeno; 40 UPS y 3.5 días. Los extractos obtenidos de *N. incerta* se consideran virtualmente no tóxicos (extracto metanólico) y relativamente inocuos (extractos acetónico y etanólico). Se encontró una asociación significativa (OR > 1, *p* < 0.001) entre los grupos sanguíneos con la actividad antihemolítica de los extractos. El grupo O y B fueron menos susceptible al efecto citotóxico de los extractos acetónicos y etanólicos. El efecto antihemolítico del extracto acetónico se incrementó en presencia del antígeno A. Además, se observó una fuerte asociación entre el Rh y la actividad antihemolítica (OR > 1, *p* < 0.001), donde la presencia del RhD+ve incrementa el efecto antihemolítico de todos los extractos. Los extractos mostraron alta actividad antioxidante, inhibiendo radicales libres (hidroxilo, peroxilo, entre otros) y reduciendo compuestos oxidados (Fe⁺³ → Fe⁺²). Los pigmentos en los extractos podrían ser utilizados como antiinflamatorios prometedores ya que presentaron resultados similares al diclofenaco de sodio (inhibición de la EPP, inhibición de la

desnaturalización de ASB e inhibición de hemólisis inducida por calor e hipotonicidad). Por otro lado, los extractos lograron inhibir la proliferación de las líneas celulares de HeLa y PC-3, probando tener actividad antiproliferativa potente a las concentraciones probadas (<200 µg/mL). La caracterización estructural de los pigmentos reveló que los principales pigmentos detectados fueron: fucoxantina, astaxantina, cantaxantina, luteína, violaxantina, zeaxantina, clorofila a, feofitina a (α), Metil-feofirbide a (β), Clorofila a (α) y Fitol. Los resultados demostraron alta efectividad al aplicar herramientas estadísticas para optimizar las condiciones de cultivo para obtener pigmentos con alta actividad biológica. Esta aproximación con el uso de análisis combinatorios de diferentes actividades biológicas podría ayudar a obtener fitoquímicos con potenciales aplicaciones en la industria biomédica y farmacéutica, que incentive el uso de recursos naturales para la quimioprevención de patologías crónico-degenerativas que podrían estar asociadas a un grupo sanguíneo en específico.

ABSTRACT

The *Navicula incerta* microalgae is a benthic diatom that is distributed in *Baja California, Mexico*, commonly used in the area of aquaculture nutrition. Previous studies have reported that microalgae contain pigments with high biological activity. However, *N. incerta* pigments have not been reported. The aim of the study focuses on the biological and structural characterization of pigments obtained by optimization from the microalga *N. incerta* under different culture conditions. For this reason, the optimization of growing conditions (nitrogen concentration, salinity, age of the culture and type of solvent) for pigment production was carried out using response surface methodology. An ultrasound-assisted extraction (acetonic, methanolic and ethanolic) was carried out to observe the cytotoxic effect on *Artemia salina*, an association of ABO and Rh blood groups with cytotoxic action and antihemolytic activity. Finally, the extracts were characterized biologically (antioxidant, antihemolytic anti-inflammatory and antiproliferative properties) and structurally (UV-Vis, IR and NMR- H^1). The best growing conditions were: $0.44 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of nitrogen; 40 UPS, 3.5 days. The extracts obtained from *N. incerta* are considered virtually non-toxic (methanolic extract) and relatively harmless (acetonic and ethanolic extract). A significant association ($OR > 1$, $p < 0.001$) was found between the blood groups with the antihemolytic activity of the extracts. Groups O and B were less susceptible to the cytotoxic effect of the acetonic and ethanolic extracts, respectively). The anti-hemolytic activity of the acetonic extract was increased in the presence of antigen A. In addition, a strong association was observed in all extracts between Rh and antihemolytic activity ($OR > 1$, $p < 0.001$), where the presence of RhD+ve increased the anti-hemolytic effect. The extracts showed high antioxidant activity, inhibiting free radicals (ABTS $^+$ y AAPH) and reducing oxidized compounds ($\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$). The pigments extracts could be used as promising anti-inflammatory agents since they presented similar results as diclofenac sodium (inhibition of EPP and inhibition of heat-induced hemolysis and hypotonicity). On the other hand, the extracts were able to inhibit the proliferation of the HeLa and PC-3 cell lines, proving to have potent antiproliferative activity at the concentrations tested ($< 200 \mu\text{g} / \text{mL}$). The third stage indicated the main pigments that could be responsible for

biological activities. The main pigments detected were: Fucoxanthin, Astaxanthin, Cantaxanthin, Lutein, Violaxanthin, Zeaxanthin, Chlorophyll a, Pheophytin a (α), Methyl-pheopyrbinide a (β), Chlorophyll a (α) and 30, Fitol. The results showed a high effectiveness when applying statistical tools to optimize the cultivation conditions to obtain pigments with high biological activity. This approach with the use of combinatorial analyzes of different biological activities could help to obtain phytochemicals with potential applications in the biomedical and pharmaceutical industry, which encourages the use of natural resources for the chemoprevention of chronic-degenerative pathologies that could be associated with a blood group specific.

INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios plantean una gran oportunidad para su aplicación en el área biomédica, farmacéutica y en la industria alimentaria, los cuales son extraídos de organismos terrestres y marinos. No obstante, los recursos marinos están ganando terreno debido a que existe suficiente evidencia donde se demuestra su alta actividad biológica (Gulati et al., 2015). Una de las especies marinas más utilizadas en la actualidad son las microalgas, organismos fotosintéticos que se encuentran en la columna de agua o bien en los fondos marinos de las cuales algunas de ellas están sometidas a cambios ambientales drásticos, por lo que sintetizan compuestos bioactivos como carbohidratos sulfatados, ácidos grasos poliinsaturados, péptidos y pigmentos que tienen un uso potencial hacia el ser humano en farmacéutica o nutracéutica (Nuño et al., 2013; López et al., 2015). Las condiciones de cultivo de las microalgas son de vital importancia para la producción de estos metabolitos secundarios. Para llevar a niveles máximos de producción, las microalgas son sometidas a diferentes tipos de estrés, como salinidad, luz, irradianza, pH o deficiencia de uno o varios nutrientes, ejemplo el nitrógeno. El uso de herramientas estadísticas para la optimización de estos metabolitos está aumentado, ya que se han obtenido buenos resultados. El diseño central compuesto se define como el uso de un grupo de métodos de diseño de experimentos avanzados (DOE) que juegan un papel importante para aclarar mejor la interacción de las variables independientes y optimizar la o las respuestas. Mientras que la metodología de superficie modela la curvatura de las diferentes respuestas que estén siendo directamente afectadas por las variables independientes. Actualmente, la optimización estadística se ha vuelto importante para obtener el punto máximo de producción de biomasa o metabolitos de microalgas, uno de los más importantes son los pigmentos fotosintéticos.

Los pigmentos extraídos de microalgas muestran rasgos estructurales y funcionales exclusivos en comparación a otros organismos (Macías-Sánchez et al., 2008; Gong et al., 2016). Caracterizar estructuralmente los pigmentos ha sido objeto de diferentes estudios, ya que en base a su estructura se puede elucidar su potencial aplicación. Se

ha observado que los pigmentes presentan diversas actividades biológicas como actividad antiangiogénica (Carmeliet et al., 2003), cardioprotectora (Hussein et al., 2005), antidiabética (Ylonen et al., 2003), antiinflamatoria (Paniagua-Michel et al., 2012), antioxidante (Hancock et al., 2001), neuroprotectora (Pangestuti et al., 2011), anticancerígena (Nishino et al., 2002) y antiproliferativa (Kumar et al., 2013). Estas actividades están relacionadas con su capacidad de inhibición de radicales libres y de intervenir en diversos procesos metabólicos para la inhibición de la proliferación celular de distintas líneas celulares de cáncer humano. Además, tienen la capacidad para estimular respuestas inmunitarias antitumorales previniendo enfermedades como el cáncer (Sathasivam et al., 2018; Tabarzad et al., 2020;).

El cáncer es una enfermedad crónico-degenerativa que ocupa el primer lugar en mortalidad a nivel mundial, siendo un problema grave de salud que engloba muchas enfermedades no sólo una, teniendo en común alteraciones genéticas características que contribuyen a transformaciones neoplásicas, (McLeod et al., 2013). Para disminuir el crecimiento de estas enfermedades se han realizado investigaciones en diversas áreas de la salud, tales como nutrición, farmacología y nutracéutica, que proporcionan quimioprevención (Kreuzaler et al., 2012). En la actualidad se busca incorporar compuestos bioactivos a alimentos, para así, proporcionar un beneficio a la salud. Por otra parte, la microalga *Navicula incerta* es una diatomea bentónica que debido a su vida fototrófica, está expuesta a estrés por oxígeno y radicales libres presentes en su hábitat. Las investigaciones se han enfocado principalmente en hidrolizados proteicos para el tratamiento de células hepáticas dañadas por alcohol (Kang et al., 2011, 2013; Kim et al., 2014). Adicionalmente, se han analizado compuestos antioxidantes presentes en la microalga, pero enfocándose a derivados de carbohidratos y proteínas (Affan et al., 2007; Kang et al., 2012). Sin embargo, aún no se tiene el conocimiento de sus pigmentos ni las posibles aplicaciones biológicas que pudieran presentar; por ello, en esta investigación se pretende caracterizar estructural y biológicamente pigmentos presentes en la microalga *Navicula incerta* bajo diferentes condiciones de cultivo.

ANTECEDENTES

Generalidades de las Microalgas

Las microalgas son organismos fotosintéticos microscópicos, que tienen movilidad limitada debido a que algunas poseen flagelos. Se piensa que las microalgas fueron los organismos que dieron origen a plantas más complejas, ya que se les puede considerar plantas unicelulares que crecen de forma individual. Habitan en ambientes húmedos como el mar, lagunas entre otros. Pueden llegar a ocupar una gran extensión superficial donde exista el paso de luz solar para su fotosíntesis. Los cloroplastos son unos de los organelos que poseen las microalgas, en la mayoría de los casos les confieren el color o pigmento verde. Otros organelos son los cromatóforos, y una variabilidad de enzimas que le ayuda a la síntesis de energía (Richmond, 2004; Plaza et al. 2008; Plaza et al., 2009).

Las microalgas poseen un metabolismo eficiente y una rápida velocidad de replicación. Son capaces de realizar fotosíntesis gracias a que pueden transformar un sustrato inorgánico en materia orgánica produciendo una amplia variedad de metabolitos primarios y secundarios biológicamente activos (Kim et al., 2010). Entre éstos se encuentran los péptidos, ácidos grasos poliinsaturados, carbohidratos sulfatados, alcaloides y pigmentos derivados de carotenoides y ficobilinas, pigmentos que resaltan por tener alta capacidad antioxidante, antiinflamatoria, anticoagulante y antiproliferativa (Reboloso et al., 2000, 2001; Pulz y Gross, 2004; Rao et al., 2013). Estos microorganismos son fuentes potenciales de biomoléculas bioactivas, despertando interés en la industria alimentaria y farmacéutica (Kim et al., 2010).

Existen varios factores que pueden afectar tanto el crecimiento de las microalgas como su composición, especialmente de sus pigmentos. Entre estos factores se encuentran: el medio acuoso, los nutrientes, salinidad, edad del cultivo, potencial de hidrógeno, la fuente de carbono (CO₂), sales disueltas y la intensidad de luz. Durante el proceso fotosintético, moléculas inorgánicas se metabolizan para producir materia orgánica.

Además, se generan en grandes cantidades compuestos solubles benéficos para el crecimiento de la microalga, tales como, nitratos, silicatos (únicamente en ciertas especies de microalgas como las diatomeas) y fosfatos (Mara, 1977; López, et al., 2013). El transporte de estos nutrientes es llevado a cabo mediante el agua rica en sales (35 UPS [g/kg]), que es un factor determinante para el desarrollo de las microalgas (Lau et al., 1995). Se ha observado que el empleo de diferentes longitudes de onda e irradianza sobre el crecimiento de las microalgas es vital, ya que existe una estrecha relación entre la conversión luz-biomasa, aproximadamente del 1 al 4% (Malgas, 2013). La regulación de la intensidad e incidencia de la luz sobre las microalgas es de suma importancia, ya que se ha observado que en sistemas de cultivos abiertos (aproximadamente al medio día) sufren de un fenómeno denominado fotoinhibición, que es ocasionada por la exposición a un tiempo prolongado de luz (Hernández y Labbé, 2014). En los cultivos de microalgas, ya sean en sistemas abiertos o cerrados, la temperatura induce la disociación de carbono para la disponibilidad en el proceso de fotosíntesis. La replicación de microalgas es directamente proporcional a la disponibilidad de carbono, que es vital para el crecimiento óptimo de cada especie de microalga. El rango establecido para su desarrollo se encuentra entre los 28 y 35 °C (Hernández y Labbé, 2014). Sin embargo, se ha reportado que la microalga *Chlorella* es resistente a temperaturas de hasta 42 °C, a partir de aquí las células podrían verse afectadas si la temperatura se va incrementando cada vez más. El metabolismo de las microalgas está influenciado por el pH del medio de cultivo, el cual se encuentra alrededor de 7 a 9 (Ruiz, 2011; Jiménez et al, 2003). Los macro (proteína, lípidos y carbohidratos) y micronutrientes (carbono, nitrógeno y el fósforo) son vitales para las funciones fisiológicas y metabólicas de las microalgas. La fuente de nitrógeno puede adquirirse en forma de urea, nitratos, nitritos o amonio, necesario para la formación de proteínas, pigmentos y enzimas. Mientras que las fuentes principales de fósforo en el medio de cultivo son a través de HPO_4^{2-} o HPO_4 , ambos micronutrientes requeridos para la formación de ADN, bases nitrogenadas o aminoácidos (Hernández y Labbé 2014).

Las microalgas se dividen en dos grandes grupos, planctónicas y bentónicas, las cuales se pueden encontrar en ecosistemas marinos y de agua dulce (Richmond, 2004). Las microalgas planctónicas se dividen en varios grupos, no obstante, el grupo más estudiado son las diatomeas planctónicas, las cuales comprenden una gran variedad de microalgas, tales como *Dunalliella* sp., utilizada comúnmente en acuicultura como alimento (Brown, 2002; Becker et al., 2004). Otro grupo muy importante son las diatomeas bentónicas, estos organismos a diferencia de los planctónicos se encuentran en los fondos submarinos, adheridas a bentos y rocas, ayudadas por un grupo de proteínas denominadas adhesinas (Sung et al., 2019). Al igual que estas proteínas, se encuentran metabolitos secundarios utilizados como prebióticos en acuicultura, con un uso similar a las microalgas planctónicas; sin embargo, en estudios realizados recientemente, pueden formar biopelículas utilizadas como alimento para camarones, brindando un alimento más rico en nutrientes y fitoquímicos que lo protegerán de patógenos. Por ello, se han potencializado los estudios en el campo alimentario y en la biomedicina (Gulati et al., 2015). Un ejemplo de este grupo es la microalga *Navicula incerta*, donde se ha evidenciado que posee actividades biológicas importantes como antioxidante y anticancerígena (Fimbres et al., 2015; Baudalet et al., 2013). Estos estudios se han basado principalmente en carbohidratos sulfatados. Sin embargo, dentro de sus componentes posee pigmentos con un potencial uso en el área quimiopreventiva por ser biomoléculas activas. No obstante, aún no se han estudiado ni caracterizado.

Optimización estadística para la producción de pigmentos

Una de las partes más importantes de una investigación es el diseño de experimentos, ya que permite identificar las mejores variables y sus interacciones dentro de un estudio experimental. Una o más variables se ponen a prueba y se manipulan en un diseño de experimentos, se vinculan a las causas para medir el efecto de las variables de interés. Para ello existen distintas herramientas. Estas herramientas ayudan a optimizar las variables de respuesta para obtener las mejores condiciones de un

proceso. Una de esas herramientas es el uso de la metodología de superficie de respuesta (MSR), que es un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos (DOE). La MSR se utiliza para refinar los modelos de optimización después de determinar factores importantes utilizando diseños cribados o factoriales. Esta metodología resulta imprescindible si se sospecha de la existencia de curvatura en la superficie de respuesta (Athmouni et al., 2017; Li et al., 2017).

La diferencia más importante entre una superficie sin curvatura y una que presenta curvatura es la incorporación de términos cuadráticos permitiendo modelar la curvatura de diversas variables estudiadas. La modelación de superficie de respuesta es útil para mapear una región sobre la superficie de la curvatura. Estos modelos dependen de las ecuaciones que se estén aplicando, ya que afectan las variables de respuesta de interés y producen cambios en las variables. La MSR puede ser utilizada para determinar los valores máximos y mínimos para cada factor. Uno de los diseños más utilizados es el diseño central compuesto (DCC), que es un diseño factorial fraccionado con puntos centrales y axiales, que permiten estimar la curvatura (Bezerra et al., 2008; Saurabh et al., 2016).

El uso de un modelo de optimización en el área biológica tiene diferentes aplicaciones. Entre ellas, está el aumento en la producción de biomasa o metabolitos de diferentes organismos, uno de ellos puede ser las microalgas. Se podría obtener un aumento significativo en la producción de pigmentos fotosintéticos, optimizando las condiciones de cultivo. Las condiciones de crecimiento de la microalga ayudarían a estimular la síntesis de carotenoides y clorofilas (Xin et al., 2010; Calderon et al., 2016). La optimización es esencial para la industria de la acuicultura porque reduce los costos y el tiempo de producción (Laokuldilok et al., 2016).

Estudios recientes sobre *Navicula incerta*

Actualmente la microalga bentónica *Navicula incerta*, se ha estado utilizando en biotecnología para obtener una producción de biomasa en diferentes condiciones para la síntesis de sus metabolitos, obteniendo diferencias cualitativa y cuantitativamente al manipular factores como iluminación, salinidad, CO₂, temperatura, nutrientes, tipo de iluminación y/o longitud de onda (Affan et al 2007; Kang 2011). En estudios recientes se demostró que los carbohidratos sulfatados de esta microalga presentan alta capacidad antioxidante (Fimbres *et al.*, 2015). Por otra parte, dentro de los compuestos que se han logrado aislar de la microalga es el estigmosterol, el cual induce apoptosis en células cancerígenas de hígado (HepG2), regulando la expresión de genes pro-apoptóticos (Bax, p53) y anti-apoptóticos (Bcl-2) a través de la vía de señalización de la apoptosis mitocondrial (Young et al., 2014). También hidrolizados proteicos de esta especie han sido utilizados como efecto protector sobre la toxicidad inducida por etanol sobre la misma línea celular hepática. Así mismo, proteínas aisladas han logrado inhibir la fibrosis hepática sobre TGF- β 1 induciendo la activación de LX-2 de células hepáticas humanas (Kyong et al., 2011; 2013). Por lo tanto, los compuestos que han sido estudiados hasta el momento de esta microalga han sido enfocados a la parte proteica y de carbohidratos. Sin embargo, se ha comprobado que los pigmentos de las microalgas, como las clorofilas y los carotenoides, pueden aportar también actividades biológicas importantes (Guerin et al., 2003; Yuan et al., 2011).

Principales Pigmentos de las Microalgas

Las microalgas tienen gran variedad de pigmentos naturales que desempeñan un papel fundamental en muchas funciones fisiológicas. Entre los pigmentos encontrados están las ficobilinas, las clorofilas (a, b, c, d y f) y los carotenoides (β -caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina, criptoxantina, zeaxantina y luteína) (García et al., 2005; Baudelet et al., 2013).

Ficobilinas

Las ficobilinas o ficobiliproteínas (FBP) son moléculas de tipo cromóforos las cuales cumplen su función como pigmentos accesorios fotosintéticos. Son características de las algas rojas, de algunas cianobacterias (algas verde-azules) y criptofíceas. Las PBs que se encuentran con mayor frecuencia son: ficocianinas (PC) y ficoeritrinas (PE) (Fig. 1). Bajo condiciones desnaturalizantes se han logrado extraer PC (azul) y PE (rojo) de alto peso molecular que oscilan desde 220 a 340 kDa para PE y de 180 a 360 kDa para PC. Los componentes más bajos de peso molecular observado en condiciones desnaturalizantes se han reportado que tienen aproximadamente 40 y 23 kDa para PE, y alrededor de 30 kDa para PC. La desnaturalización de la PC es fácil de observar por la disminución de la absorbancia, cuando se aumenta la concentración de un compuesto desnaturalizante (Raja et al., 2008). A estos pigmentos se les han atribuido propiedades antioxidantes y anticancerígenas, por lo que son ampliamente utilizadas en terapias contra este tipo de enfermedades. Por ejemplo, se ha revelado su actividad citostática y citotóxica en células de carcinoma escamoso y en células de leucemia (Tandeau, 2002).

Clorofila

La clorofila es un pigmento de color verde que se encuentra en las cianobacterias y en todos aquellos organismos que contienen plastos en sus células. En las microalgas se encuentran, dependiendo de la especie, diferentes tipos de clorofilas (*a*, *b*, *c*, *d*). Las principales son la clorofila *a* y *b* que se diferencian estructuralmente por sus sustituyentes: en clorofila se encuentra un sustituyente metilo, mientras que en la clorofila *b*, un aldehído (Fig. 2). La clorofila *a* es el pigmento fotosintético primario en todas las microalgas, algas verdes-azules y rojas.

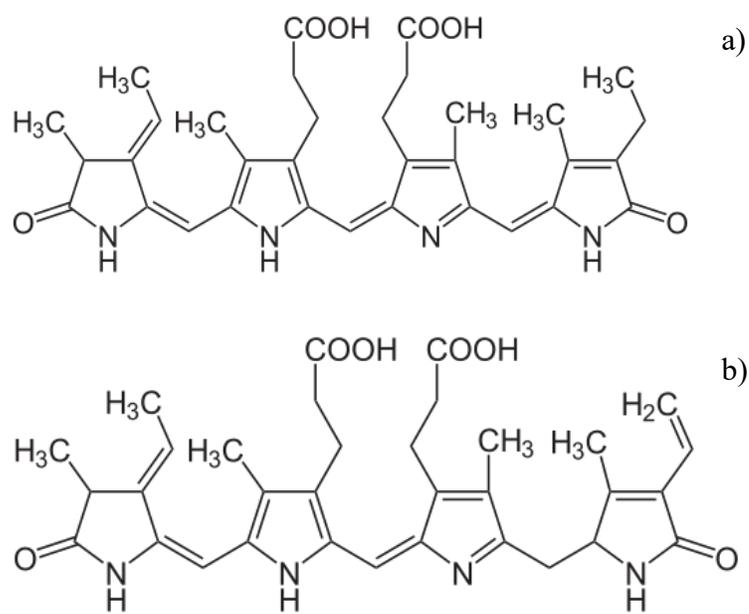


Figura 1. Estructura de (a) ficocianina y (b) ficoeritrina. Fuente: Standnichuk y Tropin (2017).

Las algas verdes contienen clorofila b mientras que en grupos aislados de algas se pueden encontrar “c”, “d” y “f” en concentraciones muy pequeñas frente al contenido de clorofila “a” (Bogorad, 1962; Cohen, 1986, Willows et al., 2013). Adicionalmente a la función fisiológicas de las clorofilas, estas pueden ser empleadas como un método para cuantificar biomasa indirectamente (Vicente et al., 2005). Este método representa una mayor precisión que el recuento celular, siendo la clorofila a directamente proporcional a la concentración celular de microalgas (Pearson et al., 1987). Las clorofilas, son esenciales en muchos productos de uso diario, además tiene una aplicación terapéutica en el tratamiento de la anemia y en pacientes con presión sanguínea alta e inflamaciones (Tandeau, 2002). Protegen a las células normales de sufrir daños en el DNA ejerciendo efectos antiproliferativos, citotóxicos y pro-apoptóticos en células cancerosas, lo que sugiere su posible uso para la prevención o quimioprotección (Pasquet et al., 2011).

Carotenoides

Son compuestos liposolubles isoprenoides altamente insaturados. Cuentan con un cromóforo, pueden o no tener anillos en los extremos, esto va a ser determinante para el tipo de carotenoide, los cuales dan color al organismo que los contiene. Los carotenoides se clasifican en carotenos y xantofilas. Su principal diferencia es la adición de átomos de oxígeno en su cadena hidrocarbonada formando grupos funcionales (epoxi, hidroxilos, acetilénicos, carboxilos, glucosídicos, hidroxílico, carboxílico, etc.). Los carotenoides se encuentran en la membrana tilacoidal de los cloroplastos, así como en cuerpos de naturaleza lipídica (Al-Farsi et al., 2005). Como ejemplos de estos pigmentos se tiene al β -caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina, criptoxantina, zeaxantina y luteína (Fig. 3) (Batista et al., 2009).

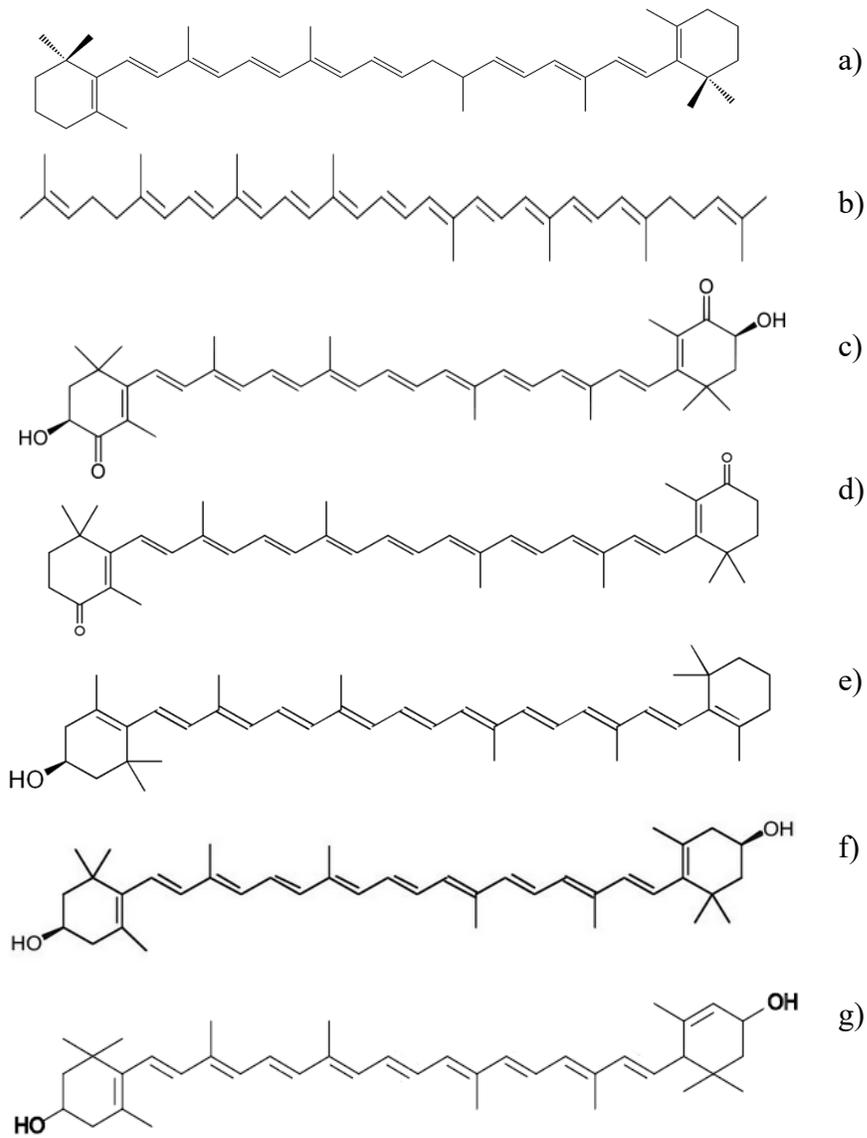


Figura 3. Estructuras de los carotenoides a) β -caroteno, b) licopeno, c) astaxantina, d) cantaxantina, e) criptoxantina, f) zeaxantina y g) luteína.

Fuente: <https://www.carotene.org/carotenoids/molecular-structure/>

Los carotenoides han mostrado ser capaces de proteger a las células en contra de los daños oxidativos ya que tiene la capacidad de donar electrones y transferir protones para inhibir radicales libres derivados de especies reactivas de oxígeno, nitrógeno o de cloro. La actividad antiradical libre de los carotenoides podría ser responsable de suprimir la viabilidad celular en procesos cancerosos, en el tratamiento de la degeneración macular, inflamaciones y enfermedades degenerativas (Gulati, et al., 2015; Robert et al., 2003). Por ello, la búsqueda de nuevos y eficientes antioxidantes se enfocan en el contenido de pigmentos en las microalgas, que al momento de usarlas como aditivos en alimentos podrían disminuir la incidencia de ciertas enfermedades, neutralizando especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que se producen como parte del metabolismo celular (Gulati, et al., 2015).

La astaxantina es uno de los carotenos más utilizados para dar pigmentación a los peces, por lo que varios estudios se han enfocado a su obtención a partir de diversas fuentes, entre ellas de microalgas. La microalga *Haematococcus* sp. es la mayor productora actualmente de este pigmento junto con las algas rojas, las cuales son utilizadas para la pigmentación del salmón (Torrissen and Naevdal, 1984; Tolasa et al., 2005). Además de su uso en acuicultura, se ha observado su efecto sobre los beneficios en la salud humana y aplicaciones nutraceuticas. Existe información realizada en modelos *in vitro* que indican ser un antioxidante potente mediante la reducción y estabilización de radicales libres (Guerin et al., 2003; Chew et al., 2004; Higuera- Ciapara et al., 2006; Palozza et al., 2009; Yuan et al., 2011). Por otra parte, se ha reportado la capacidad de este compuesto para reducir tumores cancerosos, muchas de las veces relacionado a la inhibición de los radicales libres (Hussein et al., 2006; Liu y Osawa, 2007; Ranga and Rao et al., 2010).

Función fisiológica de los pigmentos en las microalgas

Los pigmentos en las microalgas tienen un rol muy importante en el proceso fotosintético, formando complejos con proteínas en la membrana del tilacoide. En

cianobacterias desempeñan un papel diferente encontrándose en sus membranas plasmáticas protegiendo a la célula de la exposición a altas intensidades de luz (Kana et al., 1998 y Masamoto et al., 1999). Mientras que, en las microalgas, protegen a la clorofila de los efectos de la exposición a la luz logrando eliminar las especies reactivas de oxígeno (ERO) como radicales, peróxidos y oxígeno singulete (Esteban et al., 2009). Algunos carotenoides como el β -caroteno protegen a las células del daño por exceso de radicales libres, mientras que la fucoxantina capta la luz que transfiere energía a complejos de clorofila-proteína exhibiendo una eficiencia de transferencia de energía de alrededor del 80%, característica de su estructura. La fucoxantina participa en la fotoprotección y presenta alta actividad antioxidante (Takaichi et al., 2011). Las microalgas sometidas a estrés fisiológico producen metabolitos secundarios a través de la vía de la carotenogénesis y muestran un perfil metabólico diferente (Engeland, 2016).

Prevención de Enfermedades Crónicas no Transmisibles

Las principales causas de muerte son originadas por un conjunto de enfermedades denominadas Enfermedades Crónicas no Transmisibles (ECNT). Las ECNT se originaron con el desarrollo y progreso de un mejor nivel de vida, presentando retos al sistema de salud por su contribución a la mortalidad, complejidad y costo elevado de su tratamiento. Las principales ECNT en México son la hipertensión, diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer (World Health Organization, 2014). Ésta última ocupa el tercer lugar de muerte en nuestro país (World Health Organization, 2014).

Las ECNT son las principales causas de muerte no sólo en México, sino, en el mundo, afectando a países desarrollados como en vías de desarrollo donde existen diversos hábitos alimenticios que comprometen la salud, provocando desnutrición ya sea por falta de alimento, deficiencias en la dieta y consumo excesivo de alimentos altos en grasa y sal, llevando a consumir menos fitonutrientes y proteína (FAO/WHO, 2010).

No obstante, se han buscado nuevas formas para combatir este conjunto de enfermedades, una de ellas son el uso de compuestos bioactivos, los cuales han demostrado disminuir y prevenir los problemas cardiovasculares, colesterolémicos, hipoglucemiantes y carcinogénicos.

La prevención se enfoca principalmente en la detección de agentes que afectan las primeras etapas de desarrollo de la transformación neoplásica (Collins, et al., 2012; Sapienza, et al., 2014). Se han encontrado fitoquímicos naturales que participan en las diferentes etapas del cáncer (Fig. 4). Datos epidemiológicos y estudios preclínicos sugieren que los fitoquímicos naturales y compuestos dietarios poseen propiedades quimiopreventivas, así mismo, estudios realizados *in vitro* y en animales de experimentación arrojan que estos compuestos modulan las vías de señalización involucradas en la proliferación celular y la inducción a apoptosis en células transformadas, reforzando el sistema inmune del usuario o portador y sensibilizando células malignas por agentes citotóxicos (Kotecha, et al., 2016).

Actividades biológicas de los pigmentos de microalgas

Actividad antioxidante

Los procesos del metabolismo aeróbico que ocurren en la célula y los de transducción de señales y expresión de genes activan las vías de señalización y comunicación celular. Estos procesos generan el aumento descontrolado de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) (Hancock et al., 2001). Para neutralizar y como defensa ante el aumento de los ERO, se activan sistemas de defensas antioxidantes capaces de disminuir el daño oxidativo ocasionado a las células y detener el envejecimiento oxidativo. Las funciones enzimáticas y la expresión de genes son las primeras defensas en organismos vivos (Sies, 10993).

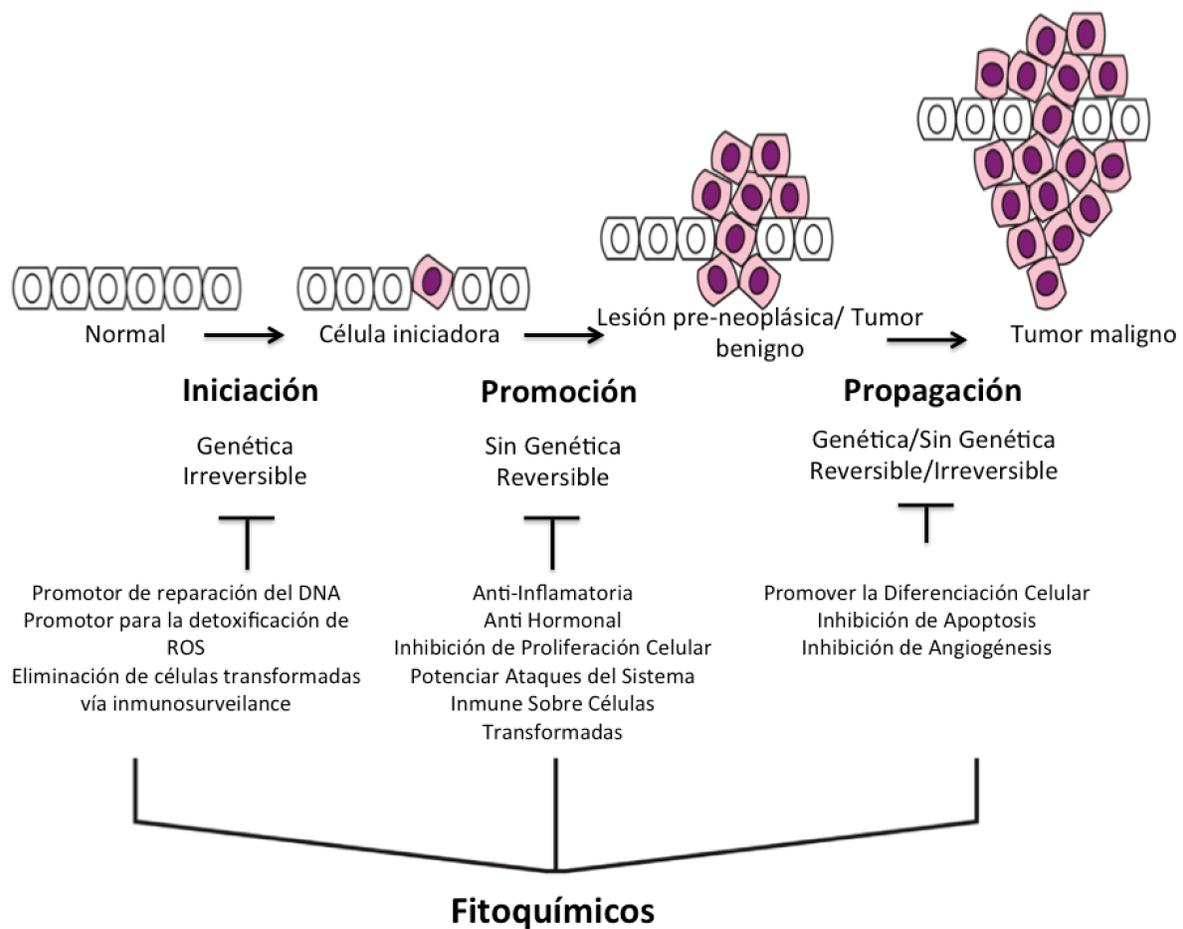


Figura 4. Proceso de carcinogénesis y efecto de los fitoquímicos durante cada paso del desarrollo de tumores malignos. Fuente: Kotecha et al. (2016).

Se ha observado que una combinación de pigmentos, como carotenoides y clorofilas, previenen el daño oxidativo y el consecuente daño celular ocasionado por los ERO. Además, utilizando estos pigmentos pueden dar efectos sobre enfermedades causadas por dicho daño. Las microalgas pueden ser de gran valor por la alta producción y actividad biológica que presentan sus pigmentos, debido a la diversidad de carotenoides que producen (Sathasivam et al., 2018). Los principales carotenoides antioxidantes de las microalgas son astaxantina, cantaxantina, β -caroteno, fucoxantina, luteína, violaxantina y zeaxantina, que se encuentran en diferentes concentraciones (0.7-26 mg/g de biomasa seca) siendo la *Mallomonas* sp. la microalga con mayor concentración de fucoxantina. La fucoxantina, zeaxantina, luteína y el β -caroteno son los principales carotenoides con propiedades antioxidantes (Sathasivam et al., 2018).

Mecanismos de inhibición de radicales libres

Un radical libre es una especie química que contiene un número impar de electrones por lo que tiene un electrón no apareado en uno de sus orbitales (McMurry, 2008). Esto los hace inestables y reactivos, por lo que buscan estabilizarse oxidando moléculas estables como proteínas o lípido, es decir, roban electrones de estas macromoléculas para completar su último orbital. Al mismo tiempo, el compuesto oxidado por el radical libre se convierte en una nueva especie reactiva, comenzando una serie de reacciones que desencadenan una producción masiva de especies reactivas. Los nuevos radicales libres formados pueden degradar membranas plasmáticas, lisis celular y degradación del material genético. Consecuentemente, pueden actuar alterando las membranas celulares, atacando los lípidos, las proteínas y el material genético (ADN) (Sosa, et al., 2013; Tong, et al., 2015). Sin embargo, en el metabolismo de los seres vivos se forman de manera natural para actuar contra el ataque de virus y bacterias, o bien para evitar la auto oxidación por presencia de oxígeno en el proceso de la fotosíntesis de plantas y microalgas, pero se controlan al ser neutralizados por inhibidores de radicales libres (antioxidantes) propios del

organismo (Avello y Suwalsky, 2006). El anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el óxido nítrico (NO) son ejemplos de radicales libres.

Algunos de los mecanismos empleados por los antioxidantes para inhibir a los radicales libres son:

Transferencia de electrón: $ROO\bullet + CAR \rightarrow ROO^- + CAR^+$

Remoción de iones hidrógeno: $ROO\bullet + CAR \rightarrow ROOH + CAR\bullet$

Adición de especies radicales: $ROO\bullet + CAR \rightarrow ROO-CAR\bullet$

En estudios de microalgas, sobre todo en compuestos derivados de carbohidratos y proteínas, se han llegado a utilizar diferentes tipos de radicales libres para lograr obtener el tipo de inhibición usada, entre éstos se tiene al anión superóxido (Jing y Zhao, 1995), al peróxido de hidrógeno (Chaalal et al., 2013), al hidroxilo (Chung et al., 1997), al óxido nítrico (Jagetia et al., 2004), al 1,1,-difeníl-2-picrilhidrazilo (DPPH) (Brand-Williams et al., 1995), al ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS) (Re et al., 1999), y quelación de metales (Dinis et al., 1994), entre otros. En la microalga *Dunaliella salina* se midió la actividad antioxidante y citotóxica de carotenoides bajo estrés celular obteniendo resultados prometedores (Tong et al. 2015).

Actividad antiinflamatoria

La inflamación se define como la respuesta del sistema inmune a una infección o irritación. No obstante, los procesos inflamatorios pueden tener efectos negativos en las células o tejidos del huésped. La inflamación crónica puede causar artritis, hepatitis, gastritis, enfermedad periodontal, hasta neuroinflamatorias (Pangestuti and Kim, 2011). Los antiinflamatorios naturales, como los carotenoides, se encuentran en el foco de los investigadores. Los carotenoides podrían usarse como fármacos para controlar y reducir las afecciones inflamatorias. Estos compuestos logran inhibir la producción

de NO, la prostanglandina E2 y las citosinas proinflamatorias. Además, logran tener inhibidores enzimáticos, inhibiendo a enzimas como el óxido nítrico inducible (ONi), ciclooxigenasa-2 (cox-2) y enzimas de tipo serin proteasas como la elastasa. Los carotenoides podrían usarse como medicamentos para prevenir y controlar las afecciones inflamatorias crónicas debido a sus efectos inhibitorios sobre la producción de NO, la prostaglandina E2 (PGE2) y las citoquinas proinflamatorias, así como sus efectos inhibitorios sobre enzimas como la ONi y cox-2 (Rajapakse *et al.*, 2008; Peerapornpisal *et al.*, 2010).

En investigaciones realizadas sobre la microalga *Dunaliella salina* se encontró una inhibición de las citosinas proinflamatorias mediante diferentes dosis de un concentrado de carotenoides, al inhibir IL-1b, IL-6 y TNF-a, se interrumpe la cascada de inflamación. Al no haber inflamación se reduce el riesgo de un daño severo e irreversible al ADN y así evita una transformación neoplásica (Lin *et al.*, 2014). Las microalgas *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica* y *Chlorella vulgaris*, se encontraron diferentes clases de compuestos responsables de la actividad antioxidante, siendo los compuestos carotenoides los principales responsables de dicha actividad (Goiris, *et al.*, 2015).

Actividad anticancerígena y antiproliferativa

Actualmente, el número de estudios alrededor de la actividad biológica de los carotenoides ha ido en aumento, tanto *in vitro* como *in vivo*, demostrando que tienen alta actividad anticancerígena (Baudelet *et al.*, 2013). Los resultados indican que los carotenoides muestran alta capacidad de prevenir diferentes tipos de cánceres en humanos, incluyendo cáncer cérvico uterino, hepático, intestinal, leucemia, pulmón, colon, próstata, mama y oral. Los mecanismos de acción de los carotenoides incluyen inducción de apoptosis y supresión de la proliferación celular, denominada actividad antiproliferativa (Kumar *et al.*, 2013; San Millan *et al.*, 2015). La actividad biológica de fucoxantina y fucoxantínol que suprime diferentes tipos de cánceres son dependientes de diferentes moléculas que participan en la vía del ciclo celular que llevan a la célula

a la muerte celular programada. Además, junto a la acción de la neoxantina promueven la liberación de la caspasa-3 para inducir apoptosis en células cancerígenas mediante la vía de la procaspasa-9 y el apoptosoma. Sin embargo, la fucoxantina es el metabolito considerado como uno de los carotenoides más potentes como agente quimiopreventivo. No obstante, es efectivo sólo en los primeros estadios del desarrollo del cáncer (Anderson et al., 2001; Guerin et al., 2003) (Fig. 5). La astaxantina, proveniente de la microalga *Haematococcus pluvialis*, ha demostrado inhibir a la línea celular de PC-3 (cáncer de próstata), interrumpiendo la actividad 5- α -reductasa, que es la enzima que ocasiona una inflamación en la próstata. Carotenoides como la β -criptoxantina inhiben la proliferación celular activando la síntesis de la proteína p73, perteneciente al grupo de las proteínas p53 encargadas de la senescencia celular y supresora de tumores (Fig. 5) (San Millan et al., 2015). Por eso el objetivo de esta investigación es optimizar la obtención de pigmentos bioactivos de la microalga *N. incerta* con interés en este tipo de actividades biológicas.

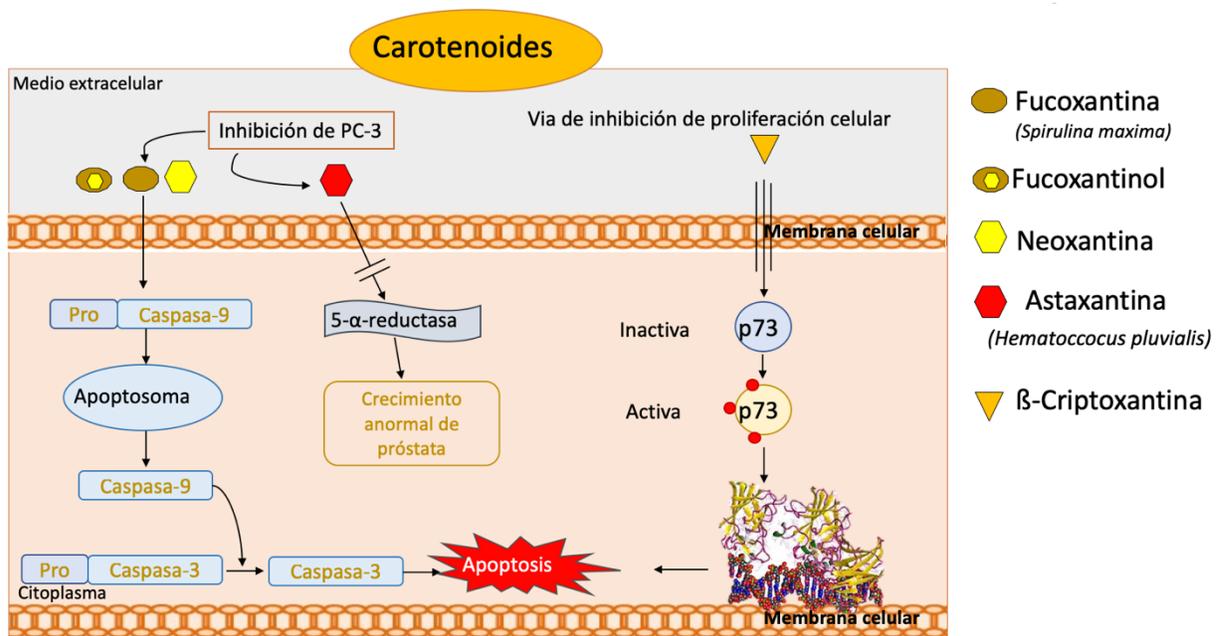


Figura 5. Descripción general del efecto anticancerígeno y antiproliferativo de los carotenoides provenientes de microalgas. Los carotenoides inducen o inhiben diferentes vías y rutas metabólicas. La fucoxantina, fucoxantíol y la neoxantina participan en la activación de la caspasa-3 para promover la senescencia y apoptosis inhibiendo el desarrollo de cáncer de próstata. La astaxantina inhibe la 5-alfa-reductasa para frenar el crecimiento anormal de la próstata, previniendo el cáncer de próstata. La β-criptoxantina participa en la vía de inhibición de la proliferación celular activando la síntesis de la proteína p73, encargada de la senescencia celular y supresora de tumores, llevando a la degradación del DNA y a su vez a la muerte celular. Fuente: Elaboración propia.

JUSTIFICACIÓN

Se ha observado que los pigmentos de microalgas son agentes capaces de prevenir enfermedades crónico-degenerativas, mediante mecanismos que protegen a los organismos del estrés oxidativo. Identificar los pigmentos presentes en la microalga *N. incerta* generará conocimiento básico sobre su composición y actividad biológica (antioxidante, antiinflamatoria, anti-hemolítica y antiproliferativa) que podrían ser aprovechados en el área de la salud. Además, los pigmentos podrían ser incorporados a la industria farmacéutica y alimentaria como opciones naturales quimiopreventivas y quimioprotectoras. Es por ello, que la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos han sido objeto de demanda. Adicionalmente, se pretende promover el uso de recursos naturales en la quimiopreención de patologías crónico-degenerativas de alto impacto social atendiendo a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

HIPÓTESIS

La metodología de superficie de respuesta establecerá las mejores condiciones de cultivo para la obtención de pigmentos derivados de la microalga *Navicula incerta* con potencial antioxidante, antihemolítico, antiinflamatorio y anti-proliferativo, donde los pigmentos responsables de estas actividades son compuestos del tipo clorofilas y carotenoides.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar estructural y biológicamente los pigmentos obtenidos por optimización de la microalga *Navicula incerta* bajo diferentes condiciones de cultivo.

Objetivos particulares

1. Optimizar las condiciones de cultivo para la producción de pigmentos y biomasa de la microalga *Navicula incerta* cultivada bajo diferentes niveles de salinidad, limitación de nitrógeno, día de maduración y tipo de solvente.
2. Evaluar la toxicidad aguda de los pigmentos de *N. incerta* sobre nauplios de *Artemia salina*
3. Determinar la asociación de los diferentes grupos sanguíneos ABO y Rh con la acción citotóxica y el efecto protector sobre el daño oxidativo en eritrocitos humanos.
4. Caracterizar la actividad biológica (actividad antioxidante, anti-hemolítica antiinflamatoria y antiproliferativa) de los pigmentos extraídos de la microalga *Navicula incerta*.
5. Identificar y caracterizar estructuralmente los pigmentos extraídos de la microalga *Navicula incerta*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la microalga y condiciones de cultivo

La diatomea *Navicula incerta* fue proporcionada por el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICECE), Baja California, México. La diatomea se cultivó en concentraciones normales y deficientes de nitrógeno a diferentes salinidades en matraces de 1 L con 700 mL de medio de cultivo. Con el fin de mantener el cultivo, se aplicó aireación y luz constante (24 h) a 25 °C a pH 7.0. Se usó una longitud de luz blanca (400-750 nm) a 100 μmol de fotón/ m^2/seg . Se utilizaron lámparas de diodo emisores de luz (LED) para regular la intensidad deseada. Se utilizó un sensor esférico cuántico Li-Cor 193SA para medir la irradiación y la longitud de onda. La Tabla 1 muestra los diferentes medios de cultivo utilizados para analizar su comportamiento y adaptación a las diferentes condiciones de estrés celular, debido a la deficiencia de nitrógeno en diferentes salinidades. Estas condiciones experimentales se utilizaron para evaluar la cinética de crecimiento y composición química. Las condiciones hipersalinas fueron obtenidas por evaporación, mientras que el tratamiento de menor salinidad por dilución. Para llevar a cabo esta investigación el estudio se dividió en tres etapas, que contemplan: I) optimización, II) caracterización biológica y III) caracterización estructural.

Tabla 1. Condiciones de cultivo y medios experimentales para el cultivo de la microalga *Navicula incerta*.

Medios	Concentración de nitrógeno (mol·L ⁻¹)	Salinidades (UPS)
F/2	0.88	25
		35
		45
		55
F/4	0.44	25
		35
		45
		55
F/8	0.22	25
		35
		45
		55

El tratamiento control fue el medio f/2 (0.88 mol·L⁻¹ and 35 UPS) de Guillard & Ryther (1962). UPS= unidades prácticas de salinidad.

ETAPA I

Optimizar la producción de pigmentos y biomasa de la microalga *Navicula incerta* cultivada bajo diferentes condiciones de cultivo

Determinación del crecimiento y producción de biomasa

La evaluación de la biomasa producida por las microalgas es muy importante para generar información sobre su desarrollo y calidad. Las condiciones óptimas se obtienen al aumentar la producción de biomasa evaluando diferentes factores como medios limitantes en nitrógeno, salinidad, día de cosecha sobre su crecimiento y composición química (Richmond, 2004).

Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento se realiza para conocer la densidad celular en los diferentes tratamientos, ya que crecen en las diferentes fases de crecimiento, tales como las fases de aclimatación, logarítmica, estacionaria y de muerte celular. Estos análisis nos dan información sobre su desarrollo y producción biomasa. La cosecha de la microalga se llevó a cabo a lo largo de la curva de crecimiento en matraces de 1 L. La cinética de crecimiento se realizó durante 6 días (1 a 6 días) de cultivo. La concentración celular se midió usando una cámara de *Neubauer* (0,1 mm de profundidad) y un microscopio óptico Olympus © con la siguiente ecuación (1) (López, et al., 2015):

$$Eq. (1) \left(\# \frac{cells}{8} \right) * 10000 = \frac{\#Cells}{mL}$$

Además, se estimaron las tasas de crecimiento (μ): μ máxima, μ acumulada y μ promedio, calculadas mediante las siguientes formulas: tasa de crecimiento máxima (μ_{max}) = $\text{Log}_2 B_n - \text{Log}_2 B_{n-1} / (t_n - t_{n-1})$; μ acumulada = $\Sigma(\mu = \text{Log}_2 B_n - \text{Log}_2 B_{n-1} / (t_n - t_{n-1}))$; y μ promedio = $\text{Log}_2 B_n - \text{Log}_2 B_0 / (t_n - t_0)$ (Anderson, 2003).

Composición química

La composición química (cenizas, proteína, lípidos y carbohidratos) se realizó mediante la metodología propuesta por la AOAC (1995) para productos alimenticios. Se determinó el contenido de lípidos por Soxhlet, proteína cruda por microKjeldahl, contenido de cenizas a 450 °C y humedad por secado a 105 °C por 24 h.

Determinación de pigmentos

La clorofila *a*, *b* y los carotenoides totales se determinó en conjunto de acuerdo con Lichtendthaler & Wellburn (1983). Previamente a la extracción de los pigmentos se procedió a la estandarización de la técnica, mediante el uso de los solventes: etanol, metanol y acetona. La extracción se realizó comparativamente a fin de determinar el solvente más eficiente. Se determinó las concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) de clorofila *a* (C_a), clorofila *b* (C_b) y carotenoides totales (C_{x+c}), considerando el rango de resolución del espectrofotómetro con las siguientes ecuaciones (Eq.2-4):

Eq. (2) Metanol:

$$C_a = 15.65A_{666} - 7.34A_{653}$$

$$C_b = 27.05A_{653} - 11.21A_{666}$$

$$C_{x+c} = (1000A_{470} - 2.86C_a - 129.2C_b)/221$$

Eq. (3) Acetona:

$$C_a = 11.75A_{662} - 2.35A_{645}$$

$$C_b = 18.61A_{645} - 3.96A_{662}$$

$$C_{x+c} = (1000A_{470} - 2.276C_a - 81.4C_b)/227$$

Eq. (4) Ethanol:

$$C_a = 13.95A_{665} - 6.88A_{649}$$

$$C_b = 24.46A_{649} - 7.32A_{665}$$

$$C_{x+c} = (1000A_{470} - 2.05C_a - 114.8C_b)/245$$

Optimización estadística y metodología de superficie de respuesta

La optimización de las condiciones de crecimiento para la producción de pigmentos se evaluó mediante un diseño central compuesto (DCC) (Tabla 2). Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) para determinar las mejores condiciones de cultivo para la producción de pigmentos. El efecto de los tres parámetros, limitación en nitrógeno (0,22-0,88 mol·L⁻¹ de nitrógeno), salinidades (25-55 UPSU) y día de cosecha (1-6 días), sobre las respuestas de la clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales. Además, se evaluó el efecto del disolvente (acetona, metanol y etanol) sobre la extracción de pigmento de *N. incerta*. El DCC se basa en la ecuaciones polinomiales de segundo orden para cada respuesta (D'Archivio et al., 2018). Los resultados se basaron en la siguiente ecuación (5) utilizando el programa estadístico JMP® versión 15.0. para Mac (SAS Institute Inc., NC, U.S.A):

$$Eq: (5) \quad Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_{ii}^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + e_i$$

donde Y representa la función de respuesta β_0 es un coeficiente constante (origen); β_i , β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes de lo lineal, k es un número de variables y e_i es el error o residual. Cuando se obtuvo el tratamiento optimizado, se llevó a cabo la capacidad de eliminación de radicales libres.

-

Tabla 2. Matriz para la optimización de la producción de pigmentos de la microalga *Navicula incerta* realizada mediante un Diseño Central Compuesto (DCC).

Corrida s	Patrón	Variables experimentales				Variables respuestas		
		X ₁ (Medio)	X ₂ (Salinidad, UPS)	X ₃ (Día)	X ₄ (Solvente)	C _a μg/mL	C _b μg/mL	C _{x+c} μg/mL
1	++++	3	55	1	3	-	-	-
2	00a0	2	40	1	2	-	-	-
3	+++-	3	55	6	1	-	-	-
4	----	1	25	1	1	-	-	-
5	000A	2	40	3.5	3	-	-	-
6	+---	3	25	1	1	-	-	-
7	0a00	2	25	3.5	2	-	-	-
8	++++	3	25	1	3	-	-	-
9	A000	3	40	3.5	2	-	-	-
10	a000	1	40	3.5	2	-	-	-
11	00A0	2	40	6	2	-	-	-
12	----+	1	25	1	3	-	-	-
13	-+++	1	55	1	3	-	-	-
14	---+	1	25	6	1	-	-	-
15	000a	2	40	3.5	1	-	-	-
16	-+++	1	55	6	1	-	-	-
17	+--+	3	25	6	1	-	-	-
18	++++	3	55	6	3	-	-	-
19	0A00	2	55	3.5	2	-	-	-
20	+---+	3	25	6	3	-	-	-
21	-+--	1	55	1	1	-	-	-
22	+---	3	55	1	1	-	-	-
23	-+++	1	55	6	3	-	-	-
24	0000	2	40	3.5	2	-	-	-
25	0000	2	40	3.5	2	-	-	-
26	---++	1	25	6	3	-	-	-

Medios= (1) F/2= 0.88 mol·L⁻¹, (2) F/4= 0.44 mol·L⁻¹, (3) F/8= 0.22 mol·L⁻¹ de concentración de nitrógeno.

Salinidad= UPS (Unidades practicas de salinidad). Solvente: (1) Acetona, (2) metanol, (3) etanol.

Análisis estadístico de la Etapa I

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a un intervalo de confianza del 95% ($P < 0.05$). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado ($n=3$). Los resultados experimentales fueron expresados como medias \pm desviación estándar. Se realizó un diseño central compuesto y gráficas de superficie respuesta las cuales fueron generadas utilizando el paquete estadístico JMP[®] versión 15.0. para Mac (SAS Institute Inc., NC, U.S.A).

ETAPA II

Determinación de la toxicidad y caracterización biológica de extractos de *N. incerta*

Extracción de pigmentos de *N. incerta*

Los extractos acetónicos, metanólicos y etanólicos, se obtuvieron a partir de 0.5 g de microalga liofilizada, utilizando 50 mL de disolvente. La extracción fue asistida mediante pulsos ultrasónicos (generador de pulsos ultrasónicos *Branson Digital Sonifier Qsonica*, LLC. EUA), donde las condiciones de Sonicación fueron a 400 w de potencia, 500 mHz y 15 segundos por pulso (3 pulsos) a una amplitud del 30%, posteriormente se colocó en agitación constante durante 24 h en la oscuridad. Se recuperó el sobrenadante para los análisis correspondientes a la caracterización biológica y estructural.

El rendimiento se calculó en $\mu\text{L}/\text{mL}$ de extracto y el % de rendimiento se obtuvo mediante la siguiente ecuación (6):

$$\text{Eq: (6) \% de rendimiento} = \frac{P1}{P2} \times 100$$

P1: Peso final del extracto

P2: Peso inicial de muestra

Bioensayo de toxicidad aguda mediante nauplios de *Artemia salina*

Para determinar la toxicidad aguda de los extractos de *N. incerta*, se utilizó el bioensayo *Artemia salina* como modelo de organismo vivo mediante el método de Molina-Salinas y Said-Fernández (2006), y Leos-Rivas (2010) con modificaciones. La toxicidad de las muestras se clasificó de acuerdo con Robles-García et al. (2016). La

Tabla 3 presenta la clasificación de toxicidad. El bioensayo se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 1 L con agua estéril para eclosionar los quistes de *A. salina*. El desarrollo de estos organismos fue apoyado por aireación constante utilizando una bomba para tanques de peces, iluminación artificial (luz blanca) a una salinidad de 35 UPS, 25 °C por 48 horas. Para medir el desarrollo de los nauplios se utilizaron microplacas de 96 pocillos, donde a cada pocillo se le agregaron 120 µL. Además, se mezclaron con 150 µL de cada extracto a diferentes concentraciones (10-1500 µg/mL).

El número de nauplios iniciales (TV) se registró durante el bioensayo. Los conteos se llevaron a cabo después del contacto de los nauplios con cada extracto y se monitorearon por 24 horas para llevar el conteo de los nauplios muertos (TM). El porcentaje de letalidad de cada concentración se realizó mediante la siguiente ecuación (7):

$$Eq. (7): \% \text{ de letalidad} = \frac{TM}{TV} * 100$$

El promedio de la concentración letal (LC_{50}) fue calculado mediante la siguiente ecuación (8):

$$Eq. (8): \text{Log } LC_{50} = \frac{50 - Y_1}{Y_2 - Y_1} [\log (X_2) - \log (X_1)]$$

$X_1 \rightarrow$ Concentración inhibitoria $Y_1 > 50 \%$

$X_2 \rightarrow$ Concentración inhibitoria $Y_2 < 50 \%$

Tabla 3. Clasificación de toxicidad ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de extractos en *A. salina*

(E) Extremadamente tóxico	1 - 10
(H) Altamente tóxico	10 - 100
(M) Moderadamente tóxico	100 - 500
(S) Ligeramente tóxico	500 – 1000
(V) Virtualmente no tóxico	1000 – 1500
(R) Relativamente inocuo	>1500

Fuente: Robles-García et al. (2016).

Asociación de los diferentes grupos sanguíneos ABO y Rh con la acción citotóxica y efecto eritroprotector sobre daño oxidativo en eritrocitos humanos

Acción citotóxica

La acción citotóxica se evalúa mediante una prueba hemolítica directa. Este ensayo se realizó según lo descrito por Belokoneva et al. (2003) con ligeras modificaciones. Las muestras de glóbulos rojos (RBC) se recolectaron por punción venosa en tubos con EDTA. Se llevó a cabo una suspensión de eritrocitos al 10% realizando lavados con buffer de PBS (0.15 M, pH 7.4) hasta que se eliminó el plasma en su totalidad (sobrenadante transparente). Posteriormente, se llevó a cabo la hemólisis directa mezclando 150 μ L de eritrocitos con 150 μ L de extracto (v/v) a una concentración de 100 μ g/mL. La suspensión de glóbulos rojos se incubó a temperatura ambiente durante 6 h. Después de la incubación, se añadió 1 mL de PBS, la suspensión de glóbulos rojos se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se recuperaron los sobrenadantes. El sobrenadante (150 μ L) se leyó a 540 nm en un lector de microplacas de 96 pocillos por triplicado. Triton X-100 1% y buffer PBS se usaron como controles positivos y negativos, respectivamente; bajo las mismas condiciones que las muestras. Se evaluaron diferentes grupos sanguíneos (grupos A+, B+, y O+), así como diferentes grupos Rh (RhD+ve y RhD-ve). Los resultados se expresaron como porcentaje de hemólisis, que se calculó utilizando la siguiente ecuación (9):

$$\text{Eq. (9): \% de hemólisis} = \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{PBS}}}{A_{\text{Tritón}} - A_{\text{PBS}}} * 100$$

Efecto eritroprotector sobre daño oxidativo en eritrocitos humanos

Para evaluar el efecto protector sobre daño oxidativo en los grupos ABO y Rh de los eritrocitos humanos, se utiliza el compuesto generador de radicales AAPH para inducir la hemólisis, de acuerdo con la metodología de Lu et al. (2010) con ligeras modificaciones. Se recogieron muestras de sangre en tubos de EDTA de voluntarios

adultos sanos; previamente se les realizó la declaración previa de razones y motivos del estudio con su consentimiento informado. La suspensión de eritrocitos (2%) se preparó separando el plasma por centrifugación (2000 x g durante 10 minutos a 4 ° C) realizando tres lavados con solución salina de PBS a pH 7.4. Más tarde, se procedió a llevar a cabo las reacciones con cada extracto (acetónico, metanólico y etanólico). Se mezclaron 100 µL de suspensión de sangre + 100 µL de la muestra (1 mg/mL) + 100 µL de AAPH. Posteriormente, la mezcla se incubó 3 h a 37 °C con agitación continua (30 rpm). La suspensión de eritrocitos (100 µL) + AAPH (100 µL) + PBS (100 µL) se tomó como control de hemólisis. La suspensión de eritrocitos (100 µL) + PBS (200 µL) se tomó como control sin hemólisis. El sobrenadante se leyó a 540 nm en una microplaca de 69 pocillos (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se evaluaron diferentes grupos sanguíneos (grupos A+, B+, y O+), así como diferentes grupos Rh (glóbulos rojos O positivo y O negativo). Los resultados de la actividad antihemolítica se presentaron en porcentaje de inhibición de la hemólisis (% IH) y el valor se calculó con la siguiente ecuación (10):

$$Eq. (10) \% IH = \left(\frac{AAPH_1 - HS}{AAPH_1} \right) \times 100$$

donde $AAPH_1$ = valor o resultado obtenido de la densidad óptica de la hemólisis inducida por el AAPH. % IH = porcentaje de inhibición de hemólisis. HS = valor o resultado obtenido de la densidad óptica de la inhibición de hemólisis de cada tratamiento.

Actividad antioxidante

FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

El poder reductor de los antioxidantes se mide a través de la reacción: ion férrico → ion ferroso, y se determina mediante la metodología de Rubio et al. (2016) Para

comenzar el experimento se prepararon una serie de soluciones *stock* de buffer de acetato de sodio (300 mmol/L, pH de 3.6), una solución de triazina (40 mmol) con cloruro férrico (20 mmol de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) para formar un complejo (hierro-TPTZ) color amarillo cristalina disuelto en HCl (40 mmol). La solución de trabajo (FRAP) se realizó una vez obtenidas las soluciones *stock* con una relación 10:1:1 (Buffer: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: TPTZ·HCl). Una vez preparada la solución FRAP se procedió a llevar a cabo la reacción con los extractos; donde, 20 μL de extracto microalgal se mezcló con 280 μL de solución de FRAP. La reacción se monitoreo durante 40 minutos tomando lectura cada 10 minutos para observar la evolución de la reacción y parar la lecturas hasta que el efecto reductor termine. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro que utiliza un lector de microplaca de 96 posillos (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, NY, USA) a una densidad óptica de 638 nm. Cada medición se realiza en intervalos de 10 minutos durante 40 minutos, para observar cambios significativos en el tiempo de reacción de cada muestra. La reducción de $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ se aprecia visualmente mediante un cambio de color, que va desde amarillo cristalino hasta azul fuerte (dependiendo del poder antioxidante del extracto testeado), la intensidad dependerá del potencial de transferencia de electrones del compuesto. Los resultados se reportan en $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra seca. Para ello fue necesario realizar una curva estándar utilizando diferentes concentraciones de trolox (0 a 4000 μmol).

Actividad de atrapamiento del radical libre 1,1,-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

El radical DPPH· fue preparado agregando 2.5 mg del radical en 100 mL de etanol, la solución se ajustó a una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 515 nm. Un volumen de 20 μL de la muestra se mezcló con 200 μL de radical preparado, después se dejó llevar a cabo la reacción en ausencia de luz por 30 minutos. Se midió la absorbancia en un lector de microplaca a una densidad óptica de 515 nm. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado (Molineux, 2004).

Actividad de atrapamiento del radical libre ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS).

Para inhibir al radical libre ABTS se siguió la metodología propuesta por Re et al. (1999) con algunas modificaciones. El compuesto ABTS se preparó mezclando 19.3 mg en 5 mL de agua destilada. Un volumen de 88 µL de persulfato de potasio (0.0378 g/mL) se agregó a la solución preparada de ABTS. Posteriormente, se dejó reposar en la obscuridad por 16 h para activar el ABTS y obtener el radical de trabajo. El radical ABTS^{•+} se disolvió en etanol para obtener una absorbancia con etanol para obtener una absorbancia de 0.7 ±0.02 a 734 nm. Veinte microlitros de extracto se mezclaron con 270 µL de la solución de ABTS^{•+}. La absorbancia se midió a 734. El resultado se reportó en porcentaje de inhibición y en concentración media inhibitoria (IC₅₀).

Actividad antihemolítica

Se determinó mediante el método del 2,2'-azobis-(2-metilpropionamida) (AAPH) descrito por Lu *et al.*, (2010). Para este ensayo se utilizaron eritrocitos humanos (todas las reacciones para evitar sesgos se realizaron con un mismo tipo sanguíneo, O+) que se lavaron tres veces con buffer salino de fosfatos (PBS) a pH 7.4. Se preparó una suspensión de eritrocitos humanos al 2 % en PBS. En un tubo de ensaye se colocaron 50 µL de suspensión de eritrocitos, 50 µL de extracto y 400 mmol AAPH. En otro tubo de ensaye se añadieron solamente 50 µL de suspensión de eritrocitos y 400 mmol de AAPH para favorecer la hemólisis completa. Los tubos fueron incubados a 37 °C en agitación a 30 rpm en oscuridad durante 3 h. Después de la incubación la muestra de reacción se diluyó con 1 mL de PBS y se centrifugó a 2,000 x g por 5 minutos. La absorbancia del sobrenadante se midió a 540 nm. La inhibición de hemólisis se calculó a partir de la siguiente ecuación (11):

$$Eq. (11) \% IH = \left(\frac{A_{AAPH1-HS}}{A_{AAPH1}} \right) \times 100$$

donde A_{APH_1} = valor o resultado obtenido de la densidad óptica de la hemólisis inducida por el AAPH. % IH = porcentaje de inhibición de hemólisis. HS = valor o resultado obtenido de la densidad óptica de la inhibición de hemólisis de cada tratamiento.

Dentro de los análisis descritos anteriormente en esta sección, se encuentran implicados diversos mecanismos de inhibición a los radicales libres (transferencia de electrón, remoción de iones hidrógeno, adición de especies radicales) dependiendo el tipo de radical a inhibir por los extractos de *N. incerta*. La actividad antiradicalaria de los extractos se calculó usando la siguiente ecuación (12):

$$Eq: (12) \left[1 - \frac{A_i - A_s}{A_c} \right] \times 100$$

donde A_i es la absorbancia del extracto mezclado con compuestos de oxígeno reactivo o nitrógeno, A_s es la absorbancia del extracto sin compuestos reactivos y A_c es la absorbancia del control.

Detección de la actividad antiinflamatoria *in vitro* (Screening antiinflamatorio)

Los siguientes métodos antiinflamatorios presentados en este estudio fueron modificados y adaptados para un lector de microplaca de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, NY, USA).

Inhibición de la encima pancreática porcina (EPP)

La inhibición de la EPP (Sigma, Tipo IV), de los extractos de *N. incerta* se evaluó mediante la técnica espectrofotométrica utilizando el método de Lee et al. (1999) con ligeras modificaciones. La enzima EPP hidroliza el sustrato N-succ-(ala)-3-p-nitroanilina (Sigma Cat. No. S4760) (actúa como sustrato) liberando *p*-nitroanilina

(producto) que simula un proceso inflamatorio específico. La liberación de *p*-nitroanilina se monitoreó durante 58 minutos a 28 °C, la concentración utilizada para cada extracto fue de 1000 µg/mL. El sustrato se preparó a una concentración de 1.015 mM en solución 0.1 M de tampón biológico Tris-HCl [Sigma-Aldrich, Cat. Num. T3253] a un pH de 8. La EPP se disolvió en Tris-HCl 0.2 M (pH 8) a una concentración de 1.376 U / mL. La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos añadiendo 10 µL de extracto, 40 µL de enzima (elastasa) y 100 µL de sustrato, para tener un volumen final de 150 µL. Se debe tomar en cuenta el orden de cada uno de los factores que componen al sistema de reacción, ya que el orden altera el resultado de la reacción, que comienza con el contacto de la enzima con el sustrato. Como antiinflamatorio conocido, se utilizó ácido acetilsalicílico o ASA (conocido popularmente como aspirina). Los resultados de la actividad antiinflamatoria se expresaron de acuerdo con la siguiente ecuación (13):

$$\text{Eq. (13): \% de inhibición} = \left[1 - \frac{B}{A}\right] \times 100$$

donde, *A* se expresa en µg/mL de *p*-nitroanilina liberada sin el inhibidor y *B* (µg/mL) de *p*-nitroanilina liberada en presencia del inhibidor.

Inhibición del ensayo de desnaturalización de albúmina (actividad antiartrítica)

La actividad antiartrítica se evaluó según la metodología de Govindapa (2011) y Chandra et al. (2012) con modificaciones menores. La mezcla de reacción consistió en 1 mL de albúmina de suero bovino al 1% (BSA) y 200 µL de extracto crudo. La mezcla de reacción se ajustó a 6.8 usando HCl al 1N, se incubó a una temperatura de 25 °C durante 20 minutos. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos, más tarde, se calentó a 55 °C durante 20 minutos en baño maría. Después de enfriar a temperatura ambiente, la turbidez causada por la desnaturalización de la albúmina se midió en una microplaca de 96 pocillos a 660 nm,

agregando 300 μ L a cada pocillo. Se usó una mezcla de BSA con solución fisiológica como control. Además, se utilizó diclofenaco de sodio como control. El experimento se realizó por triplicado. El porcentaje de inhibición de la desnaturalización de la albúmina se calculó utilizando la siguiente ecuación (14) (A = absorbancia):

$$Eq. (14): \% \text{ de inhibición} = \frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} * 100$$

Uso de la membrana de glóbulos rojos para evaluar la actividad antiinflamatoria:
Ensayo de estabilización de la membrana plasmática

La adquisición y preparación de suspensión de glóbulos rojos (GR) se realizó por punción venosa, se recolectaron en un vial hermético y se mezclaron con EDTA para evitar la coagulación. Se tiene que asegurar que el donador tenga un recuento de GR aproximado de 4.7 a 6.1×10^6 células/mL. Para preparar una suspensión de eritrocitos al 10%, los viales se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos y se lavaron tres veces con solución isotónica. La suspensión se almacenó a 4 °C para uso experimental adicional.

Ensayo de hemólisis inducida por calor

La hemólisis inducida por calor se realizó de acuerdo con la metodología de Sakat et al. (2011) y Agarwal et al. (2019) con ligeras modificaciones. El experimento comenzó mezclando 150 μ L de suspensión de GR al 10% (v/v) con 150 μ L de cada muestra. La mezcla se incubó en un baño de agua a 55 °C durante 30 min. Después de la incubación, se añadió 1 mL de PBS a cada muestra y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos. Se añadieron 300 μ L de sobrenadante recuperado a una microplaca de 96 pocillos, se registró la absorbancia a 560 nm. Para una evaluación posterior de los cambios morfológicos causados por el daño inducido por el calor en los glóbulos rojos, el sedimento (paquete globular) se almacenó a 4 °C, para su posterior visualización de sus cambios morfológicos mediante microscopía óptica. Se utilizó diclofenaco sódico

como estándar a las mismas concentraciones de las muestras. Se usaron 300 μL de 10% (v/v) GR como Control (+). Se utilizaron 150 μL de diclofenaco sódico + 150 μL de 10% (v/v) GR como estándar.

Los resultados fueron reportados en porcentaje de inhibición de hemólisis, que fue calculado mediante la siguiente ecuación (15):

$$\text{Eq. (15): \% de inhibición} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{Control}}} * 100$$

Ensayo de hemólisis inducida por hipotonicidad

La hemólisis inducida por hipotonicidad se realizó según la metodología de Agarwal et al. (2019) con ligeras modificaciones. Se mezclaron 50 μL de suspensión de GR con 100 μL de PBS (solución salina con buffer de fosfato a pH de 7.2), 100 μL de extractos de microalgas y 200 μL de solución hipotónica, en este orden. La mezcla se incubó en a 37 °C durante 30 min. Después de la incubación, se añadieron 850 μL de PBS a cada muestra y la mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min. Se añadieron 300 μL de sobrenadante recuperado a una microplaca de 96 pocillos, se registró la absorbancia a 560 nm. Para una evaluación posterior de los cambios morfológicos causados por el daño inducido por la hipotonicidad en los GR, el sedimento (paquete globular) se almacenó a 4 °C. Se usó diclofenaco sódico como estándar a las mismas concentraciones de muestra. Se mezclaron 50 μL de RBC al 10% + 300 μL de PBS como Control (-). Se mezclaron 50 μL de RBC al 10% + 200 μL de PBS + 200 μL de solución hiposalina y se usaron como Control (-). Se mezcló 50 μL de glóbulos rojos al 10% + 150 μL de diclofenaco sódico + 200 μL de hiposalina como estándar. Los resultados se reportaron en porcentaje de inhibición de hemólisis, que fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Eq. (8): \% de inhibición} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{Control}}} * 100$$

Evaluación de los cambios morfológicos de membranas de glóbulos rojos inducidos por calor e hipotonicidad por microscopía óptica.

Los cambios morfológicos de los GR por el daño inducido por el calor e hipotonicidad se evaluaron por microscopía óptica (Microscopio óptico Eclipse FN1 100x). El paquete globular se resuspendió en 50 μ L de plasma fresco. Para observar los cambios morfológicos, fue necesario el método de tinción de *Wright* para visualizar los GR. Para esto, se realizó un frotis; donde se esparció una gota de sangre en una lámina de vidrio y se hizo un barrido. Se observó el efecto protector en cada tratamiento mediante esta técnica visual para comprobar la estabilidad de la membrana plasmática dañada por los dos factores inductores de hemólisis. El resultado se comparó con diferentes controles: eritrocitos sanos, eritrocitos dañados por el calor e hipotonicidad.

Actividad antiproliferativa

Se utilizaron 5 diferentes líneas celulares: LS-180 (células humanas de cáncer de colon), A-549 (cáncer alveolar humano), PC-3 (Cáncer de próstata), HeLa (cáncer cervical) y ARPE-19 (Células epiteliales de retina) (Kang y Kim 2013; Kubatka et al., 2015; Montero et al., 2015). La actividad inhibitoria de los extractos obtenidas sobre las líneas celulares se determinó mediante la reducción de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa formando un compuesto de color azul (formazan) donde la absorbancia de cada pocillo se leyó en un lector de placas ELISA a una densidad óptica de 570 nm. Se colocaron 10,000 células en cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos. Se incubaron durante 48 h a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Previamente, los extractos se resuspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y posteriormente se diluyeron en medio DMEM suplementado. Las células de control se incubaron solamente con DMSO (concentraciones de DMSO 0.06 a 0.5 % v/v) (Montero et al., 2015).

Análisis Estadístico de la ETAPA II

Todos los datos se analizaron utilizando el programa estadístico SPSS Statistic software v22 para Mac y se expresaron como media (IC_{50}) \pm DE (desviación estándar). Los datos se sometieron a regresión lineal y no lineal, análisis de varianza (ANOVA) unidireccional mediante una prueba *post hoc* (Tukey, $p < 0.05$). Para el modelo de asociación se aplicó: la prueba de *chi*-cuadrado para determinar las diferencias en la proporción. Se aplicó el método de Mann-Whitney para grupos independientes en términos codificados de variables métricas. Para determinar las *Odds ratios* (OR) se obtuvieron por regresión logística incondicional con un $p < 0.05$ de confianza interna y se realizó un ANOVA de dos vías para observar la interacción entre los diferentes factores de asociación.

ETAPA III

Identificación y caracterización de los pigmentos extraídos de la microalga

Navicula incerta.

Caracterización por espectrofotometría y espectroscopía

Análisis espectrofotométrico Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

Los espectros UV-Vis de los extractos (acetónico, metanólico y etanólico) fueron realizados mediante el espectrofotómetro DR6000 con escaneos de longitud de onda de alta velocidad a lo largo del espectro UV-Vis. Los datos fueron graficados y ajustados con el software Origin 8. Todas las muestras se realizaron en un rango de longitud de onda de 200-700 nm (Davies et al., 1976; Jeffrey et al. 1997).

Espectroscopía infrarroja-transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros de IR de extractos (acetónico, metanólico y etanólico) se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro infrarrojo (IR) Perkin-Elmer con espectroscopía infrarroja-transformada de Fourier. Se realizó en un rango de número de onda de 4000-400 cm^{-1} con una resolución de 2 cm^{-1} , 32 escaneos con un detector DTGS (Dore et al., 2013).

Perfil de metabolitos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Preparación de muestras para estudio de RMN

Las muestras de *N. incerta* se prepararon según la metodología de Lee et al. (2018) con pequeñas modificaciones. Para la medición posterior de los espectros de $^1\text{H-NMR}$, se disolvió una cantidad aproximada de 5 mg de cada extracto (acetónico, metanólico

y etanólico) en 600 μL de acetona deuterada (CDCl_3) en un vial de vidrio de 3 mL. La preparación de la muestra para espectros de RMN bidimensionales ($2\text{D } ^1\text{H}-^1\text{H}$) se realizó con 10 mg disueltos de cada extracto en 600 μL de CDCl_3 . Para solubilizar, los extractos se mezclaron en un vórtice durante unos segundos. Más tarde, para el estudio de RMN, el contenido total del vial se pipeteó en un tubo de RMN de 5 mm (Lee et al., 2018).

Análisis de RMN

Todos los experimentos de RMN- ^1H se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker Advance 400 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania) que funciona a 400 MHz a temperatura ambiente ($25\text{ }^\circ\text{C}$), equipado con una criosonda TXI de 5 mm. Los cambios químicos presentes en la radiofrecuencia se expresan como valores de δ ppm utilizando TMS como patrón interno. Para cada muestra, se aplicaron los siguientes parámetros: tiempo de adquisición para espectros de RMN- ^1H 8,49 min, rango espectral de 0 a 14 ppm, tiempo escaneado 32 y retraso de relajación 2s. Previo a un análisis de las muestras, se aplicó la secuencia de pulso de presaturación (PRESAT) para reducir otras señales que podrían causar interferencia (Becerra-Martínez et al., 2017; Villa-Ruano et al., 2018). Además, se llevaron a cabo cuatro experimentos de RMN para corroborar la asignación de señales para la identificación del metabolito: espectroscopía de isótopos de carbono (^{13}C -RMN), espectroscopía de correlación homonuclear ($2\text{D } ^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY), correlaciones cuánticas hetero-nucleares simples ($2\text{D } ^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC) y la mejora sin distorsiones de la transferencia de polarización utilizando un impulso de desacoplamiento de 135 grados (DEPT-135) (Salehi et al., 2011; Poliana et al., 2019). Todos los espectros de RMN se procesaron utilizando el software Bruker TopSpin (v. 4.0.6, Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania) y el software MestReNova (v.12.0, Mestrelab Research, Santiago de Compostela, España).

Perfil de metabolitos

Una vez obtenidos los resultados de los diferentes análisis de RMN, se realizó un análisis bioinformático. La identificación de los metabolitos de cada extracto se asignó en base a la literatura publicada previamente (Azizan et al., 2018) y bases de datos en línea como: Human Metabolome Database (HMDB) (<http://www.hmdb.ca/>), la base de datos de Resonancia Magnética Biológica (BMR) (<http://www.bmrwisc.edu/>) y PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) se utilizaron como base de datos metabólicos. Todas las muestras se disolvieron en CDCl_3 para obtener los espectros en cada análisis.

Análisis multivariable

El análisis quimiométrico se llevó a cabo utilizando el software JMP versión 15.0 (SAS Institute Inc., NC, EE. UU.). Para la comprensión de la información de las señales de espectroscopia de los resultados obtenidos por RMN se hizo uso de análisis de correlación de parámetros y propiedades físicas con los datos analíticos. Para cada muestra, se aplicó un análisis multivariado a todas las señales de RMN (Eriksson et al., 2013). Los análisis de componentes principales (PCA) es un análisis multivariado no supervisado que se utiliza en el componente principal de la señal de RMN. Este análisis permite representar los datos espectrales en un espacio de baja dimensión. PCA se utilizó para detectar los principales metabolitos y resaltar los cambios metabólicos causados por las diferentes polaridades de los solventes utilizados para extraer los metabolitos de la célula completa de *N. incerta*. Las variables se escalan a la unidad de varianza, es decir, si los metabolitos son diferentes en cada muestra, permitirá que todos los compuestos identificados se tengan en cuenta en el análisis multivariado. Para identificar los metabolitos que están presentes en cada muestra, se realizó la puntuación de PCA y la gráfica de carga (biplot), que representan la señal de protón relativa obtenida por RMN (Azizan et al., 2018). Además, el análisis de agrupamiento jerárquico de las diferentes señales de RMN se realizó mediante dendrograma (Florentino-Ramos et al., 2019). Esto representa la agrupación

jerárquica de las diferentes señales ($^1\text{H-NMR}$) a 400 MHz detectadas a partir de los diferentes metabolitos extraídos de *N. incerta* (Imaizumi et al., 2014).

Análisis estadístico de la ETAPA III

Los resultados de la concentración de pigmentos se analizaron utilizando el software estadístico JMP versión 15.0 (SAS Institute Inc., NC, EE. UU.) y se expresaron como media \pm DE (desviación estándar). Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para comparar las diferencias significativas entre cada muestra. Los datos fueron sometidos a regresión lineal y no lineal, análisis de varianza (ANOVA) y se aplicó una prueba *post hoc* (Tukey, $p < 0.05$). Se realizó un análisis de componentes principales (PCA), comparación por mínimos cuadrados (PLS), así como, análisis multivariados para generar gráficos de PCA score, Loading plot y Clustering hierarchical. Estos análisis y gráficos se realizaron mediante el uso del software estadístico JMP versión 15.0 (SAS Institute Inc., NC, EE. UU.) y el software MestReNova (v.12.0, Mestrelab Research).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

ETAPA I

Optimización para la producción de pigmentos y biomasa de la microalga *Navicula incerta* cultivada bajo diferentes condiciones de cultivo

Cinéticas y tasas promedio de crecimiento

Las microalgas se adaptan a diferentes condiciones de cultivo, enfocando sus ciclos metabólicos dependiendo de factores como limitación de nutrientes y salinidad que se encuentran en la columna de agua. Normalmente, el estrés celular causado por las altas salinidades y la baja fuente de nitrógeno potencian su crecimiento o lo retrasan, esto es diferente en cada especie de microalga. Sin embargo, la microalga *N. incerta* tuvo un comportamiento sigmoideo en los diferentes tratamientos, respondiendo favorablemente en su crecimiento (Fig. 6). El mayor crecimiento se produjo en el medio más salino a 55 UPS ($6 \times 10^5 \pm 0.16 \times 10^5$ células·mL⁻¹) mostrando una tasa de crecimiento de 1 div / día. Se presentó una tendencia en el medio de tres cultivos (F/2, F/4 y F/8) en el tratamiento más limitado en nitrógeno (0.22 mol·L⁻¹) que muestra un mayor crecimiento celular. Los datos sobre el crecimiento cinético sugieren que las diferencias en el rendimiento de la biomasa fueron causadas por el tratamiento limitado con nitrógeno a diferentes salinidades (Fig. 7). La deficiencia de nitrógeno y diferentes salinidades afectan el crecimiento de *N. incerta*, donde a niveles más bajos de nitrógeno aumenta la biomasa. Los cultivos a 25 PSU tienen bajos rendimientos de biomasa en el medio de tres cultivos.

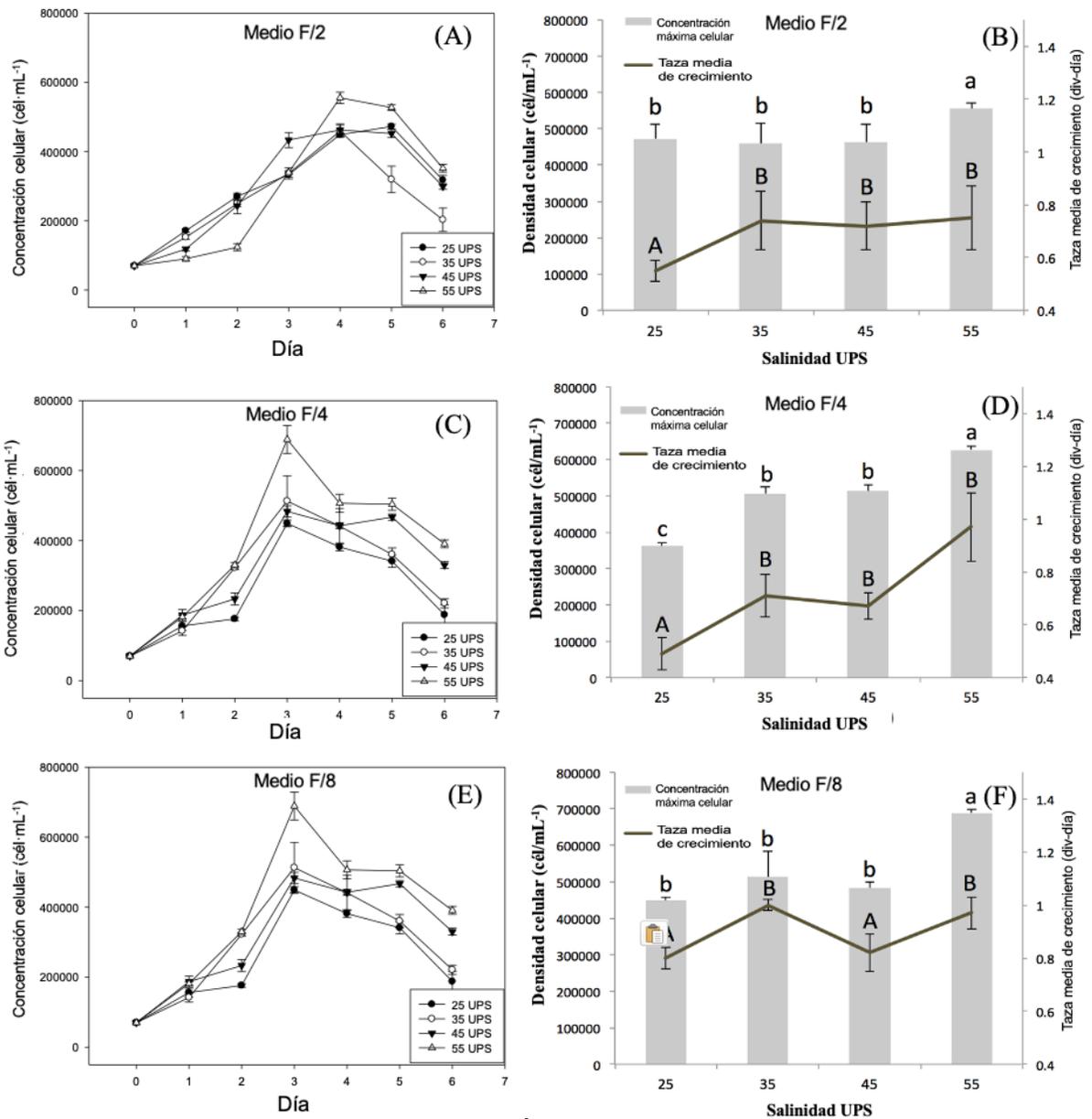


Figura 6. Efecto de los diferentes medios limitantes en nitrógeno y diferentes niveles de salinidad sobre la cinética de crecimiento, densidad celular y tasas de crecimiento de *N. incerta*. (A) Cinética de crecimiento, medio F/2 (0.88 mol·L⁻¹ de nitrógeno). (B) Concentración máxima celular y tasa promedio de crecimiento, medio F/2 (0.88 mol·L⁻¹ de nitrógeno). (C) Cinética de crecimiento, medio F/4 (0.44 mol·L⁻¹ de nitrógeno). (D) Concentración máxima celular y tasa promedio, medio F/4 (0.44 mol·L⁻¹ de nitrógeno). (E) Cinética de crecimiento, medio F/8 (0.22 mol·L⁻¹ de nitrógeno). (F) Concentración máxima celular y tasa promedio de crecimiento, medio F/8 (0.22 mol·L⁻¹ de nitrógeno).

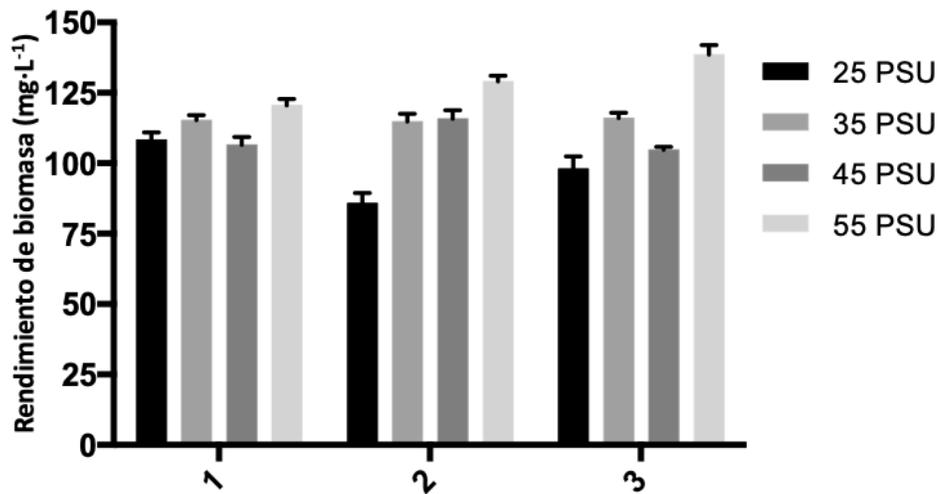


Figura 7. Efecto de los diferentes medios limitantes en nitrógeno y diferentes niveles de salinidad sobre el rendimientos de biomasa de *Navicula incerta*: el eje x muestra los medios con diferentes concentraciones de nitrógeno; (1) F/2, (2) F/4 and (3) F/8. Diferentes superíndices representan diferencias significativas para cada medio de cultivo ($p < 0.05$, ANOVA de una vía para cada medio). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de al menos tres réplicas.

Los resultados iniciales sugieren que las altas salinidades y la baja concentración de nitrógeno aumentan la concentración celular de la microalga. En investigaciones recientes, se ha encontrado que *N. incerta* crece en presencia de alta salinidad alrededor de 12 a 14 días (Affan et al., 2007; Kyong-Hwa et al., 2011; Sánchez y Núñez, 2012); sin embargo, no hay informes de su respuesta a bajas concentraciones de nitrógeno. La interacción entre altas salinidades y baja concentración de nitrógeno resultó en una tasa de replicación rápida (alrededor de 1 div / día), también se encontró la mayor tasa de crecimiento máxima. *N. Incerta* es una microalga bentónica clasificada en la familia de las diatomeas, que puede verse influido en su crecimiento por la temperatura, la salinidad y la concentración de nutrientes (Lewin y Lewin 1960; Sánchez-Saavedra y Núñez-Zarco 2012). Estos factores muestran abundantes fluctuaciones en la densidad celular y la tasa de crecimiento (Araujo et al., 2005 Muller-Feuga et al. 2007). La salinidad a menudo varía según el cambio climático, que afecta el crecimiento del fitoplancton, lo que da efectos biológicos complejos ya que se considera que la salinidad impone los requisitos metabólicos más altos para la síntesis de metabolitos secundarios que ayudan a contrarrestar el estrés salino, sintetizando compuestos como pigmentos, entre ellos, destacan las clorofilas y los carotenoides. El estrés debido a la deficiencia de nitrógeno en microalgas como *Phaedactylum tricornutum*, *tetraselmis suesica* y *chlorella vulgaris* ocasiona una disminución significativa en su recuento celular (Gong et al., 2016).

Composición química

La composición química varía de especie a especie en las microalgas (Richmond 2004); la concentración de proteína oscila alrededor de 6-52 %, grasa de 7-23 % y carbohidratos de 5-23% (Harris 1980). La composición química de *N. Incerta* fue diferente para todos los tratamientos; las cenizas oscilaron de 28.9-49.9 %, proteínas de 12.5-28.9 %, grasa de 15.4-30.4 % y carbohidratos de 5.0-25.81 % en base seca (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de los diferentes medios limitantes en nitrógeno y niveles de salinidad sobre la composición química de *Navicula incerta*.

Medios	Salinidad (UPS)	Cenizas (%)	Proteínas (%)	Grasa (%)	Carbohidratos(%)
F/2	25	34.99 ^{d,e} ± 3.33	28.90 ^a ± 1.75	26.38 ^b ± 0.83	9.73 ^b ± 1.97
	35	49.60 ^a ± 0.60	19.83 ^d ± 0.4	25.52 ^b ± 0.04	5.05 ^a ± 0.84
	45	34.65 ^{c,d} ± 0.65	22.33 ^c ± 0.44	21.85 ^c ± 1.64	21.17 ^d ± 1.24
	55	33.11 ^d ± 1.39	24.74 ^{b,c} ± 1.97	16.34 ^d ± 1.62	25.81 ^e ± 2.66
F/4	25	39.67 ^{b,c,d} ± 1.74	25.83 ^{b,c} ± 0.44	24.69 ^b ± 0.35	9.81 ^b ± 0.84
	35	49.92 ^a ± 0.89	16.87 ^{e,f} ± 0.93	25.14 ^b ± 0.38	8.07 ^b ± 0.38
	45	28.90 ^e ± 1.64	26.71 ^{a,b} ± 1.31	30.45 ^a ± 0.83	13.94 ^c ± 1.92
	55	49.90 ^a ± 5.20	22.33 ^c ± 0.44	15.47 ^d ± 0.10	12.30 ^c ± 1.91
F/8	25	38.70 ^{b,c,d} ± 1.49	20.83 ^{c,d} ± 1.06	20.40 ^c ± 0.18	20.07 ^d ± 0.91
	35	44.55 ^{a,b} ± 1.03	12.50 ^g ± 0.43	26.33 ^b ± 0.11	16.62 ^c ± 1.09
	45	45.43 ^{a,b} ± 3.12	14.89 ^f ± 1.75	22.37 ^c ± 0.27	17.31 ^d ± 1.71
	55	42.77 ^{a,b,c} ± 1.45	16.62 ^e ± 0.03	22.26 ^c ± 0.14	18.35 ^d ± 1.63

UPS= Unidad Práctica de Salinidad. Se aplicó un análisis de varianza de dos vías por columna. Medias con diferentes superíndices indican diferencias significativas. ± División estándar de tres repeticiones n=3.

La interacción entre los diferentes factores estudiados (medios limitantes en nitrógeno y niveles de salinidad) sobre la composición química tuvo una influencia significativa para todos los tratamientos. Uno de los factores más importantes fue el medio intermedio en limitación de nitrógeno (F/4) a una salinidad de 45 UPS. La fracción mineral (cenizas) se reduce cuando se encuentra un pico de biomasa alto y aumenta cuando hay alta salinidad en el medio (Mansour & Salama, 2004). Sin embargo, la combinación de salinidad y baja concentración de nitrógeno no tuvo mucho efecto sobre la fracción de minerales. Los valores más altos de cenizas encontradas fueron a salinidades de 35 UPS, que es la salinidad promedio del mar, esto para cada medio limitante.

La combinación más eficiente de factores que reduce el porcentaje significativamente de la fracción mineral se encontró en el medio F/4 a una salinidad de 45 PSU ($28,90 \pm 1,64$ %) ($p < 0,05$). Se encontró un efecto significativamente ($p < 0,05$) sobre las proteínas, grasas y carbohidratos a concentraciones bajas de nitrógeno en todos los niveles de salinidades. Las proteínas fueron significativamente altas ($p < 0,05$) en el medio F/2 a salinidades de 25 PSU ($28,90 \pm 1,75$ %). La grasa obtenida del medio F/2 fue disminuyendo conforme aumentaba la salinidad, mientras que, en el medio más limitado se mostró lo contrario, entre más concentración salina en el medio, más grasa se encontró, no obstante, el medio que tuvo el nivel óptimo de producción fue el medio F/4 ($30,45 \pm 0,83$ %) a una salinidad de 45 UPS. Se observó en el medio F/2 un aumento en la producción de carbohidratos ($25,81 \pm 2,66$ %) con alta concentración de salinidad (55 PSU).

Gran parte de la población de microalgas resiste cambios ambientales extremos y son tolerantes a grandes variaciones, como concentraciones bajas o altas de nitrógeno y niveles de salinidad, afectando su composición química (Brown et al., 1996; Richmond, 2004). El aumento de la fracción mineral podría estar relacionado con la presión osmótica que desencadena una producción de silicatos como efecto protector de osmoregulación por la célula (Mansour & Salama 2004) y así reflejarse como un aumento en la producción de cenizas. Las proteínas disminuyeron con la baja

concentración de nitrógeno, ya que la vía metabólica puede conducir a la formación de clorofila puesto que la clorofila tiene cuatro átomos de nitrógeno en su estructura de porfirina, siendo de gran importancia para la fotosíntesis y por lo tanto la producción de compuestos orgánicos (Richmond 2004). Probablemente, la interacción de los medios limitantes en nitrógeno y altas salinidades continúan con la producción de grasas y carbohidratos para proteger a la célula del estrés celular causado por los factores evaluados.

Optimización para la producción de pigmentos

Diseño central compuesto, modelado y metodología de superficie de respuesta

La tabla 5 muestra la matriz de Diseño Central Compuesto (CCD) para la optimización de la producción de pigmentos a partir de microalgas *Navicula incerta*. En este documento, se recapitulan las diferentes condiciones de crecimiento para obtener clorofilas y carotenoides, y la comparación entre las respuestas de fórmulas experimentales y predichas. El modelo experimental utilizado dio como resultado una ecuación polinómica de segundo orden para cada variable, que representa la producción de pigmentos con diferentes tratamientos para las condiciones de cultivo (Tabla 6).

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó para validar las ecuaciones de los modelos cuadráticos utilizados para cada variable de respuesta. Los resultados de la validación de ANOVA se presentan en la Tabla 7, 8 y 9 para cada variable. Los modelos cuadráticos fueron significativos ($p < 0.001$), tal como se evidencia porque presenta un valor p bajo (Modelo de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales). Además, se realiza el significado de cada "falta de ajuste" y los parámetros estimados (coeficiente, error estándar, valor F y valor p) se enumeran en cada tabla correspondiente a cada modelo estudiado.

Tabla 5. Matriz de Diseño Central Compuesto (DCC). Optimización para la producción de pigmentos de la microalga *Navicula incerta*.

Corrida s	Patrón	Variables experimentales				Variables respuestas			Predichos		
		X ₁ (Medio)	X ₂ (Salinidad)	X ₃ (Día)	X ₄ (Solvent)	C _a μg/mL	C _b μg/mL	C _{x+c} μg/mL	C _a μg/mL	C _b μg/mL	C _{x+c} μg/mL
1	++++	3	55	1	3	0.381	0.740	0.114	0.458	0.676	0.168
2	00a0	2	40	1	2	0.458	0.667	0.139	0.546	0.879	0.205
3	+++-	3	55	6	1	0.734	0.836	0.232	0.760	0.777	0.218
4	----	1	25	1	1	0.391	0.868	0.098	0.407	0.788	0.125
5	000A	2	40	3.5	3	0.631	0.848	0.225	0.686	0.743	0.208
6	+---	3	25	1	1	0.559	0.738	0.054	0.483	0.662	0.018
7	0a00	2	25	3.5	2	0.444	0.627	0.144	0.573	0.699	0.201
8	++++	3	25	1	3	0.507	0.745	0.154	0.461	0.702	0.102
9	A000	3	40	3.5	2	0.631	0.670	0.229	0.626	0.645	0.246
10	a000	1	40	3.5	2	0.737	0.685	0.266	0.743	0.677	0.242
11	00A0	2	40	6	2	0.918	1.155	0.347	0.831	0.910	0.275
12	----+	1	25	1	3	0.570	0.733	0.156	0.567	0.782	0.153
13	-+++	1	55	1	3	0.633	0.807	0.191	0.534	0.803	0.166
14	--+-	1	25	6	1	0.832	0.643	0.279	0.779	0.699	0.209
15	000a	2	40	3.5	1	0.713	0.649	0.180	0.658	0.721	0.191
16	-+++	1	55	6	1	0.866	0.699	0.088	0.888	0.760	0.158
17	+++--	3	25	6	1	0.546	0.741	0.173	0.621	0.762	0.216
18	++++	3	55	6	3	0.696	0.731	0.233	0.655	0.828	0.224
19	0A00	2	55	3.5	2	0.754	0.822	0.271	0.626	0.717	0.208
20	++++	3	25	6	3	0.546	0.741	0.173	0.531	0.808	0.179
21	-+--	1	55	1	1	0.349	0.881	0.118	0.388	0.804	0.095
22	++--	3	55	1	1	0.490	0.548	0.050	0.494	0.631	0.041
23	-+++	1	55	6	3	0.866	0.699	0.088	0.965	0.766	0.107
24	0000	2	40	3.5	2	0.678	0.700	0.240	0.676	0.749	0.248
25	0000	2	40	3.5	2	0.678	0.700	0.240	0.676	0.749	0.249
26	---+	1	25	6	3	0.900	0.763	0.089	0.872	0.698	0.116

Medios= (1) F/2= 0.88 mol·L⁻¹, (2) F/4= 0.44 mol·L⁻¹, (3) F/8= 0.22 mol·L⁻¹ de concentración de nitrógeno. Salinidad= UPS (Unidades practicas de salinidad). Solvente: (1) Acetona, (2) metanol, (3) etanol.

Tabla 6. Ecuaciones polinomiales de segundo orden para tres factores respuesta en términos de factores codificados obtenidas de la aplicación del diseño central compuesto.

Pigment	Ecuaciones
Clorofila a	$Y_{C_a} = 0.6762 + (-0.0586) x_1 + 0.0263 x_2 + 0.1426 x_3 + 0.0139 x_4 + 0.0076 x_1 x_2 + (-0.0585) x_1 x_3 + (-0.0456) x_1 x_4 + 0.032 x_2 x_3 + (-0.0036) x_2 x_4 + (-0.017) x_3 x_4 + 0.0084 x_1^2 + (-0.0766) x_2^2 + 0.0122 x_3^2 + (-0.0036) x_4^2 + error$
Clorofila b	$Y_{C_b} = 0.750 + (-0.016) x_1 + 0.0091 x_2 + 0.0156 x_3 + 0.0113 x_4 + (-0.0118) x_1 x_2 + 0.0477 x_1 x_3 + 0.0114 x_1 x_4 + 0.0116 x_2 x_3 + 0.0013 x_2 x_4 + 0.0016 x_3 x_4 + (-0.0887) x_1^2 + (-0.0416) x_2^2 + 0.1449 x_3^2 + (-0.0176) x_4^2 + error$
Carotenoides totales	$Y_{C_{x+c}} = 0.249 + 0.0022 x_1 + 0.0036 x_2 + 0.0349 x_3 + 0.0084 x_4 + 0.0133 x_1 x_2 + 0.0286 x_1 x_3 + 0.014 x_1 x_4 + (-0.0053) x_2 x_3 + 0.0106 x_2 x_4 + (-0.0303) x_3 x_4 + 0.0039 x_1^2 + 0.0439 x_2^2 + 0.0083 x_3^2 + (-0.0489) x_4^2 + error$

(Y_{C_a}) Clorofila a. (Y_{C_b}) Clorofila b. ($Y_{C_{x+c}}$) Carotenoides totales. (x_1) Medios. (x_2) Salinidades. (x_3) Días. (x_4) Solventes.

Tabla 7. Modelo estadístico de la optimización para la producción de clorofila a.
Análisis de Varianza

Variación de las fuentes	GL	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	Valor de F	Valor de <i>p</i>
Modelo	14	0.58	0.04	4.447	<i>P</i> < 0.001
Error	11	0.10	0.01	Prob > F	
C. Total	25	0.68		0.0087	
Falta de ajuste (Lack of fit)					
Lack-of-Fit	10	0.10	0.10	Prob > F	
Error Puro	1	0.00	0.00		
Error Total	11	0.10			
Parámetros Estimados					
Fuente	GL	Coefficiente	Error estándar	F	Valor de <i>p</i>
Intercepto	1	0.680	0.038	18.96	< 0.0001*
X ₁ (Medio: 1,3)	1	-0.059	0.022	15.83	< 0.0001*
X ₂ (salinidad: 25,55)	1	0.026	0.022	62.89	< 0.0001*
X ₃ (Día: 1,6)	1	0.140	0.022	673.3	< 0.0001*
X ₄ (Solvente: 1,3)	1	0.013	0.022	1.22	0.2939**
X ₁ ² (Medio*Medio)	1	0.008	0.060	0.14	0.5546**
X ₂ ² (salinidad*salinidad)	1	-0.077	0.060	0.08	0.7753**
X ₃ ² (Día*Día)	1	0.012	0.060	40.04	< 0.0001*
X ₃ ² (Solvente*Solvente)	1	-0.004	0.060	0.06	0.1213**
X ₁ X ₂ (Medio*Salinidad)	1	0.008	0.024	38.59	< 0.0001*
X ₁ X ₃ (Medio*Día)	1	-0.059	0.024	51.16	< 0.0001*
X ₁ X ₄ (Medio*Solvente)	1	-0.046	0.024	-1.89	< 0.0001*
X ₂ X ₃ (Salinidad*Día)	1	0.032	0.024	1.33	0.0003*
X ₂ X ₄ (Salinidad*Solvente)	1	-0.004	0.024	42.04	< 0.0001*
X ₃ X ₄ (Día*Solvente)	1	-0.017	0.024	7.04	0.0010*

**P* < 0.05; ** *P* > 0.05.

Tabla 8. Modelo estadístico de la optimización para la producción de clorofila *b*.

Análisis de Varianza					
Variación de las fuentes	Variación de las fuentes	Variación de las fuentes	Variación de las fuentes	Variación de las fuentes	Variación de las fuentes
Modelo	14	0.12	0.01	4.442	
Error	11	0.20	0.02	Prob > F	$p > 0.001$
C. Total	25	0.32		0.9242	
Falta de ajuste (Lack of fit)					
Lack-of-Fit	10	0.21	0.02	Prob > F	
Error Puro	1	0.00	0.00		
Error Total	11	0.21			
Parámetros Estimados					
Fuente	GL	Coefficientes	Error estándar	F	Valor de p
Intercepto	1	0.751	0.054	38.85	< 0.0001*
X ₁ (Medio: 1,3)	1	-0.016	0.032	2.98	0.0515**
X ₂ (salinidad: 25,55)	1	0.009	0.032	4.97	0.0261*
X ₃ (Día: 1,6)	1	0.156	0.032	54.16	< 0.0001*
X ₄ (Solvente: 1,3)	1	0.011	0.032	24.71	< 0.0001*
X ₁ ² (Medio*Medio)	1	-0.088	0.086	0.14	0.1481**
X ₂ ²	1	-0.042	0.086	2.05	0.1524**
(salinidad*salinidad)					
X ₃ ² (Día*Día)	1	0.145	0.086	26.71	< 0.0001*
X ₃ ²	1	-0.018	0.086	4.56	0.0080*
(Solvente*Solvente)					
X ₁ X ₂	1	-0.011	0.034	2.32	0.0989**
(Medio*Salinidad)					
X ₁ X ₃ (Medio*Día)	1	0.047	0.034	84.35	< 0.0001*
X ₁ X ₄	1	0.011	0.034	38.86	< 0.0001*
(Medio*Solvente)					
X ₂ X ₃ (Salinidad*Día)	1	0.011	0.034	9.51	0.0007*
X ₂ X ₄	1	0.002	0.034	4.86	0.0080*
(Salinidad*Solvente)					
X ₃ X ₄ (Día*Solvente)	1	0.002	0.034	7.29	0.0010*

* $P < 0.05$; ** $P > 0.05$

Tabla 9. Modelo estadístico de la optimización para la producción de carotenoides totales.

Análisis de Varianza					
Variación de las fuentes	Variación de las fuentes	Variación de las fuentes	Variación de las fuentes	Variación de las fuentes	Variación de las fuentes
Modelo	14	0.11	0.07	2.105	<i>p</i> > 0.001
Error	11	0.04	0.03	Prob > F	
C. Total	25	0.15		0.1102	
Falta de ajuste (Lack of fit)					
Lack-of-Fit	10	0.04	0.04	Prob > F	
Error Puro	1	0.00	0.00		
Error Total	11	0.04			
Parámetros Estimados					
Fuente	GL	Coefficientes	Error estándar	F	Valor de <i>p</i>
Intercepto	1	0.248	0.024	6.78	< 0.0001*
X ₁ (Medio: 1,3)	1	-0.002	0.014	7.51	0.0006*
X ₂ (salinidad: 25,55)	1	0.003	0.014	26.85	< 0.0001*
X ₃ (Día: 1,6)	1	0.034	0.014	457.75	< 0.0001*
X ₄ (Solvente: 1,3)	1	0.008	0.014	46.01	< 0.0001*
X ₁ ² (Medio*Medio)	1	-0.004	0.038	3.63	0.0003*
X ₂ ² (salinidad*salinidad)	1	-0.044	0.038	24.22	< 0.0001*
X ₃ ² (Día*Día)	1	-0.008	0.038	5.1	0.0234*
X ₃ ²	1	-0.049	0.038	-1.30	0.0320*
(Solvente*Solvente)					
X ₁ X ₂ (Medio*Salinidad)	1	0.013	0.015	17.46	< 0.0001*
X ₁ X ₃ (Medio*Día)	1	0.029	0.015	43.92	< 0.0001*
X ₁ X ₄ (Medio*Solvente)	1	0.014	0.015	41.96	< 0.0001*
X ₂ X ₃ (Salinidad*Día)	1	-0.005	0.015	4.08	0.0436*
X ₂ X ₄ (Salinidad*Solvente)	1	0.016	0.015	5.25	0.0055*
X ₃ X ₄ (Día*Solvente)	1	-0.032	0.015	15.99	< 0.0001*

**P* < 0.05; ** *P* > 0.05.

El alto grado de significancia se obtuvo con la combinación de "falta de ajuste" ($p > 0.05$), gran valor F y pequeño valor p . La "falta de ajuste" no es significativa ($\text{Prob} > F$), porque no hay falta de ajuste en el modelo, lo que es favorable en el estudio. El pequeño valor de p (< 0.001) indica que el modelo se puede usar para optimizar las variables de condiciones de crecimiento (Dahmoune et al., 2014). Posteriormente, se comparó el coeficiente de valor experimental y de predicción, utilizando una regresión lineal para cada variable de respuesta (Fig. 8). Los coeficientes de determinación fueron $R^2 = 0.98$, $R^2 = 0.82$ y $R^2 = 0.92$ para las variables Clorofila a, Clorofila b y carotenoides totales, respectivamente. A medida que la polaridad aumentaba, la extracción de compuestos aumentaba. Sin embargo, las Figuras 9B y 9E muestran el punto máximo de superficie, pero a diferencia de la clorofila, una gráfica de ambas superficies está dentro de la región del experimento. La variabilidad de la producción de clorofila b dependió de la interacción del medio de salinidad, donde la interacción entre el medio de salinidad fue mayor. En la Figura 9B, el punto máximo se presentó en el medio F/4, en esta interacción (medio de salinidad) y el gran disolvente en este caso fue el metanol, ambas gráficas de superficie de la clorofila b encontradas se encuentran dentro de la región del experimento. La producción de carotenoides aumentó en el medio F/8 (el medio más limitante en nitrógeno), sin embargo, la superficie se encontró fuera de la región experimental, probablemente en un medio más limitado se alcanzaría el punto máximo de producción. Mientras que el mejor disolvente para extraerlos fue el metanol, ya que se encuentra en la parte central del gráfico de superficie.

El disolvente jugó un papel importante en la obtención de pigmentos antioxidantes, ya que, cada pigmento se extrae en diferentes cantidades, en consecuencia, a la polaridad. Las variaciones en la producción de pigmentos dependían del bajo contenido de nitrógeno y del extractor diferente. La deficiencia de nitrógeno y las altas salinidades (por encima del control) aumentaron el contenido de clorofila y carotenoides. Estos resultados contradicen lo dicho por Gong y Bassi (2016), y Minhas et al. (2016), donde observaron que hay una reducción significativa en la producción de estos pigmentos en *Dunaliella* sp. *Nitzquia* sp. y *Scenedesmus* sp.

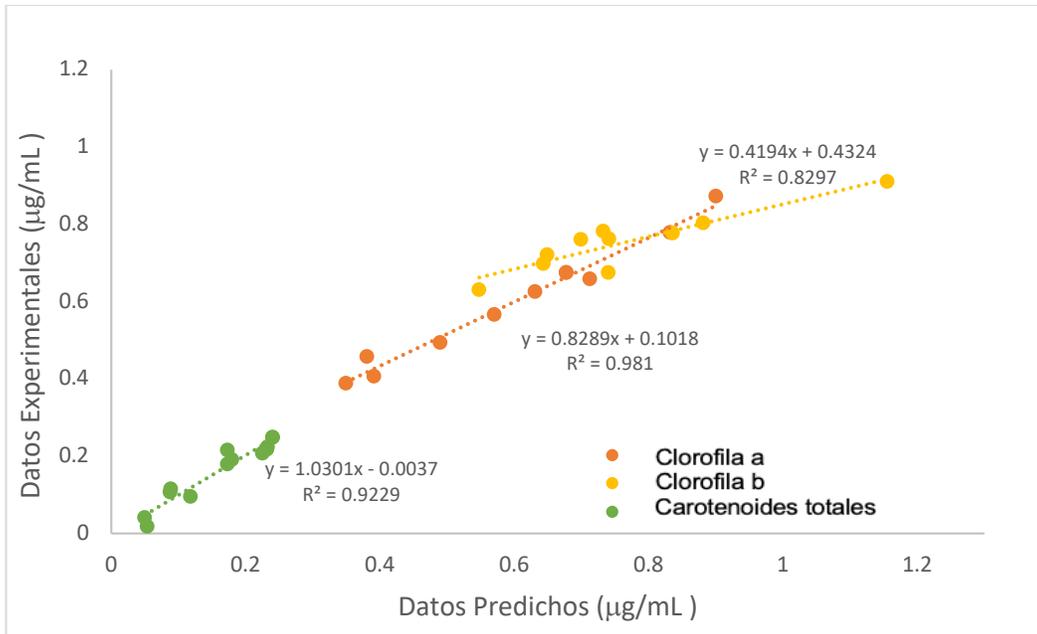


Figura. 8. Gráfica de correlación de los valores experimentales vs predichos para la producción de pigmentos de *Navicula incerta*.

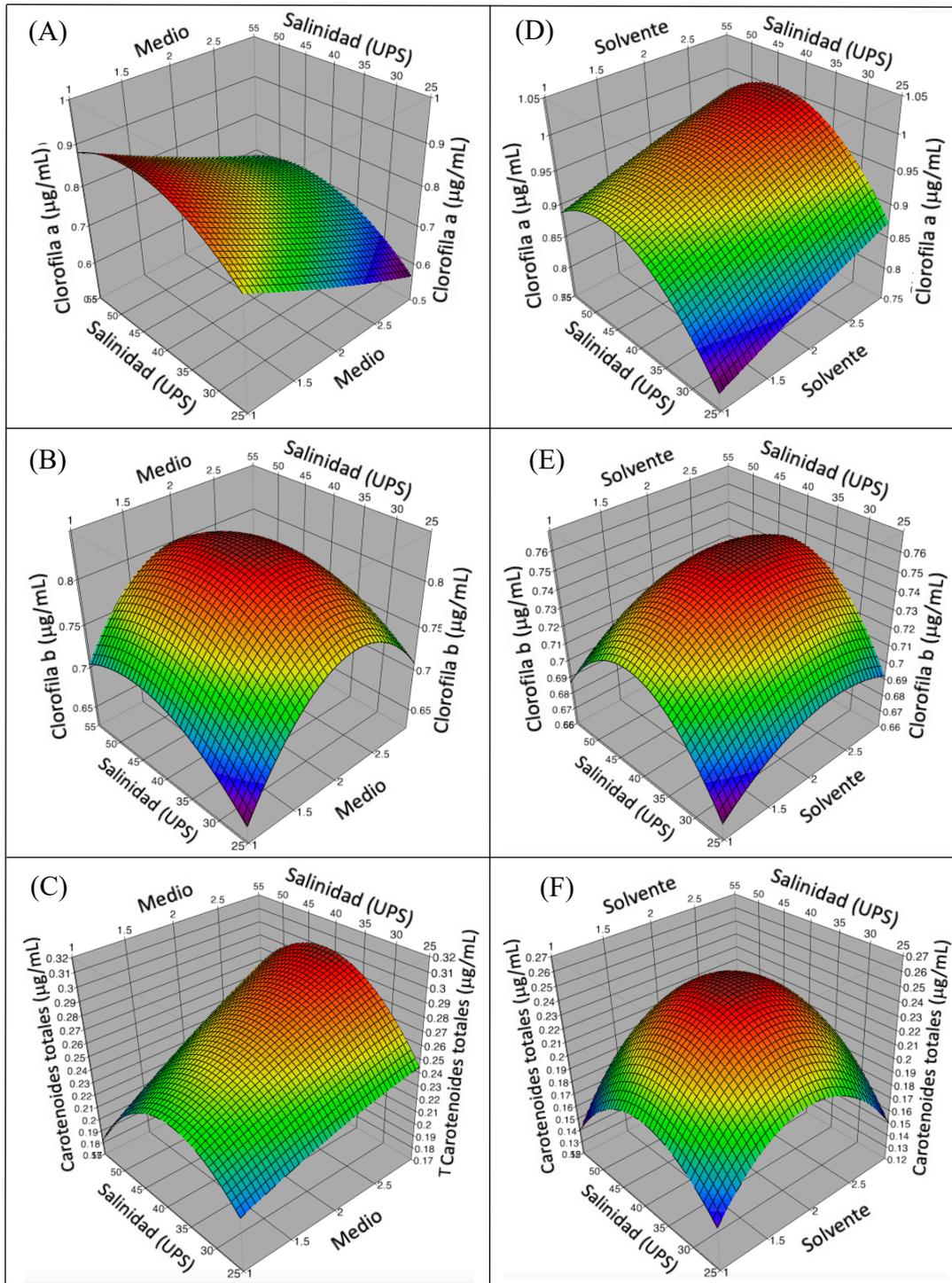


Figura 9. Gráfico de superficie de respuesta de pigmentos de *N. incerta*. Efecto de la salinidad y el disolvente: (A) Clorofila a; (B) clorofila b; (C) Carotenoides totales. Efecto de la salinidad y el medio: (D) Clorofila a; (E) Clorofila b; (F) Carotenoides totales.

Estas diferencias se deben a la especie utilizada y a uno de los factores más importantes, la interacción con altas salinidades y el diseño de experimentos avanzados utilizados en nuestra investigación. Este diseño busca la mejor interacción entre diferentes factores, utilizando una ecuación polinomial cuadrática que origina una superficie máxima para obtener los mejores valores. Por otro lado, la producción de pigmentos se reflejó en la capacidad antioxidante. Nuestro estudio demostró que el uso de un modelo de optimización de cultivo para microalgas en condiciones de estrés debido al déficit de nitrógeno y la salinidad, aumenta la capacidad antioxidante. Mientras que en estudios de Gong y Bassi (2016) se observó que, a mayor deficiencia de nitrógeno, la actividad antioxidante junto con la composición de los pigmentos disminuye.

La metodología de la superficie de respuesta demostró ser una herramienta muy útil para obtener pigmentos antioxidantes. El disolvente de metanol ha mostrado un gran potencial para extraer clorofilas y carotenoides totales de *N. incerta*. La optimización de las condiciones de crecimiento se llevó a cabo mediante un diseño central compuesto (CCD) con factores controlados, como la concentración de nitrógeno, la salinidad y el día de la cosecha. De acuerdo con la ecuación polinomial de segundo orden, la concentración máxima de clorofila a, b y carotenoides en el extracto podría obtenerse usando el medio F/4, 40 UPS, en el día 3.5 de la recolección y usando metanol como agente extractor.

ETAPA II

Determinación de la toxicidad y caracterización biológica de extractos de *Navicula incerta*

Ensayos toxicológicos

Bioensayo de toxicidad aguda mediante nauplios de *Artemia salina*

La Tabla 10 muestra el promedio de nauplios de *Artemia salina* vivos y muertos por efecto de los extractos de *N. incerta*. La exposición de *Artemia salina* al extracto acetónico y etanólico se puede considerar relativamente inocuas ($> 1500 \mu\text{g/mL}$), con un porcentaje de grado de toxicidad de 50 ± 1.73 y 46.67 ± 1.53 %, y una dosis letal media (DL_{50}) mayor a $1500 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabla 11). Mientras que el extracto metanólico se clasificó como virtualmente no tóxico ($1000\text{-}1500 \mu\text{g/mL}$) con una $DL_{50}=1256 \mu\text{g/mL}$. Este resultado es beneficioso para este estudio, ya que el etanol es el solvente aprobado por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos, por sus siglas en inglés) para su uso posterior en el diseño de un alimento funcional. A pesar de esto, todos los solventes se consideraron relativamente inocuos y prácticamente no tóxicos.

El nauplio *A. salina* es considerada como un modelo de prueba para clasificar la toxicidad de un nuevo compuesto. Estos análisis toxicológicos se deben llevar a cabo para desarrollar una forma más segura para el uso de compuestos bioactivos como agente quimiopreventivo o curativo (fármaco) (Neves et al., 2017). Los compuestos extraídos de *N. incerta* resultaron inocuos. Sin embargo, se ha observado que los solventes orgánicos muestran diferencias notables en la toxicidad probadas en las diferentes edades de *Artemia salina* (Barahona-Gomariz et al., 1994).

Tabla 10. Promedio de nauplios de *Artemia salina* vivos y muertos.

Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Vivos			Muertos		
	Extracto Acetónico	Extracto Metanólico	Extracto Etanólico	Extracto Acetónico.	Extracto Metanólico	Extracto Etanólico
5	9.7 \pm 0.58	9.7 \pm 0.58	9.3 \pm 1.15	0.33 \pm 0.58	0.33 \pm 0.58	0 \pm 0
50	9.7 \pm 0.58	10 \pm 0.00	10 \pm 0.00	0.33 \pm 0.58	0 \pm 0	0.67 \pm 1.15
250	10 \pm 0.00	9.7 \pm 0.58	7 \pm 2.00	0 \pm 0	0.33 \pm 0.58	1.67 \pm 0.58
750	8.7 \pm 0.53	8.7 \pm 0.58	8.3 \pm 0.58	1.33 \pm 1.53	0.33 \pm 0.58	3.00 \pm 2.00
1250	6.7 \pm 1.15	5 \pm 3.00	6 \pm 1.00	3.33 \pm 1.15	5.00 \pm 3.00	3.67 \pm 0.58
1500	5 \pm 1.73	3.3 \pm 2.52	6.3 \pm 0.58	5.00 \pm 1.73	6.67 \pm 2.52	4.67 \pm 1.53

LC₅₀ >1500 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

LC₅₀= Concentración Letal media

Tabla 11. Grado de toxicidad de extractos de *Navicula incerta* a diferentes concentraciones.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Grado de toxicidad (%)		
	Ex. Acet.	Ex. MetOH	Ex. EtOH
5	3.33 \pm 0.58	3.33 \pm 0.58	0 \pm 0
50	3.33 \pm 0.58	0 \pm 0	6.67 \pm 1.15
250	0 \pm 0	3.33 \pm 0.58	16.67 \pm 0.58
750	13.33 \pm 1.53	13.33 \pm 0.58	30.00 \pm 2.00
1250	33.33 \pm 1.15	50.00 \pm 3.00 *	36.67 \pm 0.58
1500	50.00 \pm 1.73 **	66.67 \pm 2.52	46.67 \pm 1.53 **

* (V) Virtualmente no tóxico (1000-1500 $\mu\text{g/mL}$)

** (R) Relativamente inocuo (>1500 $\mu\text{g/mL}$)

Para extraer los compuestos de interés es necesario seleccionar el mejor disolvente, ya que su baja o nula toxicidad se requiere para la administración en modelos de estudio *in vivo*. Adicionalmente, desarrollar compuestos menos tóxicos que las drogas sintéticas es importante, ya que actualmente existen fármacos con efectos secundarios dañinos para la salud.

Acción citotóxica de extractos de *N. incerta* sobre los diferentes grupos sanguíneos ABO y Rh presentes en la membrana plasmática de eritrocitos

El estrés oxidativo causa daños severos en todas las células, principalmente sobre sus membranas plasmáticas. En los glóbulos rojos o eritrocitos sanguíneos, un indicador de daño celular es la aparición de hemólisis que puede conducir a la muerte celular. De acuerdo con la prueba aplicada, los extractos mostraron baja toxicidad sobre los eritrocitos, ya que no se observó una degradación de la membrana plasmática fuerte o una hemólisis profunda bajo la concentración utilizada (150 µg/mL) (Fig. 10). Sin embargo, se observaron diferentes valores de toxicidad entre los tratamientos. En esta parte se obtuvieron resultados muy interesantes, ya que se observó que el solvente encargado de la extracción arrastró probablemente compuestos diferentes los cuales pudieron causar que se presentaran resultados con diferencias significativas entre los extractos. No obstante, la segunda variable estudiada (grupos sanguíneos ABO y Rh) mostraron resultados significativamente diferentes ($p < 0.05$). Los extractos acetónicos y etanólicos mostraron los resultados más relevantes en este estudio. Se observa una dependencia de los posibles metabolitos en cada extracto con su acción citotóxica; es decir, el efecto tóxico del extracto acetónico (1.28 %) sobre el grupo O+ fue menor al presentado por el extracto etanólico (14.73 %).

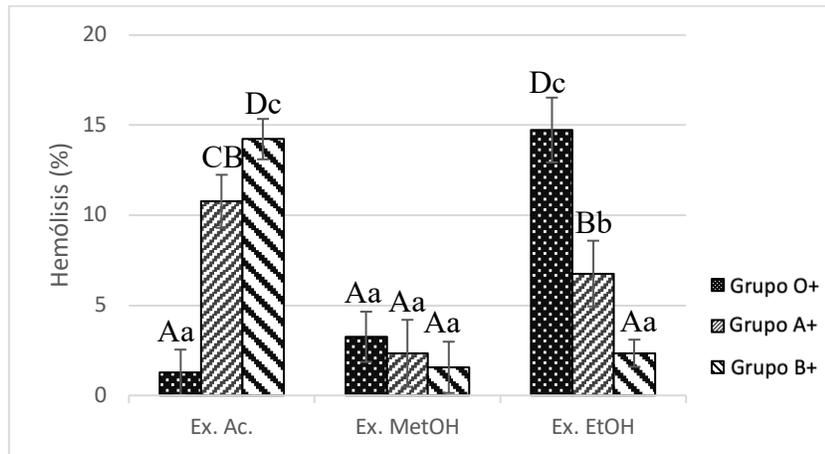


Figura 10. Efecto de la hemólisis directa de extractos de *N. incerta* sobre eritrocitos de los grupos sanguíneos positivos A, B y O. La concentración de extractos fue de 150 µg/mL. Todos los datos se analizaron mediante la prueba *t-Student*. Todos los datos se analizaron mediante un ANOVA. Letra diferente significa diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Las medias con diferentes letras minúsculas se analizaron mediante ANOVA de una vía. Las medias con diferentes letras mayúsculas se analizaron mediante ANOVA bidireccional.

La baja actividad citotóxica del extracto acetónico bajo los tipos de sangre Rh se observó por la falta de hemólisis significativa a la concentración probada (150 µg/mL) (Fig. 11). Por otro lado, se presentaron resultados similares sobre la toxicidad en la sangre con RhD+ve y RhD-ve. Es decir, los extractos acetónicos y etanólicos fueron los que presentaron diferencias significativas más notables. Donde, la sangre RhD+ve es más susceptible a la toxicidad por los compuestos bioactivos que se pueden encontrar en los extractos probados (10-15% de la hemólisis). Actualmente, se encuentran diferentes sistemas sanguíneos, pero el más utilizado es el sistema sanguíneo tipo ABO. Estas son proteínas transmembranales considerados como antígenos de superficie de los glóbulos rojos. Los tipos sanguíneos ABO y Rh se caracterizan como epítopes de carbohidratos que dependen de la presencia o ausencia de genes A y B que se colocan en el cromosoma 9q34 (Farhud y Yeganeh, 2013). Además, este sistema es el más utilizado para transfusiones de sangre humana, es el principal transportador de macro y micromoléculas bioactivas (Siransy et al. 2015). Pero no hay validez con un modelo estadístico multivariado que valida la asociación directa de toxicidad en diferentes grupos sanguíneos. Mientras que el Rh, son un grupo de proteínas donde destaca como de mayor relevancia el Antígeno D que es el que pueda estar interfiriendo en el aumento o disminución del efecto citotóxico de estos compuestos bioactivos.

Conocer la toxicidad sobre los eritrocitos sanguíneos de los nuevos compuestos estudiados dirigidos a la quimioprevención de enfermedades crónico-degenerativas es muy importante. Además, se ha observado una asociación entre los grupos sanguíneos ABO y Rh con la toxicidad de diferentes compuestos (Guerra et al. 2012). Este estudio podría ser de utilidad para emplearse en aquellas moléculas nuevas que tengan un efecto tóxico sobre un grupo sanguíneo en específico, es decir, cual grupo sanguíneo es más vulnerable a toxicidad. La información recaudada en esta investigación sería el primer estudio de toxicidad en extractos de microalgas. Por otro lado, todavía no existe una relación directa sobre cómo estos compuestos polimórficos los hacen más susceptibles a la toxicidad de los compuestos.

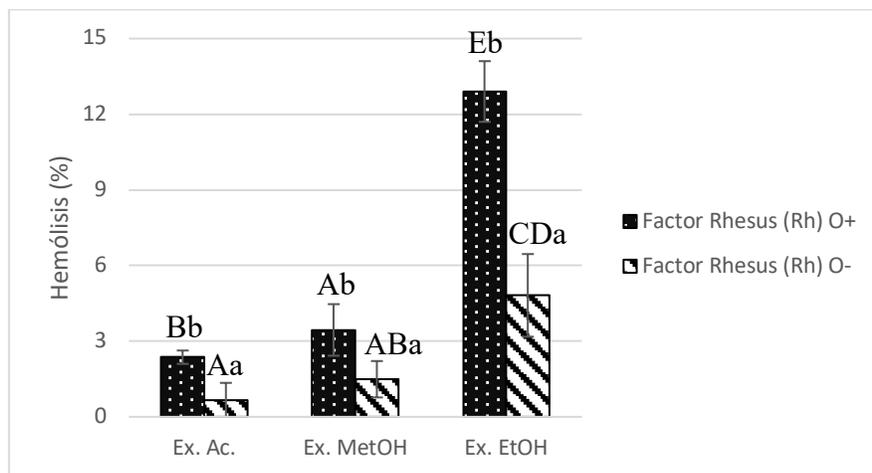


Figura 11. Hemólisis directa en eritrocitos O RhD+ve y O RhD-ve. La concentración de extractos fue de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Todos los datos se analizaron mediante la prueba *t-Student*. Todos los datos se analizaron mediante un ANOVA. Letra diferente significa diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Las medias con diferentes letras minúsculas se analizaron mediante ANOVA de una vía. Las medias con diferentes letras mayúsculas se analizaron mediante ANOVA bidireccional.

Asociación de diferentes grupos sanguíneos ABO y Rh con el efecto protector sobre eritrocito humano contra el estrés oxidativo

En estudios previos, se ha observado el alto efecto protector sobre eritrocitos humanos al inhibir la hemólisis inducida por AAPH mediante los derivados de pigmentos de microalgas. Sin embargo, no se ha estudiado la posible asociación de diferentes grupos sanguíneos ABO y Rh con el efecto protector sobre los eritrocitos humanos. Este análisis nos ayudará a comprender la posible interacción y/o dependencia entre el efecto protector con diferentes grupos sanguíneos que nos dará información sobre que tipo de interacción se pudiera estar observando entre los distintos compuestos en los extractos con los antígenos de superficie, y así poder comprender y dirigir estos compuestos dependiendo del grupo sanguíneo de cada persona. En general, todos los extractos mostraron alta capacidad para inhibir la generación de radicales libres inducidos por AAPH, reduciéndolos a su estado no reactivo. Esto previno la hemólisis celular por la degradación de la membrana eritrocitaria. Sin embargo, de acuerdo con el análisis estadístico aplicado, se encontró diferencias significativas entre los eritrocitos ABO (Fig. 12A) y los grupos Rh positivo y negativo (Fig. 12B) ($p < 0.001$) para cada extracto.

El extracto acetónico tuvo los valores más altos de actividad antihemolítica (83-98%) (Figura 12A). La mejor actividad antihemolítica se observó en los eritrocitos que presentan el antígeno A. El efecto del extracto etanólico mostró la misma tendencia que indica una alteración de la actividad biológica dependiendo de los antígenos presentes en la membrana de los eritrocitos (62-83 %). Aquí, el antígeno A causó una reducción en la actividad anti-hemolítica. El extracto metanólico fue el único que no mostró diferencias significativas entre los grupos sanguíneos ABO (68-77%) ($p > 0.05$). Los resultados indican que la presencia de antígenos ABO encontrados en la membrana eritrocitaria contribuye a la efectividad del extracto y la proporción de metabolitos contenidos en cada extracto. Estos datos sugieren una probable asociación entre los grupos ABO con la actividad antihemolítica.

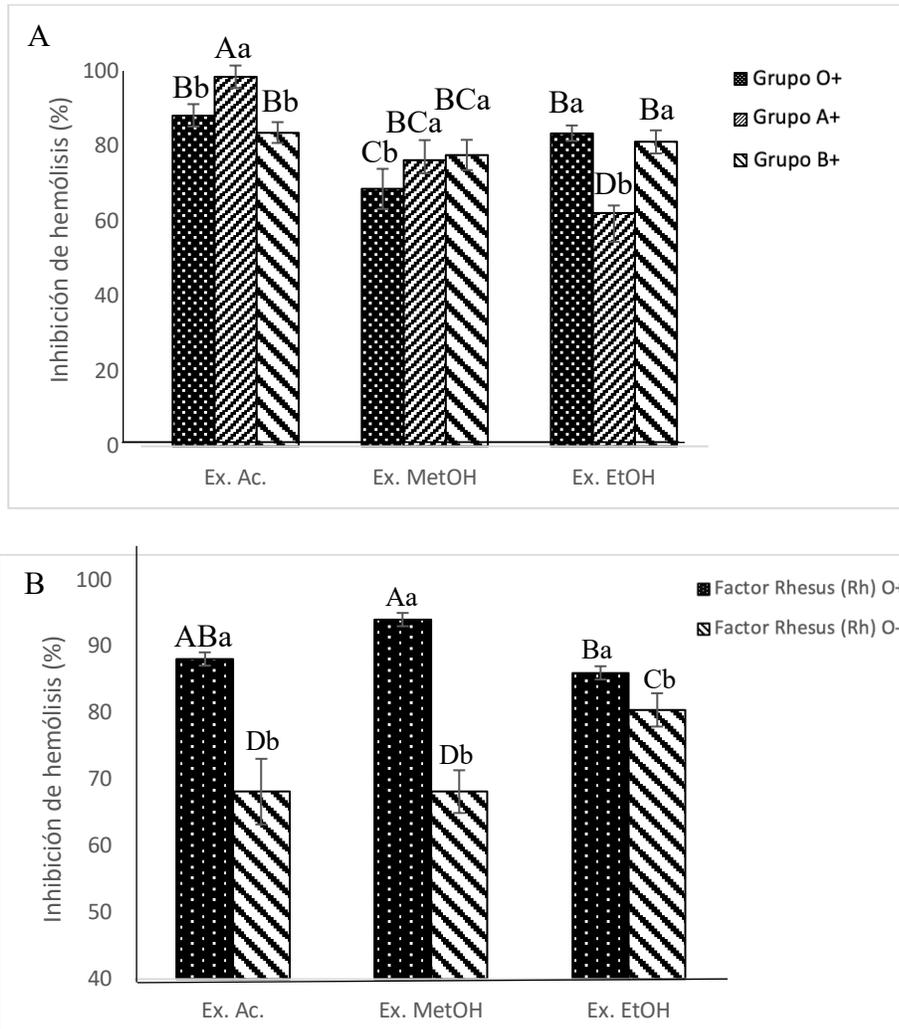


Figura 12. Actividad antihemolítica de extractos de *Navicula incerta* contra la hemólisis oxidativa de diferentes tipos de sangre ABO y Rh inducidos por AAPH. (A) Porcentaje de inhibición de la hemólisis en eritrocitos del grupo sanguíneo positivo A, B y O a una concentración de 150 $\mu\text{g/mL}$ de extractos de *N. incerta*. (B) Porcentaje de inhibición de la hemólisis en eritrocitos O RhD+ve y RhD-ve a una concentración de 150 $\mu\text{g/mL}$ de extractos de *N. incerta*. Todos los datos se evaluarán mediante el ANOVA. Letra diferente significa diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Las medias con diferentes letras minúsculas se analizaron mediante ANOVA de una vía. Las medias con diferentes letras mayúsculas se analizaron mediante ANOVA bidireccional.

La Figura 12B mostró una diferencia estadísticamente significativa entre los eritrocitos de los grupos Rh positivo y negativo ($p < 0.001$). La actividad antihemolítica de los tres extractos en eritrocitos con Rh (+) (86-94%) fue superior al efecto sobre Rh (-) (68-80%), disminuyendo su efecto en aproximadamente un 35%. La ausencia del factor Rhesus, es decir que no se expresa en la superficie de los RDC, provoca una alteración en el efecto de los extractos de *N. incerta* reduciendo la potencia antihemolítica. Esta causa no está bien estudiada; pero la presencia de esta proteína (Rh positiva) podría estar asociada con el efecto protector contra el daño oxidativo de los extractos. La formación de una biopelícula a partir de pigmentos se observó en la superficie de los eritrocitos por microscopía óptica, lo que da un efecto protector nuevamente a los radicales libres generados por AAPH.

La Tabla 12 muestra el OR y el grado de significación para comprender el efecto y la asociación entre los grupos sanguíneos y Rh con la actividad antihemolítica. Además de la diferencia significativa entre los grupos ABO y Rh presentados, es probable que el efecto protector del extracto acetónico y etanólico esté más asociado con los eritrocitos que tienen el antígeno A, porque tienen un OR de 1.19 (IC 95% = 0.17-2.22) y OR de 2.60 (IC 95% = 0.68-1.77), respectivamente. No se encontró asociación entre los diferentes grupos sanguíneos con el extracto metanólico. Por otro lado, se observa una asociación del efecto antihemolítico de los tres extractos (extracto acetónico, metanólico y etanólico) con la presencia del factor Rhesus (+) en la superficie del eritrocito con OR < 1 (2.61; 1.51; 1.47 respectivamente). Además, el factor Rhesus (-) realiza una probable asociación con el efecto antihemolítico del extracto etanólico con un OR = 1.28 (1.25-1.6).

En este estudio se analizó una probable asociación de los diferentes grupos sanguíneos con la actividad antihemolítica. Los resultados sugieren que los antígenos presentes en la superficie de los eritrocitos están relacionados con la efectividad de los compuestos encontrados en cada extracto. Los estudios podrían proporcionar información sobre el efecto de varios metabolitos en los eritrocitos una vez que están en la sangre periférica.

Tabla 12. Asociación del grupo sanguíneo ABO y el factor Rhesus (Rh) con actividad antihemolítica del extracto de *Navicula incerta*.

Grupos sanguíneos	Ex. Acet.	IC= 95%	Odds Ratio (OR)	Ex. MetOH	IC= 95%	Odds Ratio (OR)	Ex. EtOH	IC= 95%	Odds Ratio (OR)
O	88.30 ±2.98	0.14-0.46	0.29	68.67 ±5.34	0.43- 0.47	0.45	83.70 ±2.78	0.83-0.98	0.91
A	98.17 ±3.03	0.17-2.22	1.19	76.33 ±3.51	0.42-0.45	0.43	62.18 ±7.62	0.68-1.77	2.60
B	83.52 ±2.06	0.20-0.81	0.51	77.72 ±4.03	0.48-0.54	0.52	81.21 ±3.08	0.62-0.83	0.73
Rh (O+)	88.78 ±1.69	1.38-3.61	2.61	94.01 ±2.45	1.51-2.83	2.17	86.08 ±4.23	0.61-2.33	1.47
Rh (O-)	68.17 ±4.69	0.17-1.0	0.585	68.21 ±3.21	0.47-0.53	0.51	80.51 ±2.51	1.25-1.6	1.28

Todos los datos se evaluaron a intervalos de confianza (IC) del 95%. El valor de p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo. O > 1 se consideran con presencia de asociación; O ≤ 1 se clasifican como no asociados.

El efecto de los alimentos funcionales, nutraceuticos o medicamentos en desarrollo podría verse afectada por el grupo sanguíneo de las personas que reciben terapia quimiopreventiva. Además, estudios anteriores han informado que los grupos sanguíneos pueden estar asociados con la respuesta inflamatoria sistémica que está involucrada en el desarrollo del cáncer de seno (Aly et al. 2014; Meo et al. 2017). En particular, las personas que presentan el genotipo del antígeno A tienen un mayor probabilidad de desarrollar cáncer de seno (Peterson et al. 2009; Barbalic et al. 2010). Por otro lado, se ha observado que la asociación de los diferentes grupos sanguíneos con el riesgo de contraer cáncer de mama puede verse afectada por el índice de masa corporal (IMC) por debajo de los valores normales ($<18 \text{ cm} / \text{kg}^2$). Esta asociación se administra solo con tratamiento previo con quimioterapia, lo que causa una pérdida de peso significativa y aumenta el riesgo de cáncer de seno en personas con el antígeno A. Los grupos sanguíneos impactan en el efecto protector contra el daño oxidativo de los compuestos de *N. incerta*.

Probablemente, los antígenos de superficie ABO y Rh que expresan los eritrocitos pueden intervenir en el efecto protector de los pigmentos. La microscopía óptica ha observado la formación de una biocapa verde en la superficie de la membrana eritrocitaria. Los metabolitos secundarios, como los carotenoides o las clorofilas, podrían interactuar con estos antígenos, evitando el secuestro de electrones por los radicales generados por la AAPH. La biocapa de pigmentos podría estar actuando como un agente protector al inhibir los radicales sedimentando un electrón o un protón. Según los resultados obtenidos, con la ausencia del antígeno Rh el efecto protector es menor, ya que el extracto etanólico proporciona menos protección contra los radicales libres para el grupo sanguíneo A, mientras que con el extracto acetónico pasa lo contrario en presencia del antígeno A +, que potencializa la actividad biológica.

Una de las posibles aplicaciones es el desarrollo de nuevos productos tales como nutraceuticos basados en compuestos derivados de microalgas que podrían prevenir enfermedades crónicas. Se ha observado en estudios epidemiológicos que la población que presenta el antígeno A en la superficie de los eritrocitos tiene mayor

riesgo de contraer cáncer de pecho (Markt et al., 2015, Meo et al., 2017, Park et al., 2017). Es por ello, que contar con un agente quimiopreventivo sería muy eficiente e importante para crear productos biodirigidos a un sector de la población dependiendo de sus grupos sanguíneos ABO y Rh. Estos resultados podrían contribuir a la prevención de enfermedades crónico-degenerativas. Además, de poder aplicar un mejor tratamiento quimiopreventivo dependiendo del grupo sanguíneo ABO y Rh contra el riesgo de contraer estas patologías. En este estudio, el extracto acetónico podría ser un candidato para contribuir a la prevención del cáncer de mama en personas con el antígeno A.

Actividad antioxidante

Poder antioxidante reductor férrico (FRAP)

La capacidad antioxidante de los extractos varió de 390 a 766 $\mu\text{mol ET/g}$ de biomasa seca (Tabla 13). El extracto acetónico presentó la mayor capacidad antioxidante ($766.03 \pm 16.62 \mu\text{mol ET/g}$) a los 40 minutos de reacción. El poder reductor para reducir el Fe^{+3} a Fe^{+2} dependió del tiempo de reacción, que influyó directamente en la capacidad antioxidante obtenida. Los tres extractos mostraron la característica de presentar la mayor actividad a mayor tiempo de reacción. El extracto acetónico presenta la más alta actividad por encima del extracto metanólico y etanólico.

Es importante resaltar el mecanismo antioxidante que se está llevando a cabo mediante esta técnica antioxidante, ya que, se encuentra dentro del sistema óxido-reducción. Al reducir el Fe^{+3} a Fe^{+2} se presenta una donación de electrones por parte del compuesto antioxidante. Probablemente, los compuestos contenidos en los extractos siguen un mecanismo SET muy potente, logrando reducir al ion férrico a ferroso ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) (Prior *et al.*, 2005).

Tabla 13. Poder antioxidante reductor férrico de extractos obtenidos de la microalga *N. incerta*.

Extractos	$\mu\text{mol ET/g}$ de biomasa seca \pm DE			
	FRAP valores a diferentes tiempos (min)			
	10	20	30	40
Acetónico	672.90 ^{aB} \pm 18.23	685.97 ^{aB} \pm 16.62	678.55 ^{aB} \pm 28.26	766.03 ^{aA} \pm 16.62
Metanólico	573.91 ^{bB} \pm 23.3	582.01 ^{bAB} \pm 13.16	608.55 ^{bAB} \pm 21.3	630.46 ^{bA} \pm 23.3
Etanólico	390.16 ^{aC} \pm 6.71	427.24 ^{cB} \pm 15.51	479.91 ^{cA} \pm 15.89	483.29 ^{cA} \pm 6.71

Los datos se reportan en media \pm DE (desviación estándar) de al menos tres repeticiones ($n \geq 3$).

Diferentes superíndices representan diferencias significativas a $p < 0.05$.

^a Letras minúsculas: ANOVA por columna.

^A Letras minúsculas: ANOVA por fila.

Los resultados iniciales mostraron que los tres extractos crudos (acetónico, metanólico y etanólico) tienen alta actividad antioxidante, sobre todo en los extractos obtenidos por microalgas que se sometieron a estrés nutricional y salino. Lo anterior fue a pesar del hecho de que Gong y Bassi (2016), y Minhas et al. (2016) indicaron que la biomasa producida en condiciones deficientes de nitrógeno disminuye su capacidad antioxidante relacionada con la inhibición de radicales libres. Por lo tanto, en el estudio anterior no se consideró el poder reductor por FRAP, por lo que es probable que la relación mencionada sobre la cantidad de nitrógeno y la disminución de la capacidad antioxidante solo aplique en la inhibición de radicales libres y no en el poder reductor del hierro. El ensayo FRAP depende del potencial redox del compuesto; el poder reductor de las clorofilas y carotenoides presentes generalmente se asocia con la reducción de enlaces con ligaduras dobles (-C=C-) y enlaces alénicos (-C=C=C-) que tienen la capacidad de donar electrones donde se ha demostrado que estos enlaces ejercen una capacidad antioxidante muy importante.

En estudios recientes de Hajimahmoodi et al. (2010), encontraron que varias microalgas, incluyendo *Chlorella vulgaris* y *Nostoc muscorum*, tenían la mayor capacidad antioxidante (58.21 ± 16.62 y 63.26 ± 6.15 $\mu\text{mol ET} / \text{g}$ biomasa seca, respectivamente) por el ensayo FRAP. Además, microalgas como *Haematococcus pluvialis*, *Isochrysis ISO-T*, *Isochrysis sp.*, *Phaedactylum tricornutum* y *Tetraselmis sp.*, Mostraron valores de alrededor de 46-89 $\mu\text{mol ET/g}$ biomasa seca (Goiris et al., 2014). Ambos estudios mostraron menos actividad que nuestros resultados.

Actividad anti-radical libre

Los resultados se muestran en la Tabla 14 demostrando que los extractos de *N. incerta* tienen alta actividad anti-radical libre. Es importante resaltar que los extractos exhiben alta actividad sobre dos (ABTS y AAPH) de los tres (DPPH, ABTS y AAPH) radicales evaluados, presentando diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 14. Porcentaje de inhibición para los radicales DPPH, ABTS y AAPH expuestos a diferentes extractos de *Navicula incerta* mediante un ensayo de su capacidad antiradical libre.

Extractos	% de inhibición			IC ₅₀ (µg/mL)		
	DPPH	ABTS	AAPH	DPPH	ABTS	AAPH
Acetónico	35.39 ^a ±0.31	92.16 ^a ±0.16	96.72 ^a ±1.13	>780	202.4 ± 8.5 ^a	101.7 ± 8.1 ^b
Metanólico	35.27 ^a ±0.23	91.50 ^a ±0.29	89.20 ^b ±0.77	>780	232.6 ± 6.6 ^b	21.4 ± 1.1 ^a
Etanólico	33.43 ^a ±0.46	86.27 ^b ±0.11	81.86 ^c ±3.21	>780	251.83 ± 12.1 ^b	535.8 ± 13.3 ^c

Las concentraciones de los extractos fueron 780 µg·mL⁻¹.

Concentración mínima inhibitoria para el 50 % del radical.

Cabe destacar, la importancia del resultado, debido que indica que la inhibición está influenciada por el tipo de mecanismo de inhibición que pueden tener los diferentes compuestos que se encuentran en cada extracto. Los extractos evaluados para inhibir los radicales ABTS⁺ y DPPH fueron significativos entre ellos ($p < 0.05$), donde los extractos acetónicos y metanólicos presentaron la mayor actividad para ambos radicales (92.16 ± 0.16 and 91.50 ± 0.01 % para ABTS y 96.72 ± 0.01 % para AAPH).

Los extractos no fueron efectivos al inhibir el radical DPPH por lo que fue insuficiente para inhibir el 50 % ($>780 \mu\text{g/mL}$) del radical, ya que se deben aplicar mayores concentraciones del extracto para lograr la inhibición. Es por ello, que la IC_{50} no fue determinada. Por otra parte, el extracto acetónico mostró la IC_{50} baja para inhibir al menos el 50 % de los radicales ABTS ($202.4 \pm 8.5 \mu\text{g/mL}$) y AAPH ($101.7 \pm 8.1 \mu\text{g/mL}$), demostrando que los componentes de este extracto tienen alta actividad anti-radical libre. Por lo contrario, los extractos etanólicos presentaron el menor porcentaje de inhibición y una mayor IC_{50} . Es importante destacar, que el etanol es el único solvente aprobado por la FDA como no tóxico en bajas cantidades para las personas y aprobado para su uso en la industria farmacéutica. Sin embargo, los estudios se centran en la obtención y caracterización de las moléculas presentes en los extractos, justificando su alta actividad biológica.

Actividad eritroprotectora sobre daño oxidativo en eritrocitos humanos

Los cambios morfológicos y el daño celular en eritrocitos son causados por el efecto tóxico de compuestos químicos como los radicales libres. El AAPH induce oxidación en los lípidos de membrana y proteínas, eventualmente causa hemólisis en eritrocitos (Tai, Sawano, Yazama, & Ito, 2011). El AAPH fue inhibido por los antioxidantes encontrados en los extractos de *N. incerta*, evitando la hemólisis y los cambios morfológicos (Fig. 13).

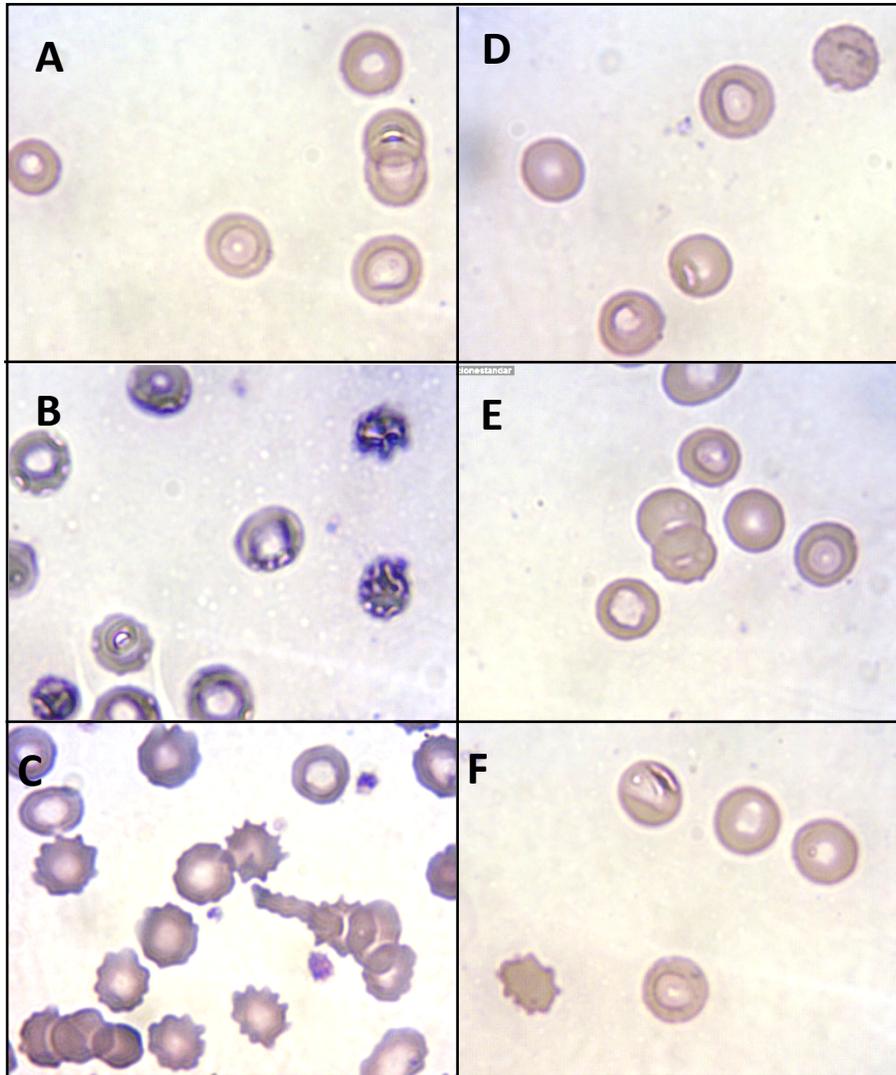


Figura 13. Actividad eritroprotectora de extractos de *Navicula incerta* sobre el daño oxidativo en eritrocitos humanos. Micrografías de eritrocitos humanos (100x). Inducción de la hemólisis con el radical AAPH. (A) Control (-): eritrocitos sin radical. (B) Control (+): eritrocitos con radical (hemólisis). (C) Control de referencia: anemia hemolítica autoinmune. (D) Extracto de acetona con radical (E) Extracto metanólico con radical (F) Extracto etanólico con radical.

Además, se observó alto efecto protector por los tres extractos (Fig. 13D, E y F), impidiendo el daño celular. Los controles, tanto positivo como negativo fueron utilizados para identificar la severidad del radical sobre las células rojas.

En la Figura 13A se muestran glóbulos rojos normales, sin daños en la membrana. Mientras que en la Figura 13B se observan glóbulos rojos anormales, con vacualizaciones que caracterizan una muerte celular muy severa, peroxidación y proteólisis. La hemólisis causada por el AAPH (Fig. 13B) se comparó con una hemólisis de referencia causada por anemia hemolítica autoinmune (Fig. 13C), donde se pueden apreciar diferencias morfológicas significativas. En las Figuras 13E, F y G, se muestra el efecto de los extractos sobre la morfología de los glóbulos rojos, donde no se observan cambios en la morfología de la membrana plasmática, lo que sugiere una fuerte protección e inhibición del AAPH. Los extractos logran detener la peroxidación lipídica y la proteólisis, evitando la salida de hemoglobina impidiendo la lisis celular. Los cambios morfológicos solo se presentaron sobre el control positivo, donde se aprecian formaciones de vesículas exógenas, las cuales transportan material hacia afuera de la membrana, como hemoglobina, enzimas y diferentes tipos de proteínas, lo cual indica, la muerte celular (Tai et al., 2011).

El generador de radicales AAPH produce radicales peroxilo al contacto con compuestos lipídicos o proteicos oxidándolos, causando peroxidación lipídica afectando a la membrana plasmática, desestabilizándola y produciendo lisis celular (Yamamoto et al., 1984; Culbertson et al., 2000). Los carotenoides son pigmentos que se pueden encontrar en los extractos los cuales juegan un papel muy importante para la inhibición de las ERO como el oxígeno singlete (1O_2) y los radicales peroxilo. Sin embargo, hay poca información sobre la defensa a nivel celular tanto de los ERO como de los ERN. Para prevenir el daño celular se puede recurrir al consumo de carotenoides, ya que se ha reportado alta actividad anti-radical libre. Las microalgas *Spirulina platensis*, *H. pluvialis*, y *Dunaliella salina* producen varios tipos de carotenoides capaces de evitar los efectos de los radicales libres (Reposo et al., 2016). Ya que los radicales libres son muy reactivas e introducen oxígeno al interior de la

célula induciendo alteraciones en el DNA y diversos cambios en la aceleración y envejecimiento prematuro del cuerpo (Lu *et al.*, 2010; Kirti *et al.*, 2014).

Detección de actividad antiinflamatoria *in vitro*

Inhibición de la enzima pancreática porcina (EPP)

La actividad antiinflamatoria de los extractos de *N. incerta* se basó en el ensayo de inhibición de la enzima EPP. Esta enzima utilizó como sustrato al compuesto N-succinil-ala-ala-ala-*p*-nitroanilina (N-s-(ala)-*p*N). En esta reacción enzimática se libera la *p*-nitroanilina como producto final de la reacción. El aumento de la absorbancia se observó mediante espectrofotometría. La Figura 16 muestra una cinética de inhibición de la EPP realizada por todos los extractos (acetónico, metanólico y etanólico) durante 60 min. El extracto acetónico y etanólico fueron aquellos que mostraron una disminución en la absorbancia durante el tiempo de reacción por debajo del control (enzima + sustrato). Probablemente, los extractos contienen inhibidores enzimáticos, evitando la liberación de N-s-(ala)-*p*N; esto se infiere debido a la disminución de la absorbancia, ya que está directamente relacionada con la liberación de *p*-nitroanilina. La cinética de inhibición de la enzima mostró que la reacción enzima-sustrato se estabilizó a los 45 min. Por lo que durante este tiempo se midió el porcentaje de inhibición. El % de inhibición (Tabla 14) fue mayor para los extractos metanólicos y acetónicos. Donde los resultados del efecto inhibitorio obtenidos por el extracto acetónico (96.64 a ± 4.82%) fueron superiores ($p < 0.01$) a los valores presentados por el estándar de aspirina (74.03b ± 1.51%). Del mismo modo, muestran una IC₅₀ de 162.35 ± 3.24 µg/mL y 515.59 ± 3.82 µg/mL, respectivamente.

Los extractos presentaron mayor actividad antiinflamatoria con respecto a la aspirina logrando la inhibición de la enzima elastasa, lo que sugiere la presencia de inhibidores enzimáticos que podrían comportarse como compuestos antiinflamatorios potentes e importantes, estos pueden ser de tipo carotenoide.

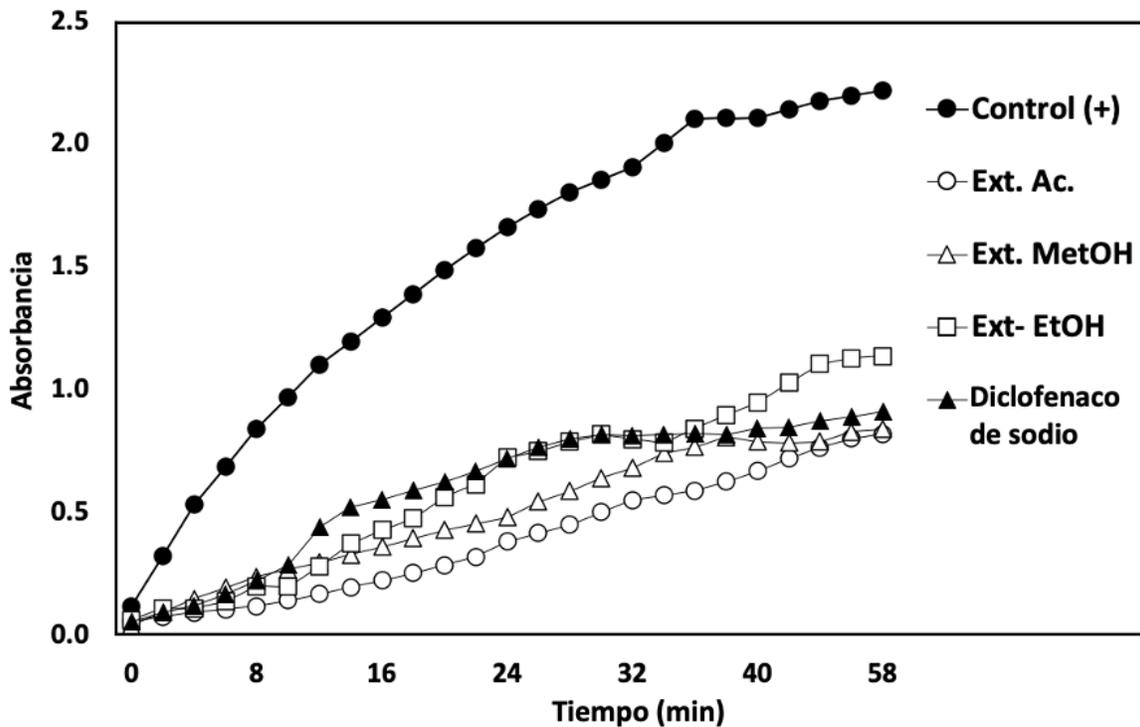


Figura 14. Actividad antiinflamatoria de los extractos de *Navicula incerta* evaluada por la inhibición a la elastasa pancreática porcina a través de la liberación de p-nitroanilina (a mayor absorbancia mayor liberación de p-nitroanilina, por lo tanto, mayor inhibición de elastasa). Control (+) Enzima + sustrato. Concentración de los extractos de 10.55 mg/mL.

Tabla 15. Detección de la actividad antiinflamatoria *in vitro* de extractos de la microalga *Navicula incerta*.

Muestras	Inhibición de la EPP (%)	IC ₅₀ para la EPP (μg/mL)	Inhibición de la desnaturalización de la BSA (%)	Estabilización de la membrana (%)	
				IH-IH	IHyp-IH
Ex. Acet.	96.64 ^a ±4.82	162.35 ^a ±3.24	43.92 ^b ±3.23	100.12 ^a ±1.23	87.91 ^b ±1.35
Ex. MetOH	72.57 ^b ±2.92	520.29 ^b ±4.14	38.12 ^b ±3.96	100.91 ^a ±1.18	87.32 ^b ±1.34
Ex. EtOH	62.39 ^c ±1.51	530.91 ^c ±2.56	39.77 ^b ±1.64	100.74 ^a ±1.68	91.74 ^a ±0.51
Aspirina	74.03 ^b ±1.51	515.59 ^b ±3.82	N/D	N/D	N/D
Diclofenaco	N/D	N/D	94.67 ^a ±2.61	92.32 ^b ±8.06	93.80 ^a ± 0.88

Los datos representan la media ± desviación estándar de al menos tres análisis. Letra diferentes representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con comparaciones múltiples de Tukey por columna. La concentración de todas las muestras fue de 1 mg/mL. EPP= elastasa pancreática porcina. IH-IH = Inhibición de hemólisis-inducida por calor. IHyp-IH = Inhibición de hemólisis-inducida por hipotonicidad IC₅₀ = Concentración media inhibitoria. BCA = Albúmina sérica bovina. N/D = No descrito.

Los carotenoides son compuestos antiinflamatorios que pueden considerarse como nutracéuticos para la prevención de la inflamación crónica con efectos sobre la producción de NO, prostaglandina E2 (PGE2) y citosinas proinflamatorias. Además, los carotenoides tienen la capacidad de inhibir otras enzimas como la óxido nítrico sintasa y la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Por otro lado, son utilizados para prevenir diversas reacciones inflamatorias como la artritis reumatoide, hepatitis, gastritis, enfermedades neuroinflamatorias, entre otras. Sin embargo, los mecanismos de inhibición de EPP no se han estudiado utilizando extractos derivados de microalgas con alto contenido de carotenoides (Rajapakse et al., 2008; Peerapornpisal et al., 2010). Existen diferentes mecanismos de inhibición de enzimas: inhibición competitiva y no competitiva. Probablemente, los pigmentos carotenoides y clorofilas compitan por el sitio activo de la elastasa (inhibición competitiva), evitando que el N-s-(ala)-pN interactúe con la elastasa bloqueando su sitio activo e impidiendo la unión enzima-sustrato. La inhibición no competitiva podría llevarse a cabo, durante la formación de la interacción enzima-sustrato. Aquí, los pigmentos están unidos por enlaces covalentes a la elastasa, mejorando la afinidad de la elastasa con el N-s-(ala)-pN evitando la liberación de *p*-nitroanilina. Estos mecanismos son necesarios para ejercer actividad antiinflamatoria por inhibición enzimática. No obstante, no se ha informado sobre la inhibición ejercida por los pigmentos sobre la elastasa. En estudios realizados por Bras et al. (2010), se ha observado que los polifenoles se unen a aminoácidos como la arginina glicina, alanina, serina, valina y leucina, que forman la elastasa, mediante enlaces covalentes. Donde se observó que los polifenoles tienen inhibición competitiva reversible sobre la enzima PPE. Por esta razón, se recomienda determinar el mecanismo de inhibición ejercido por los pigmentos en el PPE.

Ensayo de desnaturalización de albúmina (BSA) (actividad antiartrítica)

La albúmina es la principal proteína encontrada en suero sanguíneo y en el cuerpo en general. Tiene diversas funciones, entre ellas el transporte de biomoléculas. Con el fin de estudiar la inhibición proteica se procedió a estudiar la albúmina como modelo de proteína. Se ha documentado que la desnaturalización proteica está bien implicada

en el desarrollo de un proceso inflamatorio en las células. Ya que se encuentran implicadas en procesos inflamatorios crónicos como en la artritis, que es una inflamación y sensibilización de las articulaciones. Por lo tanto, se están buscando nuevos compuestos antiinflamatorios que puedan prevenir este padecimiento (Perumal et al., 2008; Sakat et al. 2010). La Tabla 15 muestra el efecto inhibitorio sobre la desnaturalización de la BSA por los extractos de *N. incerta*. Los extractos fueron moderadamente efectivos para inhibir la albúmina de la desnaturalización por calor a concentraciones de 1 mg/mL. Sin observar diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los extractos probados, pero el extracto acetónico mostró el mayor porcentaje de desnaturalización ($43.92 \pm 3.23\%$). Sin embargo, entre los extractos y el diclofenaco si hubo diferencias, siendo este último el que tuvo una mejor respuesta antiinflamatoria. El diclofenaco fue eficaz en la inhibición de la desnaturalización de BSA ($94.67 \pm 2.61\%$). Por otro lado, se sabe que este fármaco puede causar efectos adversos en la salud ocasionando hepatotoxicidad. Por lo tanto, es muy importante encontrar nuevos medicamentos capaces de suministrar este medicamento. En general, los pigmentos de microalgas se usan para varias aplicaciones farmacéuticas, incluida la capacidad de disminuir la inflamación localizada (Seifabady et al., 2011).

La BSA se encuentra a una concentración del 60% en el suero humano. Cuando BSA se expone durante un tiempo prolongado al calor, expresa antígenos asociados a hipersensibilidad tipo III. Lo anterior está relacionado con inflamaciones crónicas, como la glomerulonefritis, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la enfermedad del suero (Elisha et al., 2016; Agarwal et al.2019). Por otra parte, aunque el efecto de los extractos de *N. incerta* no hayan superado el 50% de inhibición, los resultados fueron similares a estudios realizados por Prabakaran et al. (2018) con *Chlorella vulgaris*, donde observaron que el efecto antiinflamatorio depende de la dosis. El extracto metanólico tenía una inhibición de la desnaturalización de BSA por encima del 60% a 500 $\mu\text{g/mL}$. La investigación en el uso de compuestos derivados de microalgas mediante este método ha sido poco estudiada. No obstante. Sólo se han evaluado extractos crudos, más no proteínas aisladas o fracciones de extractos. La fraccionación de los extractos puede llevar a un mejor resultado, potenciando el efecto

antiartrítico, ya que se puede estar produciendo un efecto antagónico dentro de los compuestos de un extracto crudo de microalgas.

Ensayo de estabilización de membrana

En términos de inflamación crónica, la búsqueda de compuestos o biomoléculas activas capaces de estabilizar membranas plasmáticas es muy importante. Se buscan compuestos que prevengan la desnaturalización de la membrana lisosomal, ya que este orgánulo libera enzimas hidrolíticas y proteolíticas, que son responsables de la degradación del tejido fibroso, causando heterofagia y autofagia. Se ha observado que la membrana de los glóbulos rojos humanos (HRBC) es análoga a la membrana lisosómica. Se cree que, si los extractos naturales como los obtenidos de *N. incerta* pudieran estabilizar la membrana de los HRBC se podría evitar la liberación de estas enzimas lisosómicas. Por lo tanto, se estudió el efecto antiinflamatorio de los extractos de *N. incerta* mediante la aplicación de lisis inducida por calor e hipotonicidad en las membranas de los HRBC para producir degradación de la membrana y oxidación de la hemoglobina. Todos los extractos se usaron para llevar a cabo las pruebas de estabilización de membrana. Sin embargo, para observar los cambios morfológicos de los RDC, se utilizaron las micrografías del extracto etanólico, ya que es el solvente aprobado por la FDA.

Ensayo de hemólisis inducida por calor

Todos los extractos probados tienen un efecto protector sobre las membranas de los glóbulos rojos, inhibiendo el 100% (100.12 a 100.74%) de hemólisis inducida por calor. La actividad antiinflamatoria de los extractos fue mayor ($p < 0.05$) que el porcentaje de inhibición del diclofenaco sódico ($92.32 \pm 8.06\%$) (Tabla 15). Esta droga, como otras, tiene un efecto antiinflamatorio reconocido por tener alta actividad antiinflamatoria. Sin embargo, en la actualidad, se ha observado que estos medicamentos tienen toxicidad cuando se metabolizan, dañando el hígado o los riñones. La estabilización de la membrana lisosómica es relevante para limitar la respuesta inflamatoria, inhibiendo la

liberación de constituyentes lisosómicos, como las proteasas. Estos provienen de neutrófilos activados, causando inflamación en el tejido celular.

Esta prueba demostró que los compuestos fitoquímicos de los extractos podrían estabilizar la membrana lisosómica. Esta acción limita la respuesta inflamatoria al inhibir los marcadores y constituyentes inflamatorios como las proteasas. Este mecanismo es causado por los lisosomas de los neutrófilos activados, causando inflamación en el tejido celular (Prabakaran et al. 2018). El mecanismo antiinflamatorio llevado a cabo por este método para pigmentos tales como clorofilas y carotenoides derivados de microalgas no se ha informado en la literatura. Por lo tanto, se recomienda estudiar los mecanismos de acción en la próxima investigación. Los extractos lograron formar una biocapa en la membrana de los eritrocitos, protegiéndolos de las altas temperaturas (55 °C) que, en condiciones normales, esta temperatura degrada y suaviza la membrana de los glóbulos rojos.

Ensayo de hemólisis inducida por hipotonicidad

El extracto etanólico de *N. incerta* inhibió efectivamente la hemólisis inducida por hipotonicidad de los glóbulos rojos a una concentración de 1 mg/mL (Tabla 15). La actividad máxima se observó en el extracto etanólico (91,74 ± 0,51%) teniendo el mismo efecto ($p < 0,05$) antihemolítico que el diclofenaco (93,80 ± 0,88 %) probado a la misma concentración presentando la misma capacidad antiinflamatoria. Los resultados muestran que el extracto etanólico podría usarse como un agente antiinflamatorio con la misma capacidad para reducir la inflamación mediante la inhibición de la liberación de compuestos lisosomales. Se necesitan más estudios para indicar si el extracto etanólico podría usarse como agente quimiopreventivo o como fármaco.

La hemólisis inducida por hipotonicidad es otra forma de evaluar la actividad de estabilización de la membrana. La lisis celular fue ocasionada por una solución hipotónica y su acumulación excesiva de líquido dentro de la célula. Generalmente, en

el organismo la lisis del lisosoma es inducida por radicales libres liberados de la mitocondria y provoca peroxidación lipídica y proteólisis. La oxidación lipídica también es causada por la liberación de fosfolipasa A2, derivada del daño a la membrana lisosómica. El mecanismo de inhibición de la hemólisis por hipotonicidad de pigmentos fotosintéticos de microalgas aún no se ha dilucidado. Se ha observado que los polisacáridos sulfatados de microalgas pueden intervenir en la liberación de contenido lisosómico de neutrófilos en el momento de la respuesta inflamatoria. Los estudios realizados por Prabakaran et al. (2018) con extractos metanólicos de *Chlorella vulgaris* han mostrado actividad protectora en la membrana de los glóbulos rojos, inhibiendo la hemólisis (70%) a concentraciones de 500 µg/mL. Los metabolitos secundarios que forman los extractos han demostrado su capacidad para mantener la integridad de los glóbulos rojos y suprimir los efectos antiinflamatorios.

Cambios morfológicos de glóbulos rojos inducidos por el daño por calor e hipotonicidad por microscopía óptica

La aplicación de calor e hipotonicidad en los glóbulos rojos indujo hemólisis en sus membranas, produciendo degradación y permitiendo la ingestión de líquido en la célula. Además, causa un desequilibrio en su osmoregulación, mostrando un cambio morfológico, que se puede observar en una microscopía óptica.

La Figura 15A muestra una morfología eritrocitaria saludable típica con un tamaño normal (6-7.5 nm), una forma regular bicóncava y una zona central deprimida, sin presentar anomalías en la membrana plasmática. Las Figuras 15B-C-D muestran un efecto protector de los tres extractos probados sobre los eritrocitos sujetos a una hemólisis inducida por calor. A pesar de estar en condiciones de temperatura de 55 °C el eritrocito mostró una morfología típica con un tamaño normal (6-7.5 nm). La estructura de la célula no se vio comprometida, con una zona central deprimida. Este efecto protector podría deberse a la formación de una biopelícula que resalta un ligero color verde envolviendo toda la célula.

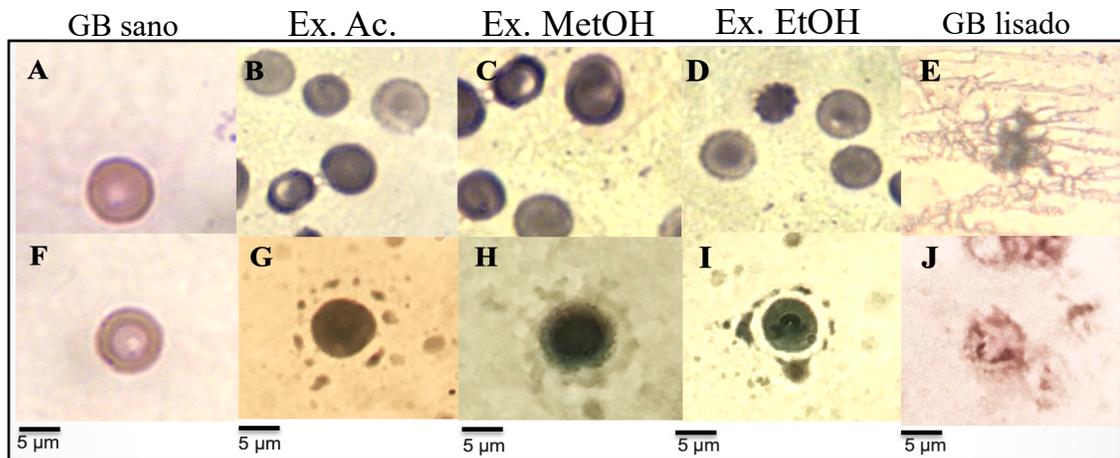


Figura 15. Micrografías de los cambios morfológicos de eritrocitos por inducción de calor e hipotonicidad y el efecto eritroprotector de extractos de *Navicula incerta*. *Hemólisis inducida por calor*: (A) eritrocito sano; (B) eritrocitos + Ex. Ac. (55 °C); (C) eritrocitos + Ex. MetOH. (55 °C); (D) eritrocitos + Ex. EtOH. (55 °C); (E) eritrocitos a 55°C. *Hemólisis inducida por hipotonicidad*: (F) eritrocito sano; (G) eritrocitos + Ex. Ac. + solución hipotónica; (H) eritrocitos + Ex. MetOH. + solución hipotónica; (I) eritrocitos + Ex. EtOH.; (J) eritrocitos + extractos EtOH + solución hipotónica; (K) eritrocitos + solución hipotónica. Micrografía a x100. La barra representa una escala de 5 μm. GB: Glóbulo Rojo.

Los pigmentos podrían estar recubriendo la membrana celular, impidiendo la hemólisis y la oxidación de lípidos. Por otro lado, la Figura 15E muestra la desnaturalización de la membrana plasmática de un eritrocito a temperaturas de 55 °C. En esta micrografía, se puede observar un eritrocito afectado por el calor. Esto presenta una destrucción completa de la membrana celular, liberando diferentes compuestos en el contenido externo. La hemoglobina es el compuesto principal liberado, debido a la alta temperatura. El efecto de la hemólisis inducida por el calor es análogo a la estabilidad de la membrana lisosómica, lo que desencadena un proceso lisosómico.

Para describir el efecto de la hemólisis inducida por hipotonicidad en la estabilización de la membrana, es necesario comprender la osmoregulación. Esta es la vía activa para regular la presión osmótica del entorno interno y externo de diferentes metabolitos y fluidos intracelulares. La Figura 15F muestra un eritrocito sano utilizado como control, como se describe en el punto anterior (Fig. 15A, micrografía de hemólisis inducida por hipotonicidad). Las Figuras 15G-H-I muestran un resultado similar a los eritrocitos del análisis de inducción de hemólisis por calor. Sin embargo, la presencia del pigmento es más fuerte. La biopelícula está fuertemente adherida a la membrana. Esto puede deberse a un mayor refuerzo para mantener la osmoregulación celular, evitando el intercambio de metabolitos y fluidos. Ahora, ¿qué podría pasar con la membrana lisosómica? Los lípidos comienzan a ser oxidados por los radicales libres, producidos previamente a la respuesta inflamatoria. Los pigmentos acumulados en el extracto etanólico, podrían estar actuando como agentes antioxidantes, reduciendo los radicales libres. Además, podrían prevenir la activación de neutrófilos lisosomales. La Figura 15J muestra la lisis celular de los glóbulos rojos causada por la hemólisis inducida por hipotonicidad. La lisis de células lisosómicas se produce durante la inflamación, que libera marcadores de inflamación como proteínas reactivas C, interleucinas y proteínas proinflamatorias. Estas moléculas en concentraciones más altas de lo normal causan inflamación crónica, lo que puede conducir a un proceso de carcinogénesis. Por lo que es esencial la búsqueda de compuestos que eviten la respuesta inflamatoria incontrolada, inhibiendo la lisis de células lisosómicas, disminuyendo los marcadores inflamatorios y los radicales libres.

Actividad anti-proliferativa

Los resultados de la actividad anti-proliferativa (IC_{50}) se muestran en la Tabla 16, demostrando que los extractos pigmentados obtenidos de *N. incerta* sobre diferentes líneas celulares tienen actividad citotóxica, no obstante, esta actividad fue exclusivamente en tres de las 5 líneas celulares probadas, descartando su actividad para las células epiteliales de retina. La actividad sobre las líneas de HeLa y PC-3 fue significativamente alta en los tres extractos probados, mientras que para la línea A549 sólo los extractos metanólicos y etanólicos fueron capaces de reducir a menos del 50 % la viabilidad celular de los cultivos. Se observaron valores para la IC_{50} de 59 a 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y de 96 a 122 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sobre HeLa y PC-3, respectivamente. Las líneas ARPE-19 y LS-180 presentaron valores de IC_{50} significativamente fuera de las concentraciones estudiadas (>200), ya que se evaluó el efecto anti-proliferativo en rangos de concentración que van de 25 a 200 μL . Los extractos no se consideraron citotóxicos para la línea celular de ARPE-19, su nula toxicidad es importante mencionar, ya que al no ser tóxico y corroborando con los resultados obtenidos por el efecto protector sobre eritrocitos humanos, pueden ser específicos para líneas cancerosas.

El instituto de cáncer de los Estados Unidos (US-NCI) considera a los compuestos de extractos crudos con actividad antiproliferativa, cuando poseen IC_{50} con valores menores a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Leyva-Peralta et al., 2015). Los componentes fitoquímicos con mayor probabilidad de ejercer el efecto citotóxico pueden ser los carotenoides, ya que pueden proveerlos de mecanismos de muerte celular. La actividad anti-proliferativa de algunos carotenoides como la fucoxantina y el fucoxantinol dependen de moléculas involucradas en el ciclo celular, apoptosis y metástasis (Kumar et al., 2013).

Tabla 16. Actividad anti-proliferativa (IC₅₀) de extractos obtenidos de *Navicula incerta* sobre diferentes líneas celulares.

Extractos	IC ₅₀ µg·mL ⁻¹ ± DE				
	A549	HeLa	PC-3	LS-180	ARPE-19
EAc-Ni	> 200*	75.91 ^b ± 2.47	122.58 ^b ± 2.86	> 200*	> 200*
EMet-Ni	123.73 ^a ± 2.59	61.93 ^a ± 3.10	107.01 ^a ± 2.49	> 200*	> 200*
EEt-Ni	141.99 ^b ± 3.23	59.28 ^a ± 2.58	96.05 ^a ± 3.48	> 200*	> 200*

Los datos se muestran como la media (IC₅₀) ± DE (desviación estándar) de al menos tres repeticiones (n ≥3). Diferentes superíndices representan diferencias significativas (por columna). (*) Indica la concentración máxima probada que no alcanzó los valores de IC₅₀.

En estudios realizados con fucoxantina y neoxantina se ha observado un gran efecto sobre la inhibición del crecimiento celular de PC-3, llevando a la muerte celular programada (apoptosis), aumentando la mortalidad por arriba del 30 %, indicando que se induce apoptosis por la activación de la caspasa-3. Otro carotenoide importante en la inhibición de la proliferación de PC-3 es el fucoxantanol. La fucoxantina es el metabolito considerado con mayor actividad anticancerígena, evaluado en comparación con el β -caroteno y astaxantina, carotenoides que promueven la inhibición de cáncer de colon. Por lo que es probable que uno de los componentes en abundancia de los extractos sea la fucoxantina, así mismo, con carencias de β -caroteno y astaxantina. Actualmente, se están realizando estudios enfocados al estudio de la inhibición de la línea PC-3 midiendo el efecto antiproliferativo con β -caroteno, cantaxantina, fucoxantina, fitoeno y zeaxantina. La microalga *Haematococcus pluvialis* contiene astaxantina, que se ha reportado por tener efectos significativos contra el cáncer de próstata, ya que inhibe la enzima 5- α -reductasa, involucrada en el crecimiento anormal de próstata (Baudelet *et al.*, 2013). Sin embargo, no se han reportado las características de los compuestos de la microalga *N. incerta* y aún se está trabajando en la caracterización de los extractos evaluados. Por otra parte, carotenoides como la β -cryptoxantina pueden regular la diferenciación de la expresión de variantes de la p73, que es la encargada de regular la supervivencia, muerte celular y senescencia, tomando en cuenta que es miembro de la familia de p53 dependientes de más reguladores y del contexto celular. Sin embargo, se ha estudiado que esta regulación se encuentra más ligada a la inhibición de la proliferación de cáncer de próstata, que pueden inducir apoptosis regulada negativamente por Δ NP73 (San Millan *et al.*, 2015).

Se observaron cambios morfológicos (Fig. 16 y 17) como consecuencia de la toxicidad por efecto de los compuestos fitoquímicos que se encuentran componiendo a los extractos. La citotoxicidad de los extractos ocasiona un incremento o disminución de las células. Además, se presenta picnosis, producto de la condensación de la cromatina que provoca que la célula entre en apoptosis.

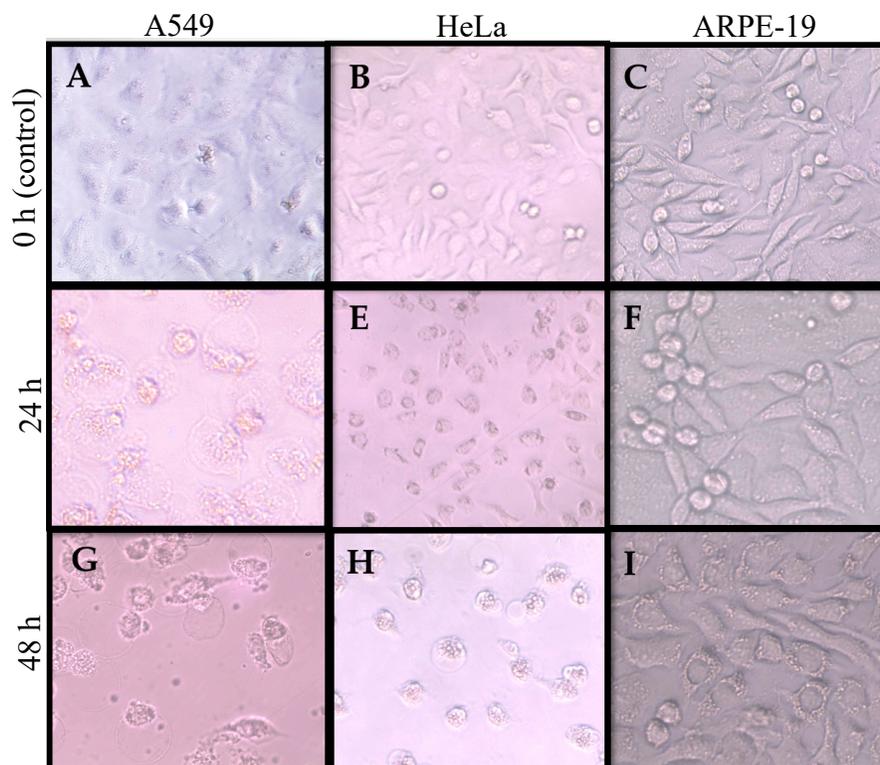


Figura 16. Micrografías que muestran el efecto de los diferentes extractos obtenidos de *Navicula incerta* sobre las líneas celulares A549, HeLa y ARPE-19 durante 48 h a una concentración de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se aprecian células con fragmentación nuclear/cromatina condensada, cuerpos apoptóticos y membranas “blebs”. h= horas.

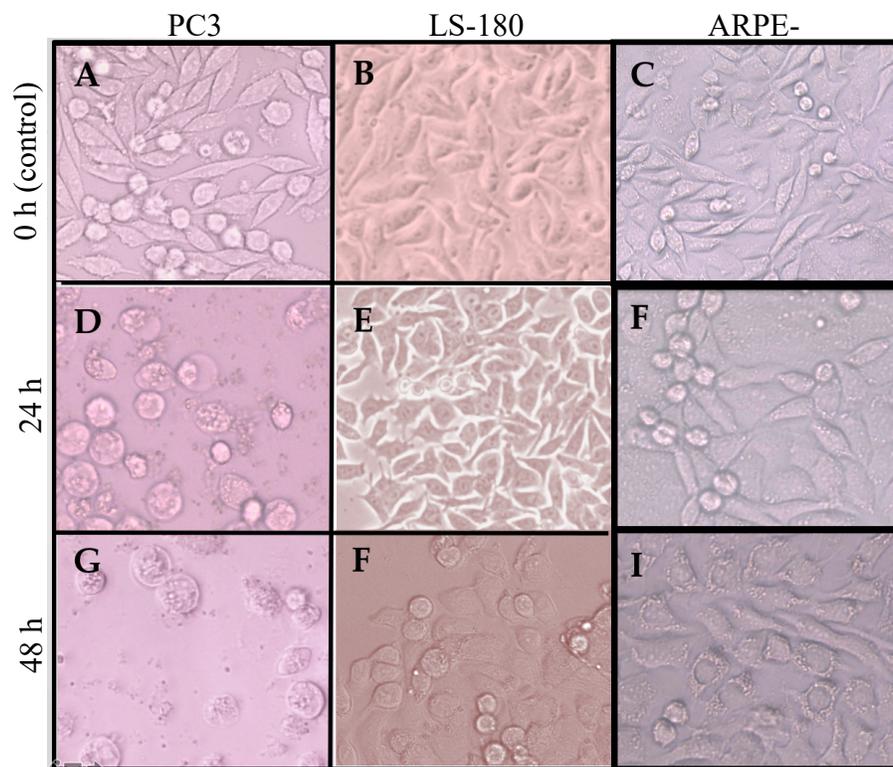


Figura 17. Micrografías que muestran el efecto de los diferentes extractos obtenidos de *Navicula incerta* sobre las líneas celulares PC3, LS-180 y ARPE-19 durante 48 h. a una concentración de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se aprecian células con fragmentación nuclear/cromatina condensada, cuerpos apoptóticos y membranas “blebs”. h= horas.

Formaciones de cuerpos vesiculares se hacen presentes, que se encuentran alrededor de la membrana plasmática, posteriormente se da un proceso llamado “budding” por “Karyorrhexis”, que consiste en la separación de los cuerpos apoptóticos. Se observan células con características de autofagia, donde se muestran organelos y citoplasma envueltas por vesículas llevadas por los lisosomas para su degradación. Otra característica presente fue la oncosis, que son células que presentan núcleos de gran tamaño sin ADN fragmentado destrucción de membrana, peroxidación lipídica y proteólisis (Ziegler et al., 2004 and Fink et al., 2005).

ETAPA III

Caracterización estructural

Caracterización espectrofotométrica

Espectrofotometría de ultravioleta visible (UV-Vis)

La espectrofotometría UV-Vis se basa en la absorción de radiación en la región ultravioleta-visible (para este caso de los 200 a 700 nm) diferentes moléculas, ya sean aisladas o en un extracto crudo y se utilizó en este estudio para una identificación previa de los pigmentos presentes en los extractos. La absorción de dicha radiación lleva a un electrón a un estado excitado que corresponden a los enlaces de diferentes moléculas, por lo que los distintos tipos de enlaces de los compuestos se correlacionan con las diferentes señales emitidas (Barreiro y Barredo, 2018). Es por ello, que se utilizó la espectrofotometría de UV-Vis para identificar las posibles regiones donde absorben los pigmentos presentes en los diferentes extractos de *N. incerta* (Fig. 18). Se presentaron cuatro picos principales en los extractos con espectros de absorción aproximados de 258.6, 403.0, 446.7 y 667.4 nm. Sin embargo, el extracto etanólico presentó un desplazamiento en el segundo pico y no presenta el tercer pico. Esto puede deberse a la cantidad y tipo de compuestos que puede extraer el etanol.

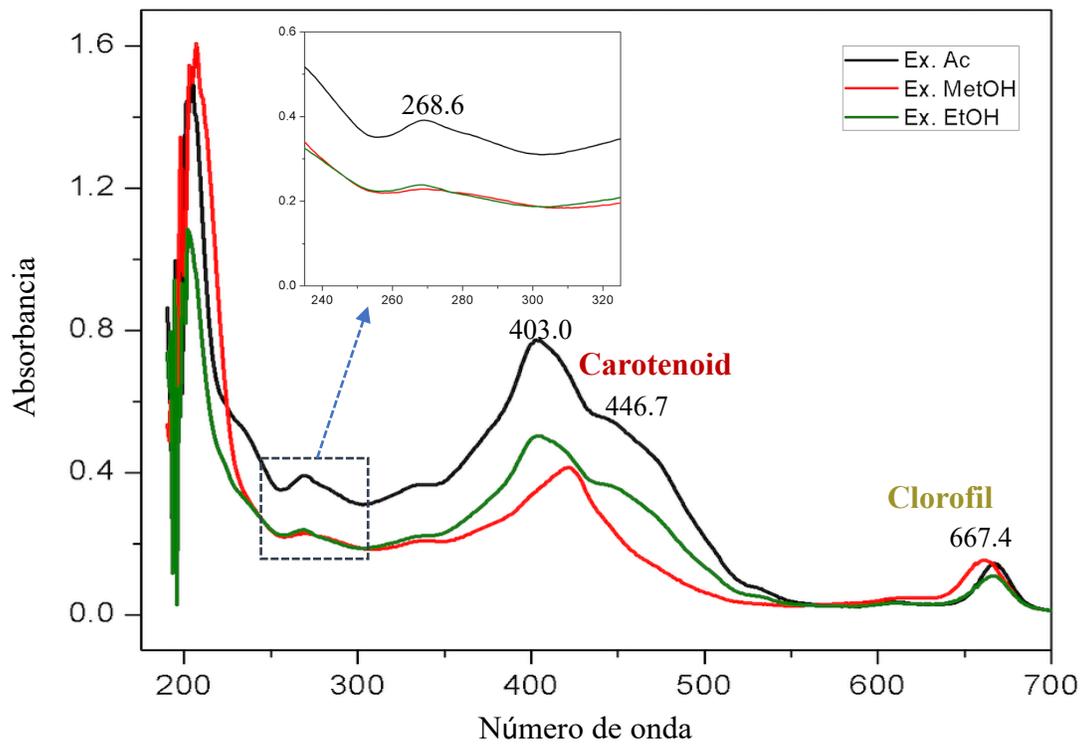


Figura 18. Variación de los espectros de absorción de diferentes extractos obtenidos de la microalga *N. incerta*.

Los picos presentes en el espectro de absorción son anchos, debido a la superposición de vibraciones transicionales y electrónicas de diferentes compuestos. Compuestos de naturaleza oleosa e hidrofóbica pueden absorber en la región de alrededor de los 268.6 nm. Mientras que en la región de los 400 a los 500 nm pueden estar presentes diferentes tipos de carotenoides como β -caroteno (429, 452 nm), luteína (425 nm), neoxantina (413, 416 y 438 nm), violaxantina (415 y 438 nm), zeaxantina (428, 430 y 454 nm), astaxantina (475 y 477 nm) y cantaxantina (460 y 468 nm) (Barreiro y Barredo, 2018). nm (Barreiro y Barredo, 2018) donde los extractos presentan un pico de 667.4.

Caracterización espectroscópica

Espectroscopía infrarroja por transformada de fuerier (FT-IR)

Un espectro de IR se obtiene cuando la radiación electromagnética pasa a través de una muestra y determina la fracción de radiación absorbida. Los picos de los espectros de la región absorbida guardan relación con la frecuencia de vibración de partes únicas de la molécula, determinando los tipos de enlaces que pueden contener los diferentes metabolitos o moléculas encontrados en extractos o en moléculas puras. Los análisis de FT-IR son herramientas para explorar las características estructurales de los metabolitos contenidos en extractos crudos, especialmente para estudiar los diferentes grupos funcionales presentes en compuestos naturales como los pigmentos de microalgas (Moovendhan et al., 2015a). Los enlaces provenientes de estas moléculas vibran al absorber la energía dando un espectro característico (Moovendhan et al., 2015b). La Figura 19 muestra los espectros de FT-IR de los extractos (acetónico, metanólico y etanólico) de la microalga *N. incerta*. En general, cada extracto muestra un espectro similar, donde los picos de transmitancia más importantes se ubican en $3401-3392\text{ cm}^{-1}$ que se atribuyen a la vibración de estiramientos de -OH que pueden pertenecer al solvente o grupos funcionales provenientes de las xantófilas o clorofilas.

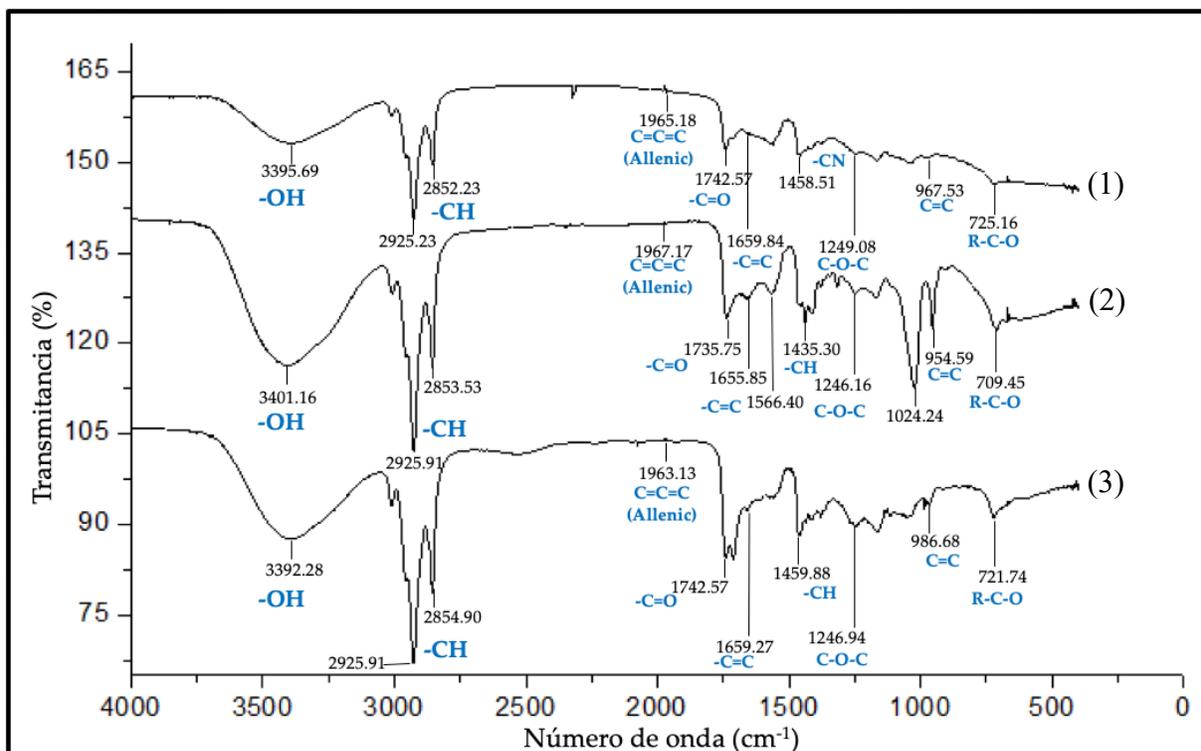


Figura 19. Espectros de FT-IR de extractos de la diatomea *Navicula incerta* utilizando diferentes solventes. (1) Ex. EtOH; (2) Ex. MeOH; (3) Ex. Ac.

La región de transmitancia de 2854-2852 a 1435-14458 cm^{-1} corresponden a vibraciones de estiramientos de los enlaces C-H de los grupos metino (CH), metileno (CH_2) y metilo (CH_3). Los picos de transmitancia ubicados en 1963-1965 cm^{-1} se atribuyeron a la vibración de estiramientos del grupo alénico ($-\text{C}=\text{C}=\text{C}-$). El enlace alénico es particular de la fucoxantina entre las xantófilas, con el cual se puede suponer que los extractos contienen este pigmento. La banda perteneciente a enlaces de tipo metino (C-H) se presentan en el número de onda de 2854-2852 cm^{-1} . Los picos ubicados en 1735-1742 cm^{-1} pertenecen a vibraciones de estiramientos de grupos carbonilos (C=O). Los grupos con dobles enlaces carbono-carbono ($-\text{C}=\text{C}-$) se encuentran en los picos presentados de 1659-1655 cm^{-1} .

Se observó presencia de grupos funcionales de tipo amidas ($-\text{CN}$) en la transmitancia ubicada en 1458 cm^{-1} que pudiera pertenecer a residuos de proteínas de membrana, aminoácidos o parte de la estructura de las clorofilas. Los picos de estiramientos de grupos C-O-C se encuentran en la región de 1249-1245 cm^{-1} . Las bandas en 700 cm^{-1} corresponden al grupo R-C-O (Hong et al., 1999; Rohini et al., 2006; Florentino-Ramos et al., 2019). Estos grupos funcionales y enlaces son característicos de estructuras químicas presentes en los carotenoides y clorofilas, así como en residuos de proteínas o aminoácidos que pudiera haber sido arrastrados por los solventes.

En la Figura 20 se observan los espectros de FT-IR de estándares de fucoxantina y β -Caroteno. Los grupos funcionales presentes en los estándares de ambos carotenoides coinciden con los presentes en los tres extractos de *N. incerta*. Cabe destacar, que la fucoxantina representa a los grupos de las xantófilas que presentan oxígeno en sus estructuras como parte de su característica. Además, en la fucoxantina podemos observar el enlace alénico presente en los extractos, lo que nos indica de una probable presencia de este carotenoide en las muestras de *N. incerta*. El estándar de β -Caroteno no presentó grupos funcionales con presencia de oxígeno, ya que una de las características de los carotenos es la ausencia de esta molécula. En general, el estándar de fucoxantina se presenta con mayor semejanza a los espectros de los extractos estudiados.

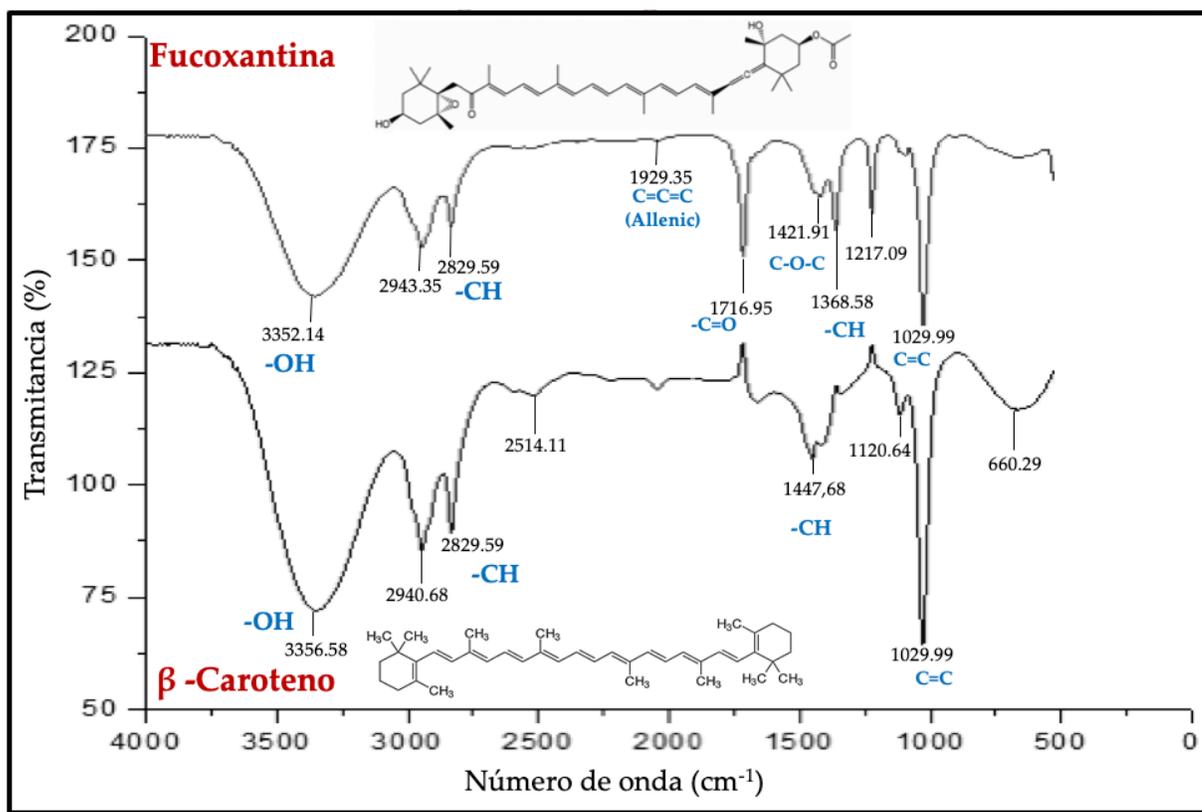


Figura 20. Espectros de FT-IR de estándares de fucoxantina y β -Caroteno. Los estándares fueron disueltos en metanol.

En estudios de Wu et al. (2014) examinaron los espectros FT-IR de pigmentos extraídos de *Sargassum binderi* y reportaron la presencia de grupos funcionales pertenecientes a la fucoxantina, comparando aislados con estándares. En este estudio se describe que el grupo alénico confirma la presencia de fucoxantina en estiramientos de 1929.21 y 19.29.03 cm^{-1} . Además, grupos funcionales como $-\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{H}$ y $-\text{C}-\text{O}$ fueron presentados en regiones similares a los de nuestro estudio, que corresponden a diferentes carotenoides como a la fucoxantina.

Investigaciones realizadas por Prabakaran et al. (2018) se detectó un total de 10 picos en extractos metanólicos de *Chlorella vulgaris*. Los picos detectados en este extracto fueron muy similares a los detectados en nuestro estudio. Se observa la presencia de compuestos N-O con fuerte extensión en las regiones 1506.41, 1541.12 y 1558.48 cm^{-1} . Además, se confirmaron la aparición de estiramientos de grupos hidroxilos (2358.94 cm^{-1}) y alcanos (1456.26 cm^{-1}) en regiones similares a nuestro estudio (Moovendhan et al., 2015). Actualmente, se ha utilizado el análisis de FT-IR para caracterizar estructuralmente y describir la composición química de metabolitos secundarios presentes en extractos de microalgas mediante análisis de FT-IR (Kansiz et al., 1999). Donde se han encontrado la presencia de grupos funcionales (grupos alquenos, alquinos, carboxilo, entre otros) en extractos de *R. apiculata* (Moovendhan et al., 2015b).

Asignaciones de picos de metabolitos por Resonancia Magnética Nuclear (^1H NMR y ^{13}C NMR) y correlación espectroscópica mediante RMN ^1H , 2D-COSY, HSQC, DEPT-135.

Hasta la última década, los estudios se centraban en la aplicación de RMN en células enteras o extractos de microalgas (Chauton et al., 2003 y Størseth et al., 2004). Sin embargo, actualmente el uso del análisis de RMN en extractos crudos es utilizado para el análisis de células completas de microalgas, ya que proporciona una descripción detallada del perfil de metabolitos presentes (Sumner et al., 2003). En estudios previos sobre el perfil metabolómico de microalgas utilizando análisis de RMN, se han

reportado metabolitos primarios (lípidos, ácidos grasos, aminoácidos y azúcares simples) y metabolitos secundarios (carotenoides y clorofilas) (Roberts et al., 1970 y Egeland et al., 2016). La identificación de las señales y su posterior asignación de metabolitos en los espectros RMN ^1H , RMN ^1H 2D-COSY se basaron en diferentes publicaciones previas (Roberts et al., 1970; Egeland et al., 2016; Azizan et al., 2018) y en análisis bioinformático mediante bases de datos *online* (disponibles de forma gratuita), como la Base de Datos de Metaboloma Humano (HMDB) en <http://hmdb.ca/>, base de datos de Resonancia Magnética Biológica (BMR) en <http://brmb.wisc.edu/> y PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. En las Figura 21 y 22 se muestran los espectros representativos de RMN ^{13}H y ^{13}C , respectivamente, de los diferentes extractos de *N. incerta*. Los espectros de ^{13}C se muestran más definidos ya que únicamente el 1 % de todo el carbono que compone a las estructuras corresponden a ^{13}C . Los espectros muestran tres regiones principales, región alifática, región olefínica y tetrapirrólica. Además, muestran la presencia de diferentes metabolitos, incluyendo aminoácidos, ácidos grasos, fitosterol, azúcares, carotenoides y clorofilas. Las 30 señales detectadas de los diferentes metabolitos se describen en la Tabla 17. Para la asignación de metabolitos de las diferentes señales, se realizó un análisis de correlación espectroscópica de RMN ^1H o un análisis bidimensional, 2D-COSY (Figura 26), de los diferentes extractos. Las diferentes señales se presentan como desdoblamiento de los espines que corresponden a las señales de los metabolitos con respecto a su protón. Las distintas señales se encuentran teniendo diferentes desplazamientos por toda la señal de radiofrecuencia, es decir, señales obtenidas en diferentes regiones pueden pertenecer a un mismo metabolito. Por lo que en conjunto del análisis 2D-COSY y el análisis bioinformático se logró asignar las señales a distintos metabolitos, donde los carotenoides presentaron la mayoría de los conjuntos de señales que pueden indicar los carotenoides principales en los extractos.

Se detectaron señales similares por parte de los extractos en la región alta de 0.9-2.35 ppm y de 3.67-4.19 ppm pertenecientes a señales de aminoácidos y carbohidratos (Chauton et al., 2003 y Chauton et al., 2004).

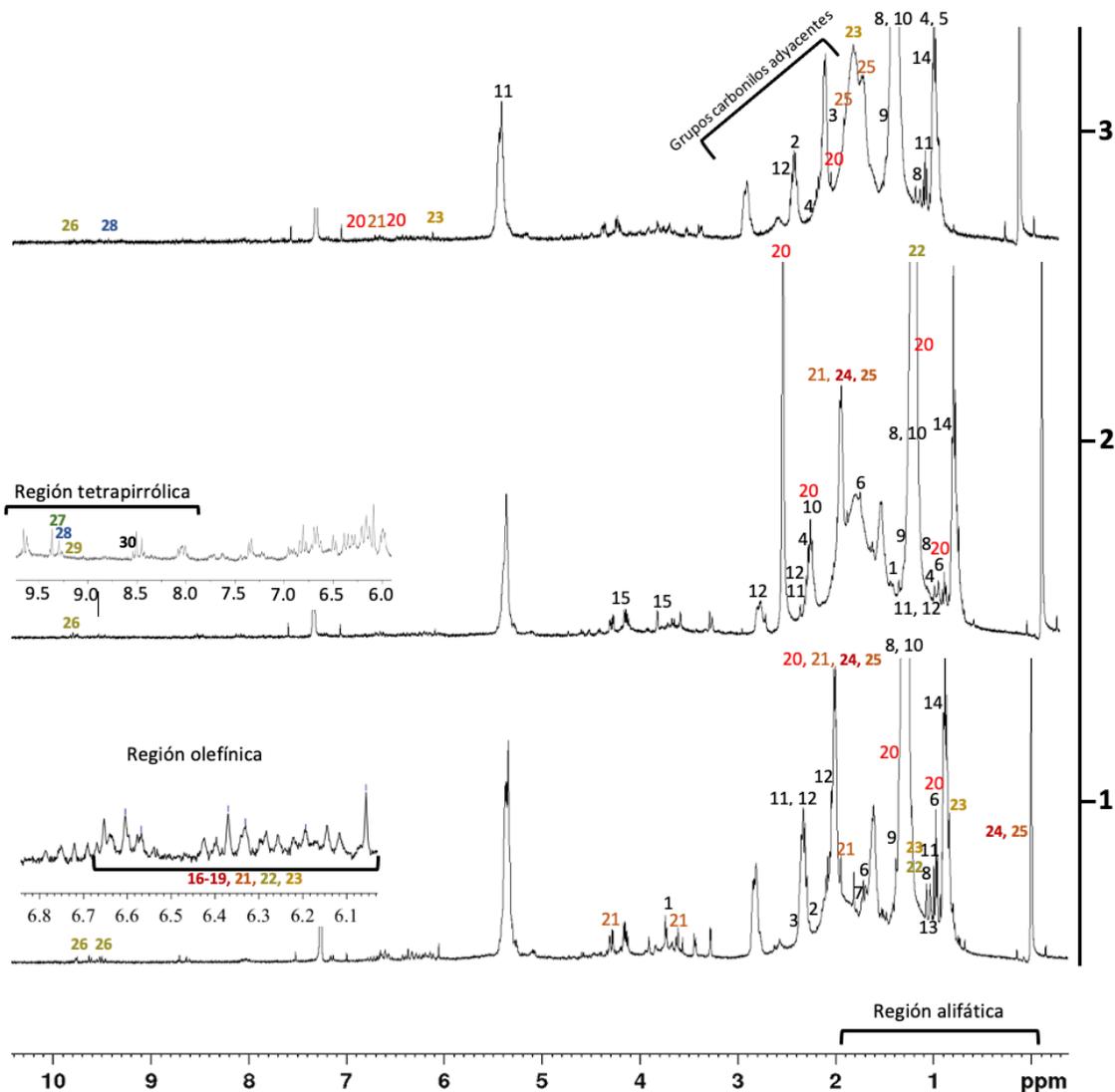


Figura 21. Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN ^1H) a 400 MHz de pigmentos extraídos de *Navicula incerta* con diferentes solventes: (1) acetona (2) metanol; (3) etanol. Los pigmentos fueron disueltos en CDCl_3 . 1, Alanina; 2 Ácido glutámico; 3, Prolina; 4, Valina; 5, Isoleucina; 6, Leucina; 7, Lisina; 8, Ácido palmítico; 9, Ácido oléico; 10, Ácido araquidónico; 11, Ácido linoleico; 12, α -linoleico; 13, Ácido esteárico; 14, Esterol; 15, Sucrosa; 16, Carotenoides (CH-11/11'; CH-15/15'); 17, Carotenoides (CH-12/12'); 18, Carotenoides (CH-14/14'); 19, Carotenoides (CH-7/7'; CH-8/8'; CH-10/10'); 20, **Fucoxantina**; 21, **Astaxantina**; 22, **Cantaxantina**; 23, **Luteína**; 24, **Violaxantina**; 25, **Zeaxantina**; 26, **Clorofila a**; 27, **Feofitina a** (α); 28, **Metil-feofirbide a** (β); 29, **Clorofila a** (α) y 30, Fitol.

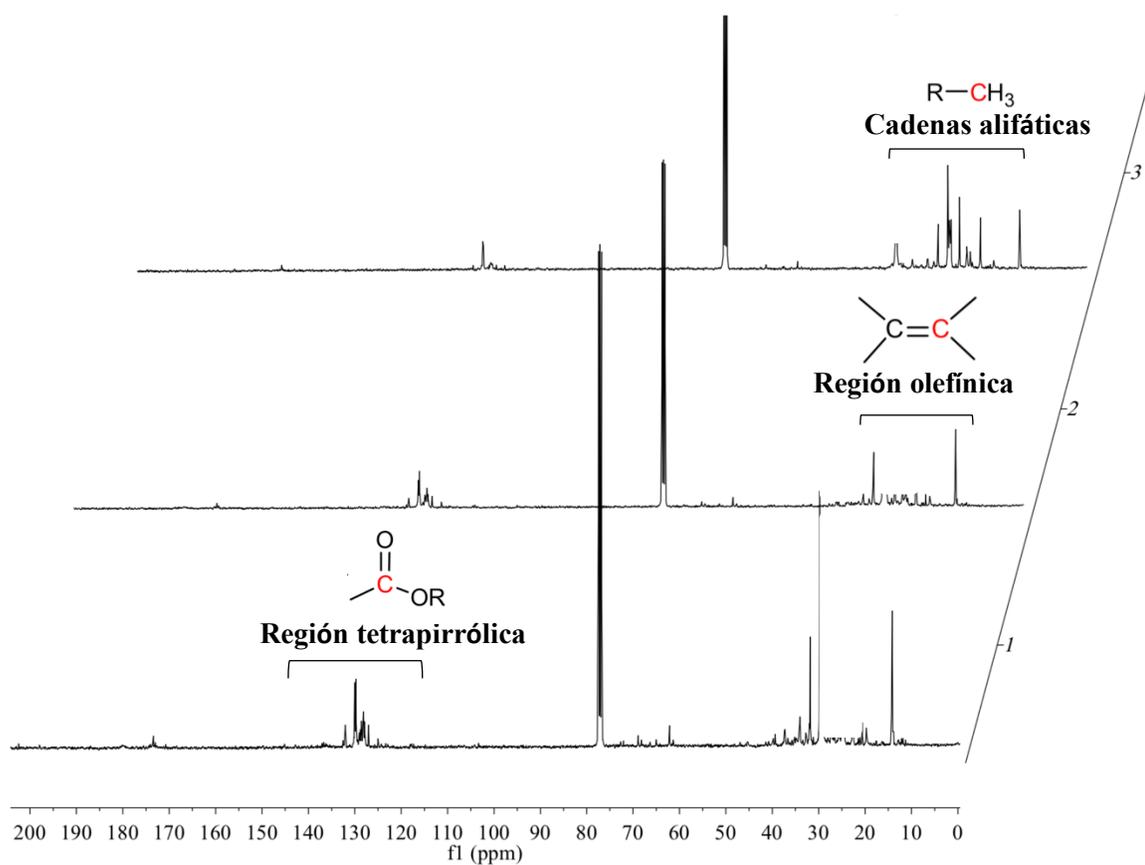


Figure 22. Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN- ^{13}C) a 400 MHz de pigmentos extraídos de *Navicula incerta* con diferentes solventes: (1) acetona; (2) metanol; (3) etanol. Los pigmentos fueron disueltos en CDCl_3 .

Tabla 17. Identificación de metabolitos y su H NMR (400 MHz, Metanol-D) asignado de *Navicula incerta* de tres extractos diferentes.

Grupo	Señales	Metabolito	1H NMR (multiplicidad)	Ex-EtOH	Ex-MetOH	Ex-Acet.
Región alifática	1	Alanina	1.49	-	+	-
	2	Ácido glutámico	2.39	+	-	-
			2.14	-	-	+
	3	Prolina	2.35(t)	-	+	-
			2.04	+	-	-
	4	Valina	2.29	-	+	+
			1.03	-	+	-
			0.98	+	-	-
5	Isoleucina	0.98	+	-	-	
6	Leucina	1.69; 0.96	-	+	+	
7	Lisina	1.73	-	-	+	
8	Ácido palmítico	1.29 (m)	+	+	+	
Región Olefínica			0.9	+	+	+
	9	Ácido oleico	1.32	+	+	+
	10	Ácido araquidónico	1.29 (m)	+	+	-
			2.35(m)	-	+	-
	11	Ácido linoleico	5.37	+	-	-
			2.37	-	+	+
	12	α -linoleico	0.9	+	+	+
			2.8; 0.96	-	+	-
	13	Ácido esteárico	2.35; 2.04	+	+	+
			1.01	-	-	+
	14	Esterol	0.92	+	+	+
0.88; 0.87			-	-	+	
15	Sucrosa	4.19	-	+	-	
		3.67	-	+	+	
Región Olefílica	16	Carotenoides (CH-11/11'; CH-15/15')	6.69-5.69	+	+	+
	17	Carotenoides (CH-12/12')	6.39-6.31	+	+	+
	18	Carotenoides (CH-14/14')	6.26-6.22	+	+	+
	19	Carotenoides (CH-7/7'; CH-8/8'; CH-10/10')	6.16-6.10	+	+	+
	20	Fucoxantina	6.81; 6.43; 2.07	+	-	-
Grupo	Señales	Metabolito	1H NMR (multiplicidad)	Ex-EtOH	Ex-MetOH	Ex-Acet.

			2.58; 2.31; 1.08	-	+	-
			1.99; 1.38	-	-	+
			0.97	-	+	+
21	Astaxantina		6.79	+	-	-
			6.20-6.70; 4.34; 2.01	-	-	+
			3.67; 1.98; 1.94	-	+	+
22	Cantaxantina		6.20-6.70	-	-	+
			1.19	-	+	+
23	Luteina		6.67-6.57; 6.26; 1.07; 1.01	-	-	+
			6.08; 1.74	+	-	-
			0.86	-	+	-
24	Violaxantina		1.98; 1.94	-	+	+
25	Zeaxantina		1.98	-	+	+
			1.97;1.74	+	-	-
Región tetrapirrólica	26	Clorofila a	9.85	+	+	+
			9.52	-	-	+
	27	Feofitina a (α)	9.38	-	+	-
	28	Metil-feofirbide a (β)	9.32	+	+	-
	29	Clorofila a (α)	9.29	-	+	-
	30	Fitol	8.55	-	+	-

Los extractos fueron disueltos en CDCl_3 .

Donde los principales fueron alanina, ácido glutámico, prolina, valina, isoleucina, leucina y lisina, y sucrosa como el único carbohidrato presente. Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C muestran señales características de los aminoácidos donde se muestran las señales de aminos y metilos detectadas en los tres extractos (Roberts et al 1970).

La asignación de los aminoácidos a las señales se respaldó con los resultados obtenidos del análisis de correlación espectroscópica de RMN ^1H bidimensional (2D-COSY) (Fig. 23), donde se logró identificar 7 aminoácidos y un tipo de carbohidrato simple. Por otro lado, los espectros de RMN ^1H desenmascaran la presencia de ácidos grasos en los tres extractos en la región de 1.29-5.37 ppm. Estas señales se reportan para los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y saturados, como el ácido palmítico [C16: 0], ácido oléico [C18: 1], ácido araquidónico [C20: 0], ácido linoleico [C18: 3], α -linoleico [C18: 2] y el ácido esteárico [C18:0] (Chauton et al., 2003; Chauton et al., 2004; Azizan et al., 2018).

Se observaron diferencias entre los diferentes extractos para la región olefínica de 6.0–7.0 ppm y tetrapirrólicas (8.0–10.0 ppm), que son las áreas características para la presencia de carotenoides, clorofilas y sus derivados. El extracto acetónico y metanólico presentaron señales con mayor abundancia en la región olefínica, donde el extracto acetónico tuvo el mayor número de señales. Las señales para los carotenoides se pueden encontrar en las regiones de 6.0–7.0 ppm de protones olefínicos (Englert et al., 1990). La identificación de estos carotenoides se confirmó mediante RMN 2D que muestra la relación entre las señales de protones olefínicos y protones encontrados en la región alifática. La fucoxantina presentó señales de protones en 6.81 y 6.43, 2.58, 2.31; 2.07, 1.99, 1.38, 1.08 y 0.97 ppm, la astaxantina presentó señales de protones en las regiones de 6.20-6.70, 6.79; 4.34; 3.67; 2.01 1.98 y 1.94 pmm. Las señales 6.20-6.70 pmm corresponden también a la cantaxantina. La luteína presentó señales en 6.67-6.57, 6.26, 6.08, 1.74, 1.07 y 1.01 pmm.

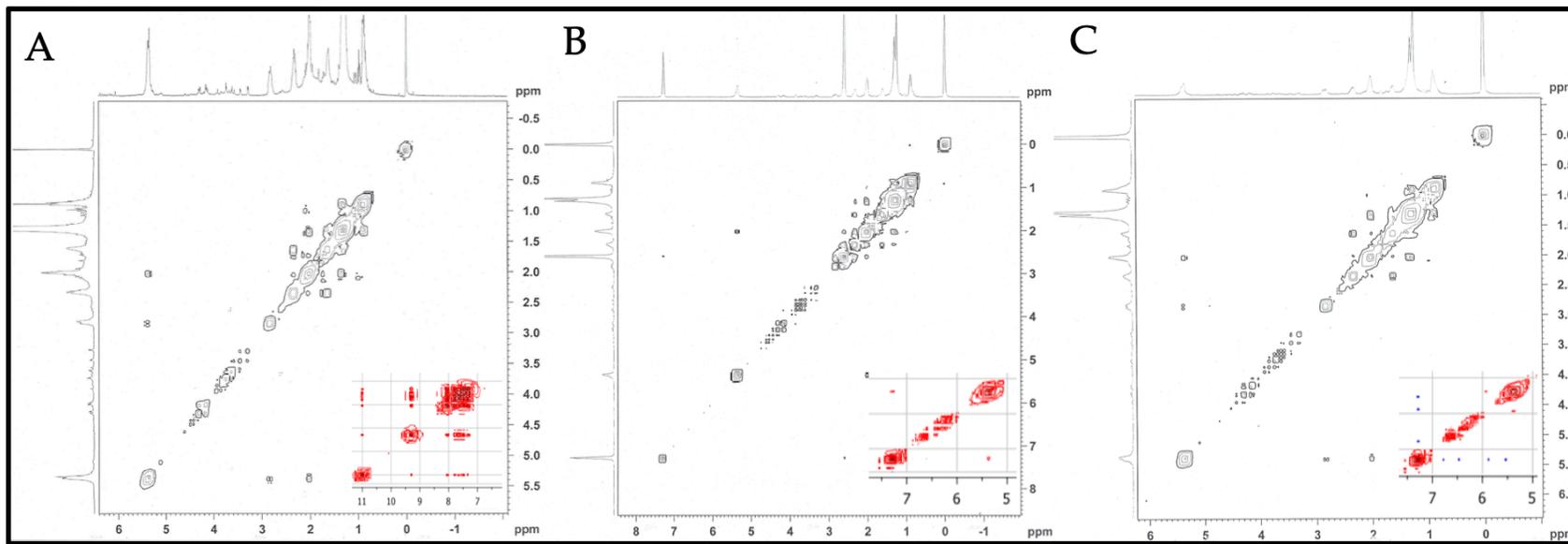


Figure 23. Análisis de correlación espectroscópica en dos dimensiones (RMN ¹H; 2D-COSY) a 400 MHz de diferentes extractos obtenidos de *Navicula incerta*: (A) Extracto acetónico; (B) Extracto metanólico; (C) Extracto etanólico. Los pigmentos fueron disueltos en CDCl₃.

Los carotenoides que se encuentran formando el ciclo de la violaxantina encargada de la epoxidación y desepoxidación controlada por factores como el exceso de irradiación o por deficiencia nutricional como la disminución de la concentración de nitrógeno se hicieron presentes. La violaxantina presentó señales en 1.98 y 1.94 ppm; mientras que, la zeaxantina en 1.98, 1.97 y 1.74 ppm.

Las clorofilas y sus derivados están presentes en la mayoría de las diatomeas marinas como pigmentos principales o accesorios. Las señales de los protones relacionados con la estructura tetrapirrólica y sus grupos funcionales se pueden encontrar en la región de 8 a 10 ppm de los espectros de RMN ^1H (Azizan et al., 2018). Los protones en las clorofilas se encuentran en los macrociclos dando efectos denominados “*ring current effect*” (Katz et al., 1983). La asignación de metabolitos por las señales emitidas de protones se identificó mediante bases de datos y el análisis 2d-COSY. Se identificó a la clorofila a en la región de 9.52 y 9.85 ppm, feofitina a (α) en 9.38, metil-feofirbida a (β) en 9.32, clorofila a (α) en 9.29 y fitil en 8.55. Los principales carotenoides presentes en diferentes diatomeas son el β -caroteno, fucoxantina, diadinoxantina y diatoxantina. Sin embargo, el estudio de su espectro electromagnético no se logró identificar señales provenientes de β -Caroteno, diadinoxantina y diatoxantina (Baudalet et al., 2012). La clorofila a y c_1 son las más abundantes en las diatomeas. No obstante, se detectaron derivados de las clorofilas como la feobirbide o fitil, que son compuestos con alta actividad biológica.

El espectro HSQC (Fig. 24) muestra la correlación de los carbonos anoméricos con sus respectivos protones e isótopos de carbono de los tres extractos. Los intervalos donde podemos encontrar a los compuestos alifáticos, olefínicos y tetrapirrólicos se encuentran bien definidos en la región δ 2.9-0.8/75-9.8 (^1H - ^{13}C); δ 6.8-6.1/120-140 (^1H - ^{13}C); δ 6.1-9.8/190-160 (^1H - ^{13}C), respectivamente. Las señales de los átomos del isótopo de carbono exhibieron correlaciones con los análisis anteriores presentados en amplitudes opuestas en el espectro DEPT-135 (Fig. 25).

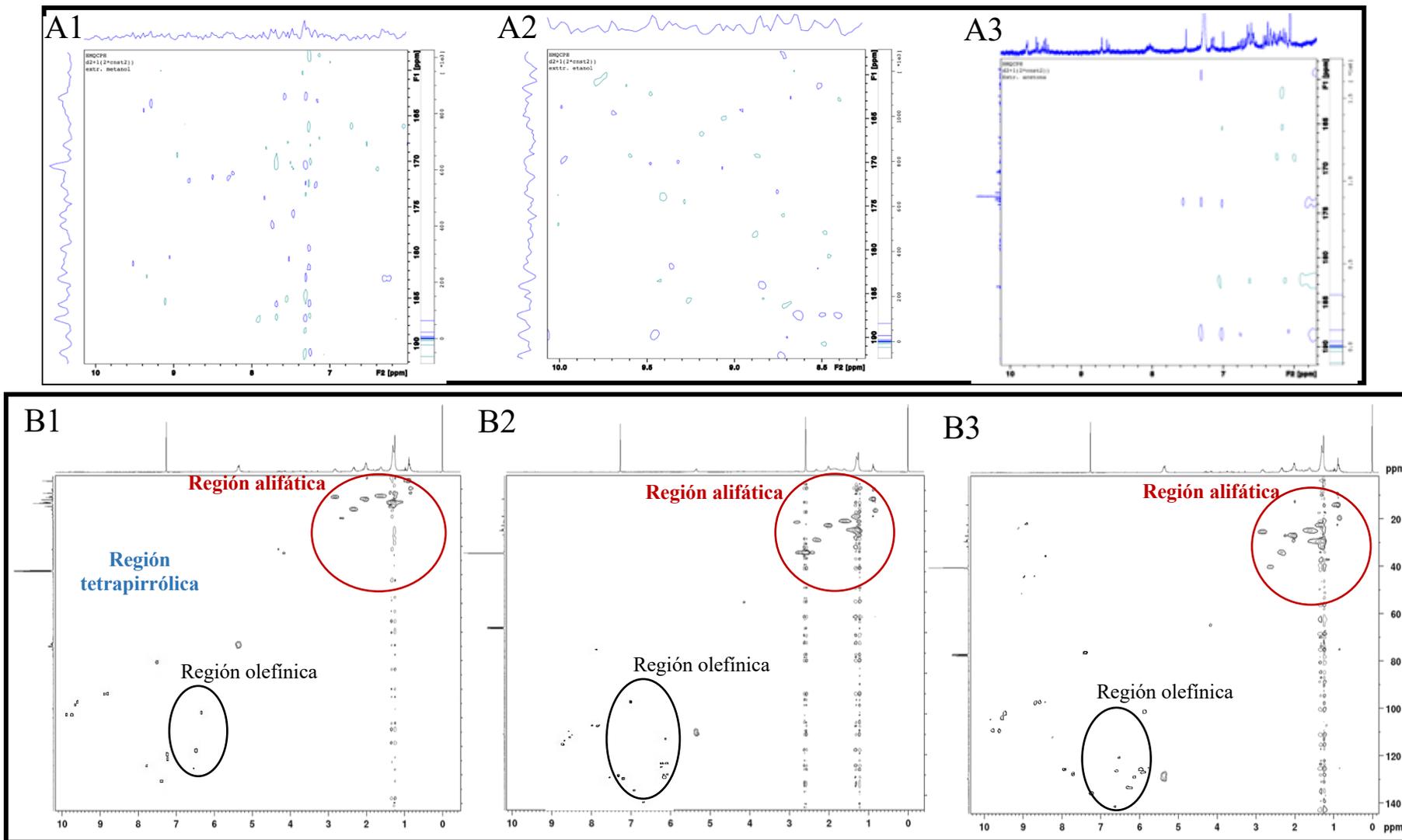


Figura 24. Espectroscopía de RMN ^1H - ^{13}C (HSQC) a 400 MHz de diferentes extractos obtenidos de *Navicula incerta*: (A1) extracto de acetona; (A2) extracto metanólico; (A3) Extracto etanólico. (B1) extracto de acetona; (B2) extracto metanólico; (B3) Extracto etanólico.

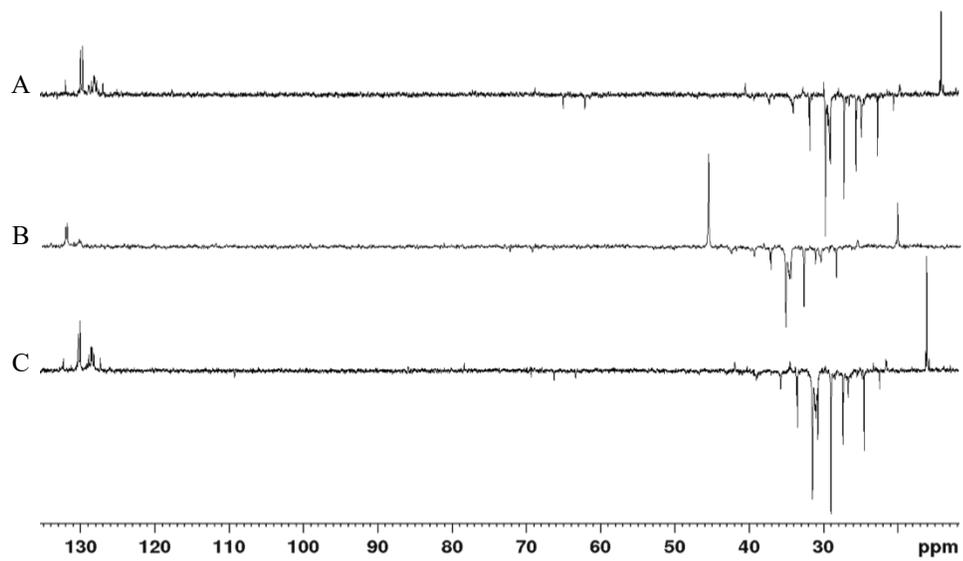


Figura 25. DEPT 135. (A) Ex. Acetónico. (B) Ex. Metanólico. (C) Ex. Etanólico. Picos arriba: CH y CH₃. Picos hacia abajo: CH₂.

De acuerdo con las correlaciones observadas en los espectros HSQC junto con el análisis bioinformático y la información encontrada en la literatura, la asignación de los metabolitos corresponde a las interacciones carbono-hidrógeno mostradas en los espectros HSQC. Los pigmentos se disolvieron en CDCl_3 .

Adicionalmente, se aplicó el experimento de DEPT-135 para corroborar la presencia de pigmentos en las muestras (carotenoides y clorofilas). Se consideraron señales de secuencias de pulsos emitidos por los carbonos de dos protones, los cuales presentan amplitud opuesta a los carbonos unidos a un protón y a tres protones. Es decir, esta secuencia de pulsos produce un espectro de carbono con metilo (CH_3) y metino (CH) que se distinguen por presentar señales o picos hacia arriba. El grupo funcional meteno (CH_2) se observa como picos hacia abajo en el espectro DEPT. La intensidad de grupos metilo y metino en el espectro hacen alusión a la presencia de metabolitos tetrapirrólicos y olefínicos. Ya que nos indican que podrían encontrarse compuestos con cadenas hidrocarbonadas altamente insaturados como los carotenoides y las clorofilas. Además, la presencia del grupo metilo pueden encontrarse como grupos funcionales de los mismos. Mientras que, la presencia de meteno en la región alifática puede indicar la presencia de compuestos de tipo proteico, ya que pueden contar con cadenas con un solo enlace sigma ($-\text{CH}_2-$) y estar interactuando con carbonos de la misma naturaleza. De acuerdo con el análisis bioinformático y a los experimentos de RMN hay correlación con el análisis de DEPT-135 que apoya la asignación de los metabolitos por sus señales de protones.

Análisis multivariado

Método quimiométrico: Análisis de componentes principales (PCA), discriminación por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y agrupamiento jerárquico.

Los métodos quimiométricos son utilizados para reconocer patrones que permitan extraer información relevante de la compleja matriz de datos metabólicos. Se clasifican

en métodos no-supervisados y supervisados. El primero se encarga de reducir la complejidad de una manera robusta, produciendo representaciones gráficas fácilmente interpretables. Mientras que, en los métodos supervisados, un grupo o conjunto de muestras de clase conocida se utilizan para construir un modelo matemático evaluando un conjunto independiente de muestras. El análisis de componentes principales (PCA) (Lindon et al. 2001), mientras que entre los supervisados hay diversos métodos o técnicas como el Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA). Estos análisis se han aplicado con éxito en muchas investigaciones para el estudio de perfilados de metabolómica. Es por ello, que para observar y analizar la complejidad de los datos obtenidos por las diferentes técnicas de RMN se aplicaron estas técnicas, que nos ayudaron a comprender mejor y a dar soporte al estudio.

El PCA se aplicó para poder representar los datos espectrales en un espacio de baja dimensionalidad (Fig. 26). Ya que son auto vectores de la diagonalización de la matriz de covarianza de los datos originales (Eriksson et al., 2013). En este estudio se dividieron tres componentes principales, donde, el componente principal 1 (CP-1) consistió en una combinación lineal de las variables espaciales ponderadas para mejor respuesta de la varianza total del espacio original; el segundo (CP-2) es ortogonal al primero y explica el máximo de la varianza residual; y en esta ocasión se presenta un componente principal 3 (CP-3) para explicar la varianza total (Lindon et al. 2001; Eriksson et al. 2005).

Se observó una clara correlación entre las señales del Ex. Acet. con el Ex. EtOH (0.7021) y Ex. MetOH (0.5418), con una $p < 0.001$. Por otro lado, no se encontró correlación entre los extractos metanólicos ni etanólicos lo que puede indicar que contienen señales de metabolitos diferentes ($p < 0.001$) (Tabla 18). Mientras tanto, el CP-1 eigenvector mostró correlación en los tres extractos; CP-2 y CP3 se mantienen de igual forma diferentes para los extractos metanólicos y etanólicos.

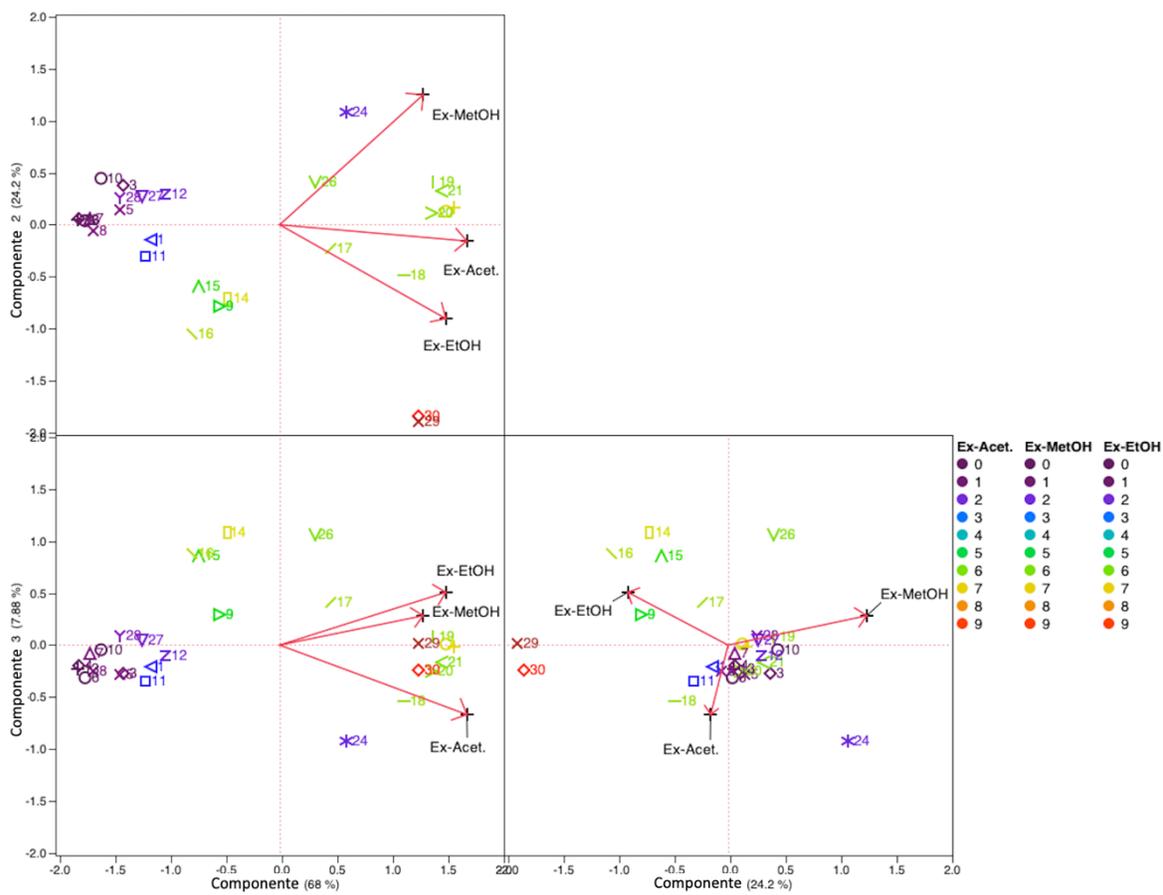


Figura 26. Análisis de componentes principales de las señales obtenidas por RMN de diferentes extractos de *Navicula incerta*.

Tabla 18. Análisis multivariado de correlación para los diferentes extractos de *Navicula incerta*.

	Correlación			Eigenvectores		
	Ex. EtOH	Ex. MetOH	Ex. Acet.	CP-1	CP-2	CP-3
Ex. EtOH	1.000	0.28868	0.7021	0.57591	-0.58263	0.57347
Ex. MetOH	0.2868	1.000	0.5418	0.49742	0.80643	0.31976
Ex. Acet.	0.7021	0.5418	1.000	0.64876	-0.10111	-0.75424

En el CP-1 se muestra 68% de varianza total y para CP-2 un 24.2 % de la varianza total. En el CP-1 se observa clara relación entre los 3 extractos, lo que indica que las señales provenientes del análisis de RMN pueden tener similitudes. Sin embargo, se pueden observar grupos diferentes, donde resaltan en color morado-azul los cuales pertenecen a la región alifática (δ 2.9-0.8).

No obstante, el metabolito 24 que corresponde a una señal de un protón de violaxantina está separada del mismo grupo, lo que indica que, aún perteneciendo a la región alifática, se puede observar una señal doble o duplete por medio del 2D-COSY; es decir, de acuerdo con la pirámide de pascal la señal de este protón se desdobra y esta puede estar en dos regiones del espectro de RMN. Este fenómeno se observa en el CP-2 y en el CP-3. No obstante, el score plot muestra a los extractos separados en diferentes regiones como lo indican las correlaciones explicadas anteriormente. Por último, el PCA nos muestra buena separación de los grupos, indicándonos las similitudes de las señales, así como sus diferencias.

Posteriormente, para comprender las similitudes y diferencias de las señales, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico de mapeo de color (Figura 27). El análisis mostró un agrupamiento de señales similares en diferentes secciones diferenciadas por colores para los tres extractos. El dendograma mostró un patrón de agrupamiento, donde el grupo con colores morados y azules indican señales que van del 0.87 al 4.12. Las señales de protones pertenecen a la misma región alifática. Sin embargo, también pueden pertenecer a compuestos de otras regiones. Las señales en este grupo se divide en dos subgrupos: 1, 4, 6, 7, 8, 11, 13 (Alanina, Valina, Leucina, Lisina, ácido Palmítico, ácido Linoleico y ácido Esteárico) y 3, 5, 10, 12, 27, 28 (prolina, Isoleucina, ácido Araquidónico, α -linoleico, Feofitina α (α) y Metil-feofirbide β (β)). El segundo grupo corresponde a las señales: 9, 14, 15 y 16 (ácido Oleico, esterol, sucrosa y señales de una variedad de carotenoides). El tercer grupo: 17, 18, 19, 20, 21, 26 y 22, 24, 25 (carotenoides varios, Fucoxantina, Astaxantina, Clorofila a y Cantaxantina, Violaxantina, Zeaxantina. Cuarto grupo: 29 y 30 (Clorofila a (α) y cadena fitil).

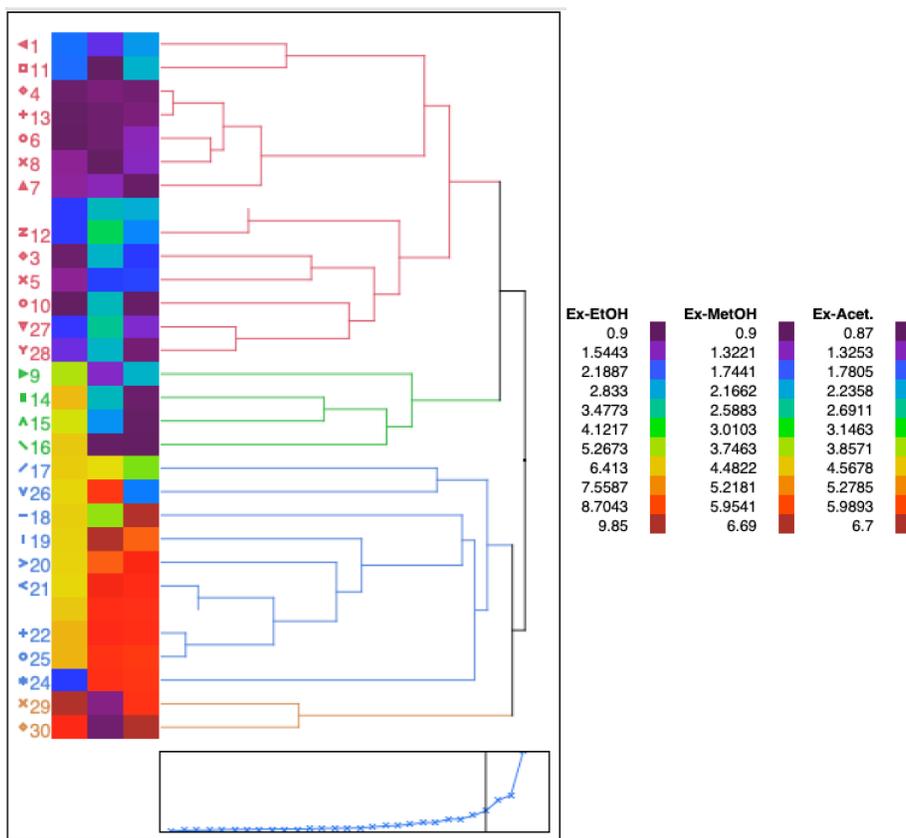


Figura 27. Señales del espectro de ^1H -RMN mostrados en agrupamiento jerárquico para observar las similitudes de las señales y las diferencias por medio de división en grupos de tres extractos de *N. incerta* por similitudes.

Con el objetivo de encontrar variaciones relevantes entre las señales se realizó el análisis de PLS-DA que proporciona un método gráfico para una fácil comprensión. Para ello, se aplica un método de regresión lineal supervisada basado en la combinación de una matriz (Fig. 28). Con la regresión lineal podemos observar como las señales de la clorofila y sus derivados se encuentran separadas de señales de otras regiones de su espectro. Separando a las señales de aminoácidos, ácidos grasos, esteroides y carotenoides. Mientras que en la Figura 29 se muestran la misma separación para el extracto etanólico y acetónico. Por otro lado, la distribución de señales en el extracto metanol se observan con una mayor separación.

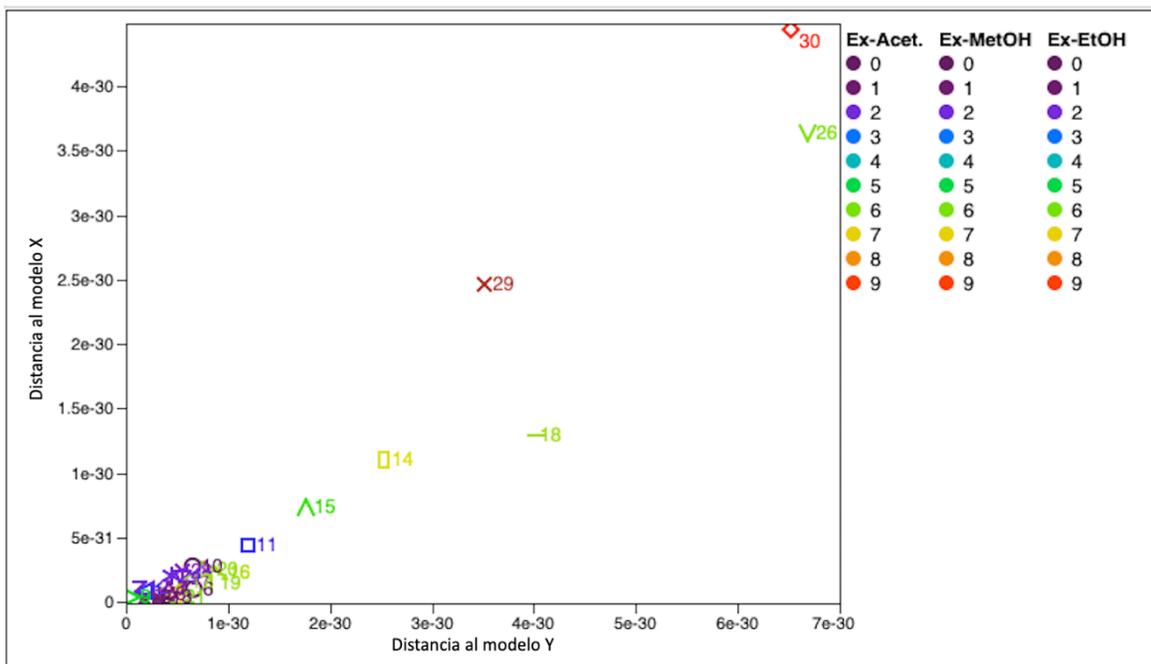


Figura 28. PCA y regresión lineal de señales del espectro de ^1H -RMN de tres extractos de *Navicula incerta* por similitudes.

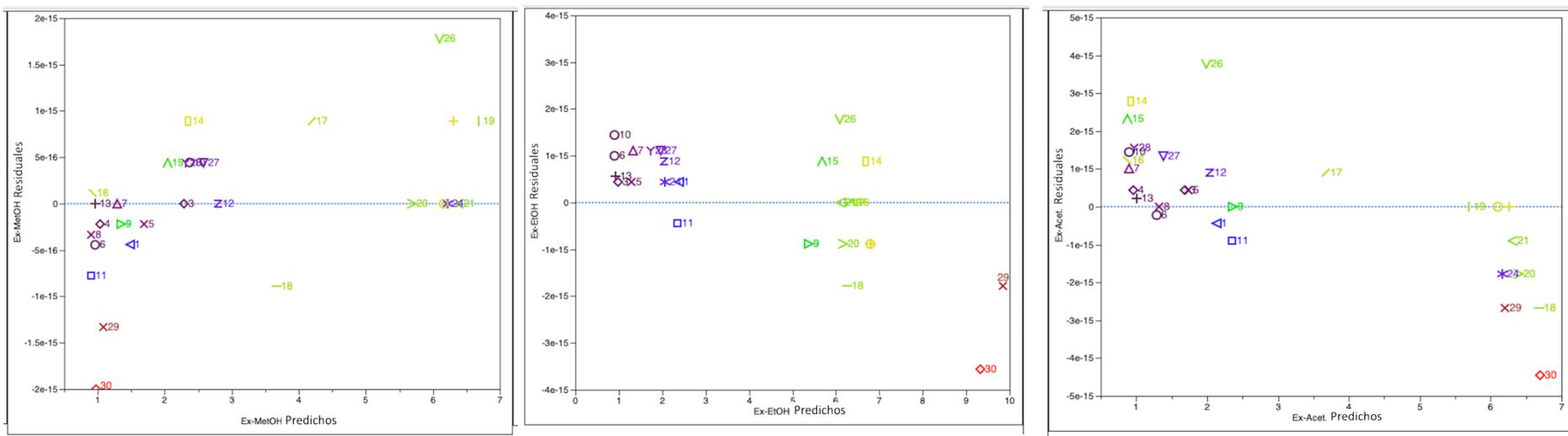


Figura 29. Discriminación por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) de señales del espectro de $^1\text{H-RMN}$ de tres extractos de *Navicula incerta* por similitudes.

CONCLUSIONES

Los estudios de optimización para el cultivo de la microalga *N. incerta* mejoraron significativamente la producción de pigmentos como clorofila y carotenoides para obtener la máxima eficiencia que podría implementarse en varios sectores industriales. Los resultados demostraron que la metodología de superficie de respuesta fue una herramienta útil para optimizar las condiciones de crecimiento para obtener biomasa en poco tiempo y reducción de costos utilizando medio F/4 con 40 PSU de salinidad a los 3.5 días de cultivo y con extracto metanólico. Los pigmentos contenidos en los extractos de la microalga son prácticamente no tóxicos y presentan alto potencial antioxidante, antihemolítico, eritroprotector, antiinflamatorio y antiproliferativo. Un dato interesante fue la asociación de los grupos sanguíneos ABO y Rh con la acción citotóxica y la actividad antihemolítica, en donde el grupo O y B fueron menos susceptibles al efecto citotóxico de los extractos y el efecto antihemolítico de los extractos se incrementó en presencia del antígeno A+. Este enfoque de análisis combinatorio de diferentes actividades biológicas puede ser útil para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos o alimentos funcionales dirigidos a personas que tienen mayor riesgo de padecer enfermedades crónicas asociadas a un grupo sanguíneo específico. Por lo tanto, esta investigación proporciona las bases para futuras investigaciones sobre su uso como agente quimiopreventivo de enfermedades crónicas no transmisibles de alto impacto social.

RECOMENDACIONES

1. Realizar un *screening* antioxidante completo utilizando diferentes metodologías a las ya presentadas, tales como, inhibición del radical hidroxilo, peroxilo, entre otros.
2. Profundizar en la parte de los mecanismos de la actividad antiproliferativa, mediante citometría de flujo y analizar el tipo de muerte celular que se lleva a cabo para las líneas celulares de HeLa y PC-3
3. Determinar los mecanismos de acción de los compuestos bioactivos sobre el efecto protector sobre los eritrocitos sanguíneos y elucidar un posible mecanismo protector. Elucidar que tipo de uniones se podrían estar presentando en ese caso.
4. Determinar la viabilidad eritrocitaria mediante el estudio de eritosis celular después de la aplicación de radicales libres sobre la membrana de GR.
5. Realizar estudios prospectivos y de laboratorio para definir los mecanismos por los cuales diferentes antígenos influyen en el efecto de los compuestos bioactivos.
6. Identificar por medio de HPLC los pigmentos obtenidos.
7. Con base a los resultados *in vitro* y *ex vivo*, comenzar un bioensayo *in vivo* con organismos murinos para observar el efecto de los pigmentos con la finalidad de saber si son preventivos o curativos: Actividad antiinflamatoria, anticancerígena o antidiabética.

REFERENCIAS

- Affan, A.R. Karawita, J. You-Jin, y Joon-Baek, L. (2007). "Growth characteristics and antioxidant properties of the benthic diatom *Navicula incerta* (bacillariophyceae) from jeju Island, Korea". *Phycological Society of America* 43:823–832.
- Agarwal, H. y Shanmugam V.K. (2019). Anti-inflammatory activity screening of *Kalanchoe pinnata* methanol extract T and its validation using a computational simulation approach. *Informatics in Medicine Unlocked* 14:6–14.
- Alcaráz-López, O.A. (2009). Determinación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria in Vitro de las plantas medicinales *Heterotheca inuloides*, *Calea urticifolia*, *Buddleia* spp. y *Sambucus* spp. usadas en el estado de Jalisco. Tesis de Maestría presentada en el Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara. Pp. 48-49.
- Aly, R., Yousef, A., Elbably, O., (2014). Association of ABO blood group and risk of breast cancer. *J. Blood Disord. Transfus.* 5, 241.
- Anderson, M. (2001). "Method of Inhibiting 5 α -Reductase with Astaxanthin to Prevent and Treat Benign Prostate Hyperplasia (BPH) and Prostate Cancer in Human Males". U.S. Patent 6277417, 21.
- Anderson, I., K. McGlathery, y A. Tyler. (2003). "Microbial mediation of "reactive" nitrogen transformations in a temperate lagoon. *Marine Ecology Progress Series* 246:73–84.
- AOAC (2016). Official methods of analysis of AOAC International (20th ed.). Arlington, VA, USA.
[http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC/Publications/Official Methods of Analysis/AOAC Member/Pubs/OMA/AOAC Official Methods of Analysis.aspx](http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC/Publications/Official_Methods_of_Analysis/AOAC_Member/Pubs/OMA/AOAC_Official_Methods_of_Analysis.aspx).
- Athmouni, K., Belhaj, D., El Feki, A., Ayadi, H., (2017). Optimization, antioxidant properties and GC-MS analysis of *Periploca angustifolia* polysaccharides and chelation therapy on cadmium-induced toxicity in human HepG2 cells line and rat liver. *Int. J. Biol. Macromol.* 108, 853-862.
- Azizan, A., Safwan, M., Bustamam, A., Maulidiani, M., Shaari, K., Safinar I., Ismail, Nagao, N. y Abas, F. (2018). Metabolite Profiling of the Microalgal Diatom *Chaetoceros Calcitrans* and Correlation with Antioxidant and Nitric Oxide Inhibitory Activities via ¹H NMR-Based Metabolomics. *Mar. Drugs*.16:154.

- Barahona-Gomariz M.V., Sanz-Barrera F., Sánchez-Fortón S. (1994). Acute Toxicity of Organic Solvents on *Artemia salina*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52:766-771.
- Barreiro, C. y Barredo J.J. (2018). Microbial Carotenoids: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9_4,
- Batista G. A., Charles M. B., Mancini F. J., Vidal N. A. (2009). Seaweeds as sources of antioxidant phytochemicals. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 14(2): 1-18.
- Baudelet P. H., G. Anne-Laure, B. Jean-Baptiste, J. Camille, B. Nicolas, R. Kaas. V. Thiéry, J. P. Cadoret, y P. Laurent. (2013). "Antiproliferative Activity of *Cyanophora paradoxa* Pigments in Melanoma, Breast and Lung Cancer Cells". *Marine Drugs*, 11, 4390-4406.
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escalera, L.A., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 76, 965–977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>.
- Becerra-Martínez, E., Florentino-Ramos, E., Pérez-Hernández, N., Zepeda-Vallejo, L. G., Villa-Ruano, N., Velázquez-Ponce, M., y Bañuelos-Hernández, A. E. (2017). 1H NMR- based metabolomic fingerprinting to determine metabolite levels in serrano peppers (*Capsicum annum* L) grown in two different regions. *Food Research International*, 102, 163–170.
- Becker, W. (2005). "The nutritional value of microalgae for aquaculture". *Microalgae for aquaculture* 380-391. In Richmond, A. (ed.), *Handbook of microalgal culture. Biotechnology and Applied Phycology Blackwell Oxford*.
- Belokoneva, O. S., Villegas, E., Corzo, G., Dai, L., & Nakajima, T. (2003). The hemolytic activity of six arachnid cationic peptides is affected by the phosphatidylcholine- to-sphingomyelin ratio in lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1617, 22–30.
- Bogorad L. (1962). "Chlorophylls. *Physiology and Biochemistry of Algae*". Lewin RA. PP. 385-408.
- Borowitzka, M.A. (1998). "Vitamins and fine chemicals from micro-algae". In *Micro-Algal Biotechnology*; Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK; Pp. 153–196.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., & Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151: 315–331.

- Calderon Oliver, M., Escalona Buendía, H., Medina Campos, O.N., Pedraza Chaverri, J., Pedroza Islas, R., Ponce Alquicira, E., 2016. Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts. *LWT-Food Sci. Technol.* 65, 46-52. doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.048.
- Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 2003, 9, 653–660.
- Chandra S, Chatterjee P, Dey P, Bhattacharya S. Evaluation of anti-inflammatory effect of Ashwagandha: a preliminary study in vitro. *Pharm J* 2012; 4:47–9. <https://doi.org/10.5530/pj.2012.29.7>.
- Chauton, M.S.; Storseth, T.R.; Johnsen, G. (2003) High-resolution magic angle spinning ^1H NMR analysis of whole cells of *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae): Broad range analysis of metabolic composition and nutritional value. *J. Appl. Phycol.* 15, 533–542.
- Chauton, M.S., Størseth, T.R. y Krane, J. High-resolution magic angle spinning NMR analysis of whole cells of *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae) y comparison with ^{13}C -NMR and distortion less enhancement by polarization transfer ^{13}C -NMR analysis of lipophilic extracts. *J. Phycol.* **2004**, 40, 611–618.
- CUBOCUC (CUBoulder Organic Chemistry Undergraduate Courses). 2011. TLC – Retention Factor (Rf). University of Colorado. Disponible en: <http://orgchem.colorado.edu/hndbksupport/TLC/TLCrf.html>. Accesado en febrero 2014.
- CYTED: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 2014. Consultado en: <http://www.cytel.org>. Accesado 24 de enero de 2014.
- D'Archivio, Angelo Antonio, Maria Anna Maggi, Fabrizio Ruggieri. (2018). Extraction of curcuminoids by using ethyl lactate and its optimization by response surface methodology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 149: 89–95.
- Davies, B. Carotenoids. (1976) In *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*; Academic Press: London, UK, Volume 2, pp. 38–165.
- Dere, S. Gúnes, T. y Sivaci, R. 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll - A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany* 22:13-17.
- Dore CMPG, Alves MGCF, Will LSEP, Costa TG, Sabry DA, Rêgo LARS, Accardo CM, Rocha HAO, Filgueira LGA y Leite EL. (2013). A sulfated polysaccharide, fucans,

- isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. *Carbohydr Polym*, 91:467–475.
- Elisha IL, Dzoyem J, Mcgaw LJ, Botha FS, Eloff JN. (2016). The anti-arthritic, anti-inflammatory, antioxidant activity and relationships with total phenolics and total flavonoids of nine South African plants used traditionally to treat arthritis. *BMC Complement Altern Med*. 16:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1301-z>.
- Egeland, E.S. (2016). “Carotenoids. In *The Physiology of Microalgae: Developments in Applied Phycology*”; Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A., Eds.; Springer: Cham, Switzerland; Pp. 507–563.
- Esteban, R.; Martinez, B.; Fernandez-Marin, B.; Becerril, J.S.; Garcia-Plazaola, I. (2009). “Carotenoid composition in Rhodophyta: Insights into xanthophyll regulation in *Corallina elongata*”. *European Journal of Phycology*. 44, 221–230.
- Eriksson, L., Johansson, E., Trygg, J., y Vikström, C. (2013). Multi and megavariate data analysis: Basic principles and application (4th ed.). Sweden: Umetrics Academy (Chapter 1-8).
- Farhud, D.D., Yeganeh, M.Z. (2013). A brief history of human blood groups. *Iran. J. Public Health* 42:1–6.
- Fimbres-Olivarría D. J.A. López-Elías, L.R. Martínez-Córdova, E. Carvajal-Millán, F. Enríquez-Ocaña, E. Valdéz-Holguín y A. Miranda-Baeza. (2015). “Growth and Biochemical Composition of *Navicula* sp. Cultivated at Two Light Intensities and Three Wavelengths”. *The Israeli Journal of Aquaculture*. 67:1155.
- Florentino-Ramos, E., Villa-Ruano, N., Hidalgo-Martínez, D., Ramírez-Meraz, M., Méndez-Aguilar, R., Velásquez-Valle, R., Zepeda-Vallejo, LG., Pérez-Hernández, N. and Becerra-Martínez E. (2019). 1H NMR-based fingerprinting of eleven Mexican *Capsicum annuum* cultivars. *Food research international* 121:12-19.
- Gagez, A.-L.; Thiéry, V.; Pasquet, V.; Cadoret, J.-P.; Picot, L. (2012). “Epoxy-carotenoids and cancer”. Review. *Curr. Bioact. Compd.*, 8: 109–141.
- García, DE. Ojeda, F. y Montejo, I. (2003). Evaluación de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba* (Linn.). I Análisis cualitativo de metabolitos secundarios. *Pastos y Forrajes*. 26:335.
- García, G. M., J. Moreno, J. C. Manzano, F. J. Florencio, and M. G. Guerrero. (2005). “Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis-b- carotene and lutein in a

- closed tubular photobioreactor". *Journal of Biotechnology* 115:81-90.
- García, CM. Kim, P. Bich, NB. Tillan, NT. Romero, J. C. Dario, JA. y Fuste, V.M. (2009). Metabolitos secundarios en los extractos secos de *Passiflora Incarnata* L, *Matricaria recutita* L. y *Morinda citrifolia* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 14(2):1-5.
- Galindo WF, Rosales M, Murgueitio E, y Larrahondo JE. (1989). Sustancias antinutricionales en las hojas de guamo, nacedero y matarratón. *Lives Res*, 1(1) 1-6.
- Geider, J. La Roche, R.M. Greene, M. Olaizola. (1993). Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation, *J. Phycol.* 29:755–766.
- Govindappa M, Channabasava R, Dv S, Meenakshi J, Lavanya A, Santoyo G, et al. Phytochemical screening, antimicrobial and in vitro anti-inflammatory activity of endophytic extracts from *Loranthus* sp. *Pharm J.* 3:82–90. <https://doi.org/10.5530/pj.2011.25.15>.
- Goiris, K., W. Van, I. Wilches, F. León, L. D. Cooman, K. Muylaert. (2015). "Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae". *Algal Research* 7: 51–57.
- Gong, M.; Bassi, A. (2016). "Carotenoids from microalgae: A review of recent developments". *Biotechnol. Adv.* 34: 1396–1412.
- González MS. V. H. Perales, and A. M. Salcedo. (2008). "La fluorescencia de la Clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el efecto fotosintético de plantas y algas". *REB*, 27(4): 119-129.
- Guerin, M.; Huntley, M.E.; Olaizola, M. (2003). "*Haematococcus* astaxanthin: Applications for human health and nutrition". *Trends Biotechnology*, 21, 210–216.
- Gulati O. P., P. B. Ottaway, Coppens P. (2014). Chapter 14 – Botanical Nutraceuticals, (Food Supplements, Fortified and Functional Foods) in the European Union with Main Focus on Nutrition And Health Claims Regulation. Nutraceutical and Functional Food Regulations in the United States and Around the World (Second Edition) A volume in Food Science and Technology. Pages 221–256.
- Guillard, R.R.L. y J.H. Ryther (1962). Studies of marine plank- tonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal*

of Microbiology 8: 229-239.

- Hanrahan, G. Lu, K. (2006). Application of Factorial and Response Surface Methodology in Modern Experimental Design and Optimization. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36:14.
- Hancock, J.T.; Desikan, R.; Neill, S.J. (2001). "Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways". *Biochemistry Society Trans.* 29:345–350.
- Hernández, A and J. I. Labbé. (2014). "Microalgas, cultivo y beneficios". *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2):157-173.
- Hussein, G.; Nakamura, M.; Zhao, Q.; Iguchi, T.; Goto, H.; Sankawa, U.; Watanabe, H. Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. *Biol. Pharm. Bull.* 2005, 28, 47–52.
- Imaizumi, Y.; Nagao, N.; Yusoff, F.M.; Taguchi, S.; Toda, T. (2014). Estimation of optimum specific light intensity per cell on a high-cell-density continuous culture of *Chlorella zofingiensis* not limited by nutrients or CO₂. *Bioresour. Technol.* 162, 53–59.
- Jeffrey, S. Chlorophyll and carotenoid extinction coefficients. (1997). In *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*; UNESCO: Paris, France. Pp. 595–596.
- Jiménez, C., B. R. Cossío, and F. X. Niell, (2003). "Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield". *Aquaculture* 221: 331-345.
- Hong K., S. Sun, W. Tian, G.Q. Chen, W. (1999). Huang, A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared Spectroscopy, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:523–526.
- Kana, T.M.; Glibert, P.M.; Goericke, R.; Welschmeyer, N.A. (1998). "Zeaxanthin and β -carotene in *Synechococcus* WH7803 respond differently to irradiance". *Limnology. Oceanography*, 33:1623–1627.
- Kansiz, M., Heraud, P., Wood, B., Burden, F., Beardall, J., McNaughton, D.: Fourier Transform Infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains. *Phytochem.* 52, 407–417 (1999).
- Kang, K.-H. y Kim, S.K. (2013). "Beneficial effect of peptides from microalgae on

- anticancer". *Current Protein and Peptide Science*. 3:212-217.
- Kang, Kyong-Hwa, Zhong-Ji Qian, BoMi Ryu, and Se-Kwon Kim. (2011). "Characterization of growth and protein contents from microalgae *Navicula incerta* with the investigation of antioxidant activity of enzymatic hydrolysates". *Springer*.
- Katz, J.J.; Brown, C.E. 1983. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of chlorophylls and corrins. *Structure*. 5:3–49.
- Kajikawa, T.; Okumura, S.; Iwashita, T.; Kosumi, D.; Hashimoto, H.; Katsumura, S. (2012). Stereocontrolled total synthesis of fucoxanthin and its polyene chain-modified derivative. *Org. Lett.* 14:808–811.
- Kim, S.k., and I. Wijesekara. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. *Journal of Functional Foods*. 2:1-9.
- Kotecha R., A. Takami and J. L. Espinoza. (2016). Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA, United States of America.
- Kumar, S.R.; Hosokawa, M.; Miyashita, K. Fucoxanthin: A marine carotenoid exerting anti-cancer effects by affecting multiple mechanisms. *Mar. Drugs* 2013, 11, 5130–5147.
- Kreuzaler, P. y Watson, C.J. (2012). Killing a cancer: what are the alternatives. *Nat Rev Cancer* 12: 411-424.
- Laokuldilok, N., Thakeow, P., Kopermsub, P., Utama-ang, N., 2016. Optimizations of microencapsulation of turmeric extract for masking flavor. *Food Chem.* 194, 695–704. doi: 10.13140/RG.2.1.2788.1443
- Lau, P.S., N.F.Y Tam, and Y.S. Wong, (1995). "Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater". *Environmental Pollution* 89: 59-66.
- Lee, K.K., Kim, J.H., Cho, J.J. y Choi, J.D. (1999). Inhibitory effects of 150 plants extracts on elastase activity, and their anti-inflammatory effects. *International Journal of Cosmetic Science*. 21: 71-82.
- Lee, S.Y.; Mediani, A.; Khatib, A.; Ismail, I.S.; Zawawi, N.; Abas, F. Comparison of partial least squares and random forests for evaluating relationship between phenolics and bioactivities of *Neptunia oleracea*. *J. Sci. Food Agric.* 2018, 98, 240–252. [CrossRef] [PubMed].

- Lemoine, Y. B. Schoefs. (2010). Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress, *Photosynth. Res.* 106:155–177.
- Leos-Rivas. 2010. Estudio de la actividad biológica de los extractos de tres plantas de la familia Boraginaceae. (Tesis doctoral.) Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Biológicas, Nuevo León.
- Li, Y., Li, S., Lin S.J., Zhang J.J., Zhao, C.N., Li, H.B., 2017. Microwave-assisted extraction of natural antioxidants from the exotic *Gordonia axillaris* fruit: Optimization and identification of phenolic compounds. *Molecules.* 22, 1481. doi: 10.3390/molecules22091481.
- Lichtendthaler y Welburn. (1983). “Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Botanisches Institut der Universität, Kaiserstraße 12). Department of Biological Sciences, University of Lancaster, Bailrigg, Lancaster LA1 4YQ, UK.
- López-Elías JA, D. Fimbres-Olivarria, L. A. Medina-Juárez, A. Miranda-Baeza, L. R. Martínez-Córdova, and D. M. A. Molina-Quijada. (2013). “Production of biomass and carotenoids of *Dunaliella tertiolecta* in nitrogen-limited cultures”. *International journal of experimental botany PHYTON* 82: 23-30.
- López-Elías J.A., R. González-Vega, E. Márquez-Ríos, and W. Torres-Arreola. (2015). “Effect of nitrogen source and concentration to produce proteins in mass cultures of the microalgae *Chaetoceros muelleri*”. *International Journal of Experimental Botany PHYTON* 84: 331-337.
- Lu, J.; Jin, Y.; Liu, G.; Zhu, N.; Gui, M.; Yu, A.; Li, X. Flavonoids from the leaves of *Actinidia kolomikta*. *Chem. Nat. Compd.* 2010, 46, 205-208
- Malgas. (2013). Aplicaciones de las microalgas. *AST Ingeniería S.L. Asturias. España.* 72.
- Macías-Sánchez, M.D.; Serrano, C.M.; Rodríguez, M.R.; de la Ossa, E.M.; Lubián, L.M.; Montero, O. (2008). Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent. *J. Sep. Sci.* 31, 1352–1362.
- Mara, D. (1997). “Design Manual for waste stabilization ponds in India”. *England. British Library.* 125.

- Masamoto, K.; Zsiros, O.; Gombos, Z. (1999). "Accumulation of zeaxanthin in cytoplasmic membranes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942 grown under high light condition". *Journal of Plant Physiology*. 155, 136–138.
- Markt S.C., Shui, I.M., Unger, R.H. et al., 2015 "ABO blood group alleles and prostate cancer risk: results from the breast and prostate cancer cohort consortium (BPC3)," *Prostate*. 75(15): 1677–1681.
- Maron, D.M.; 1983. Ames, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mut. Res.* 113, 173–215.
- McLeod, H.L. (2013). Cancer pharmacogenomics: early promise, but concerted effort needed. *Science* 339: 1563-1566.
- Meo S.A., Suraya F., Jamil B., F.A.R., Meo A.S., Mohammad K.S. Ansari J. and Alasiri S.A. (2017). Association of ABO and Rh blood groups with breast cancer. *Saudi Journal of Biological Sciences*. doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.01.058
- Molina-Salinas, G. M., and Said-Fernández, S. 2006. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacology online*. 3: 633-638.
- Molyneux P. (2004). The use of the stable radical Diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology*. 26(2): 211–219.
- Montero L., A. P. Sánchez-Camargo, V. García-Cañas, A. Tanniou, V. Stiger-Pouvreau, M. Russo, L. Rastrelli, A. Cifuentes, M. Herrero, E. Ibáñez. 2015. Anti-proliferative activity and chemical characterization by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry of phlorotannins from the brown macroalga *Sargassum muticum* collected on North-Atlantic coasts. *Journal of Chromatography A*.
- Moovendhan, M., Ramasubburayan, R., Vairamani, S., Shan- mugam, A., Palavesam, A., Immanuel, G. (2015). Antibiotic efficacy and characterization of mangrove metabolites against UTI microbes. *J. Herb. Spices Med. Plant*. 21(2), 129–139.
- Moovendhan, M., Seedeivi, P., Shanmugam, A., Vairamani, S.: Antibiotic susceptibility and functional group characterization of *Pinna nobilis* Metabolites against clinical isolates. *J. Biol. Active Prod. Nat.* 5(1), 52–57 (2015) 40.
- Neves RAF, Fernandes T, Santos LN & Nascimento SM Toxicity of benthic dinoflagellates on grazing, behavior and survival of the brine shrimp *Artemia salina*.

- PLoS ONE 12(4) (2017) e0175168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175168>.
- Nishino, H.; Murakoshi, M.; Li, T.; Takemura, M.; Kuchide, M.; Kanazawa, M.; Mou, X.; Wada, S.; Masuda, M.; Ohsaka, Y.; et al. Carotenoids in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.* 2002, 21, 257–264.
- Nuño, K. Villarruel, A. Puebla-Pérez, A.M. Romero-Velarde, E. Puebla-Mora, A.G.. Ascencio, F. (2013). Effects of the marine microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata* in diabetic rats *Journal of Functional Foods* 5: 106–115.
- Paniagua-Michel J, Olmos-Soto J, Ruiz MA (2012) Pathways of carotenoid biosynthesis in bacteria and microalgae. In: Barredo J (ed) *Microbial carotenoids from bacteria and microalgae*. Springer, Berlin, pp 1–12.
- Pangestuti, R.; Kim, S.K. Neuroprotective effects of marine algae. *Mar. Drugs* 2011, 9, 803–818.
- Pasquet, V. P. Morisset, S. Ihammouine, A. Chepied, L. Aumailley, J. B. Berard, B. Serive, R. Kaas, I. Lanneluc, V. Thiery. (2011). Antiproliferative activity of violaxanthin isolated from bioguided fractionation of *dunaliella tertiolecta* extracts. *Mar. Drugs* 9:819–831.
- Park, S., Kim, KS., Kim, JS., et al.: Prognostic value of ABO blood types in young patients with breast cancer; A nationwide study in Korean Breast Cancer Society. *Med Oncol.* 346, 118(2017).
- Paterson AD, Lopes-Virella MF, Waggott D, Boright AP, Hosseini SM, et al. (2009) Genome-wide association identifies the ABO blood group as a major locus associated with serum levels of soluble E-selectin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1958-1967.
- Pearson, H.W., B. Mara, and C. R. Bartone, (1987). Guidelines for the minimum evaluation of the performance of full-scale waste stabilization ponds. *Water Research.* 21(9):1067-1075.
- Peerapornpisal, Y.; Amornlerdpison, D.; Jamjai, U.; Taesotikul, T.; Pongpaibul, Y.; Nualchareon, M.; Kanjanapothi, D. (2010).“Antioxidant and antiinflammatory activities of brown marine alga, *Padina minor* Yamada”. *Chiang Mai Journal of Science*, 37:507–516.
- Perumal R, Dey A, Manavalan R, Prakasam K, Jayachandra E, Sreenivasa G. (2008) Inhibition of albumin denaturation and anti-inflammatory activity of furfuryl

- substituted pyrimidinoimidazolinones. *Int J Chem Sci.* 6:2016–22.
- Plaza, M., M. Herrero, A. Cifuentes, and E. Ibañez. (2009). Innovative natural functional ingredients from Microalgae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 7159-7170.
- Plaza, M., A. Cifuentes, and E. Ibañez. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology* 19: 31-39.
- Polak-Berecka M, Waśko A, Kordowska-Wiater M, Targoński Z, Kubik-Komar A. (2011). Application of response surface methodology to enhancement of biomass production by *Lactobacillus rhamnosus* E/N. *Braz J Microbiol*, 42(4):1485–1494.
- Poliana O. Cavalcante Alencar , Glauber C. Lima , Francisco Clark N. Barros , Luís E.C. Costa, Carla Vivianne P.E. Ribeiro , Willer M. Sousa , Venícios G. Sombra, Clara Myrla W.S. Abreu , Ewerton S. Abreu , Edivânia O.B. Pontes , Ariclécio C. Oliveira , Regina C.M. de Paula , Ana Lúcia P. Freitas. (2019). A novel antioxidant sulfated polysaccharide from the algae *Gracilaria caudata*: In vitro and in vivo activities. *Foods Hydrocolloids* 90:28-34.
- Prabakaran, G; Meivelu Moovendhan; A. Arumugam; A. Matharasi; R. Dineshkumar; Pitchai Sampathkumar. (2018). Evaluation of Chemical Composition and In Vitro Antiinflammatory. Effect of Marine Microalgae *Chlorella vulgaris*. Springer Nature B.V.
- Pulz, O, and Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiological Biotechnology.* 65: 635-648.
- Oyedepo OO, Femurewas AJ. (1995). Anti-protease and membrane stabilizing activities of extracts of *Fagra zanthoxiloides*, *Olax subscorpioides* and *Tetrapleura tetraptera*. In *J of Pharmacong.* 33:65-69.
- Rajapakse, N.; Kim, M.M.; Mendis, E.; Kim, S.K. (2008). “Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells by carboxy butyrylated glucosamine takes place via down-regulation of mitogen-activated protein kinase-mediated nuclear factor-κB signaling”. *Immunology*, 123:348–357.
- Raja, R., S. Hemaiswarya, N. Ashok, S. Sridhar, R. Rengasamy. (2008). “A perspective on the biotechnological potential of microalgae”. *Critical Reviews in Microbiology* 34(2):77-88.

- Rao, A. R., H. N. Sindhuja, S. M. Dharmesh, K. U. Sankar, R. Sarada, and G. A. Ravishankar. (2013). Effective inhibition of skin cancer, tyrosinase and antioxidant properties by astaxanthin and astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 61, 3842–3851.
- 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*, vol. 26, no. 9-10, pp. 1231–1237.
- Reboloso Fuentes., M. M., A. Navarro Pérez, F. García Camacho, J. J. Ramos Miras, and J. L. Guile Gerrero. (2001). Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 49: 2966-2972.
- Richmond, A. (2004). Handbook of microalgal culture. Biotechnology and Applied *Phycology Blackwell Science*. 147-239.
- Roberts, G.C.; Jardetzky, O. (1970). Nuclear magnetic resonance spectroscopy of amino acids, peptides, and proteins. *Adv. Protein Chem.* 24, 447–545.
- Rodriguez-Jasso, R.M., Mussatto, S.I., Pastrana, L., Aguilar, C.N. y Teixeira, J.A. (2011). Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. *Carbohydrate Polymers* 86:1137-1144.
- Rohini D., S. Phandnis, S.K. Rawal, Synthesis and characterization of poly-hydroxybutyrate from *Bacillus thuringiensis* R1, *Indian J. Biotechnol.* 5 (2006) 276–283.
- Rubio, C. P., Hernández-Ruiz, J., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., & Ceron, J. J. (2016). Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 166.
- Ruiz, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Tesis M Sc. Valencia, España. Universidad Politécnica de Valencia. 102.
- Sakat S, Juvekar AR, Gambhire MN. (2010). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *International Journal of Pharma and Pharmacological Sciences*. 2(1):146-155.
- Salehi, P., Dashti, Y., Tajabadi, F. M., Safidkon, F. y Rabei, R. (2011). Structural and compositional characteristics of a sulfated galactan from the red alga *Gracilariopsis persica*. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1570–1574. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.017>.

- San Millan, C.S.; Soldevilla, B.; Martín, P.; Gil-Calderon, B.; Compte, M.; Perez-Sacristan, B.; Donoso, E.; Pena, C.; Romero, J.; Granado-Lorencio, F.; et al. (2015). β -Cryptoxanthin synergistically enhances the antitumoral activity of Oxaliplatin through Δ NP73 negative regulation in colon cancer. *Clin. Cancer Res.* 21, 4398–4409.
- Sánchez, Y.G., Rondón, L.A., Hermosilla, R.E. y Almeida, M.S. (2010). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas, tallos y flores de *Helychrysum bracteatum*. *Revista Química Viva.* 1: 40-45.
- Sathasivam, R. y Jang-Seu K. (2018). A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries. *Mar. Drugs.* 16: 26. doi:10.3390/md16010026.
- Saurabh, C.K., Gupta. S., Variyar, P.S., Sharma, A. 2016. Effect of addition of nanoclay, beeswax, tween-80 and glycerol on physicochemical properties of guar gum films. *Ind. Crops Prod.* 89, 109–118. doi:10.1016/j.indcrop.2016.05.003.
- Seyfabadi, J., Ramezanzpour, Z., Amini, K.Z.: Protein, fatty acid and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *J. Appl. Phycol.* 23, 721–726 (2011).
- Sies, H. (1993). “Strategies of antioxidant defense”. *European Journal of Biochemistry.* 215,213–219.
- Siransy, L.K., Nanga, Z.Y., Zaba, F.S., Tufa, N.Y., Dasse, S.R., 2015. ABO/Rh blood groups and risk of HIV infection and Hepatitis B among blood donors of Abidjan, Côte D’Ivoire. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 18, 205–209.
- Solymosi, K.; Keresztes, Á. (2012). “Plastid structure, diversification and interconversions II”. Land plants. *Curr. Chem. Biol.* 6, 187–204.
- Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Martins, J.T., Teixeira, J.A., Coimbra, M.A. & Vicente, A.A. (2012). Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocolloids* 27: 287-292.
- Sumner LW, Mendes P, Dixon RA. (2003). Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry.* 62:817–36.
- Sung Mi Cho, Sanghee Kim, Hojin Cho, Hyoungseok Lee, Jun Hyuck Lee, Horim Lee, Hyun Park, Seunghyun Kang, Han-Gu Choi, Jungeun Lee, Type II Ice-Binding Proteins Isolated from an Arctic Microalga Are Similar to Adhesin-Like Proteins and

Increase Freezing Tolerance in Transgenic Plants, *Plant and Cell Physiology*, Volume 60, Issue 12, December 2019, Pages 2744–2757, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz162>

Standnichuk IN and Tropin IV. (2017). Phycobiliproteins: Structure, functions and biotechnological applications. *Appl. Biotech. Microbiol.* 53(1): 1-10

Størseth TR, Hansen K, Skjermo J, Krane J. (2004) Characterization of a β -D-(1-3)-glucan from the marine diatom *Chaetoceros mülleri* by high-resolution magic-angle spinning NMR spectroscopy on whole algal cells. *Carbohydr Res.* 339:421–4.

Tabar zad, M. Atabaki, V. Hosseinabadi, T. (2020). Anti-inflammatory Activity of Bioactive Compounds from Microalgae and Cyanobacteria by Focusing on the Mechanisms of Action. *Molecular Biology Reports.* <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05562-9>.

Takaichi, S. (2011). “Carotenoids in algae: Distributions, biosynthesis and functions”. *Marin Drugs*, 9, 1101–1118.

Villa-Ruano, N., Velásquez-Valle, R., Zepeda-Vallejo, L. G., Pérez-Hernández, N., Velázquez-Ponce, M., Arcos-Adame, V. M., & Becerra-Martinez, E. (2018). 1H NMR- based metabolomic profiling for identification of metabolites in *Capsicum annum* cv. mirasol infected by beet mild curly top virus (BMCTV). *Food Research International*, 106:870–877.

Willows, R. D. Y. Li, H. Scheer and M. Chen. (2013). Structure of chlorophyll f. *Organic Letters.* 15 (7): 1588–1590.

Wu Hon Yip, Lim Seng Joe, Wan Aida Wan Mustapha, Mohamad Yusof Maskat & Mamot Said. (2014). Characterization and Stability of Pigments Extracted from *Sargassum binderi* Obtained from Semporna, Sabah. *Sains Malaysiana.* 43(9):1345–1354.

Xin, L., Hu, H.Y., Ke G., Sun, Y.X., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.* 101(14), 5494-5500. doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016.

Ylonen, K.; Alfthan, G.; Groop, L.; Saloranta, C.; Aro, A.; Virtanen, S.M. Dietary intakes and plasma concentrations of carotenoids and tocopherols in relation to glucose metabolism in subjects at high risk of type 2 diabetes: The Botnia dietary study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003, 77, 1434–1441.

- Young-Sang K., L. Xi-Feng, K. Kyong-Hwa, R. BoMi and K. Se-Kwon. (2014) Stigmasterol isolated from marine microalgae *Navicula incerta* induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *BMB Rep.*; 47(8):433-438.
- Yuan YV, N. D. Westcott, C. Hu, and D. D. Kitts. (2009). Mycosporine-like amino acid composition of the edible red alga, *Palmaria palmata* (dulse) harvested from the west and east coasts of Grand Manan Island, New Brunswick. *Food Chemistry*. 112: 321–328.