

*FACULTAD DE CIENCIAS  
NATURALES Y EXACTAS*

**Evaluación antimicrobiana de la biomasa  
de la microalga *Phorphyridium cruentum***

***Tesis presentada en opción al Título  
Académico de Máster en***

***BIOTECNOLOGÍA***

***Autor: Ing. Dagmara Ferrer Salas***

***Tutor (es): MSc. George Duharte***

***Dr C. Gabriel Llauradó***

**2022**

---





**PENSAMIENTO**

*“ Si al franquear una montaña en la dirección de una estrella, el viajero se deja absorber demasiado por los problemas de la escalada, se arriesga a olvidar cuál es la estrella que lo guía ”*

ANTOINE DE SAINT -EXUPERY



**DEDICATORIA**

*A mi Dios por permitir este momento,  
A mis hermosas niñas,  
A mi viejita maravillosa, gracias Dios por ella  
Las AMO*



**AGRADECIMIENTOS**

## *AGRADECIMIENTOS*

*A Dios por estar siempre conmigo*

*A mis hermosas niñas Ana Paula y Annabel*

*Mi mami, por ser la luz de mi vida, mi motivo de inspiración,  
por brindarme todo el apoyo del mundo a lo largo de mi vida,  
gracias a ti soy lo que ves ahora no dejes de existir nunca para  
mí,*

*A mi padre que ya no está entre nosotros,*

*A mis hermanos y demás familiares,*

*A mi gran amiga Yamila Lebeque Pérez, gracias por todo, te  
quiero mucho*

*A José Carlos Rodríguez Tito por su comprensión y dedicación,  
por implicarse en mi formación, por ser el mejor amigo que  
pueda tener,*

*A Dayana, Neyda, trabajadores de Toximed en general*

*A mi amiga Grisel, gracias por tus constantes preocupaciones y  
tus consejos*

*A mis amigos del CEBI especialmente a Yaneisis, Miladis, y  
trabajadores,*

*A los trabajadores del LABEX,*

*A mis compañeros de trabajo por sus preocupaciones y apoyo  
especialmente a Taimi,*

*A mis tutores especialmente a Gabriel Llauradó, gracias por toda  
la ayuda, la confianza, la amistad en fin por confiar en mí,*



**INDICE**

# INDICE

RESUMEN.....	
ABSTRACT .....	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 Antimicrobianos.....	4
2.1.1 Antibióticos.....	5
2.1.2 Resistencia Antimicrobiana.....	5
2.1.3 Medio marino como fuente de actividad biológica.....	6
2.2 Microalgas. Características Generales .....	6
2.2.1 Composición.....	8
2.2.2 Aplicaciones .....	8
2.2.3 Requerimientos Nutricionales .....	10
2.3 Microalgas Rojas.....	11
2.3.1 Ficobiliproteínas .....	11
2.3.2 Biomasa.....	13
2.4 <i>Porphyridium cruentum</i> .....	15
2.4.1 Cultivo de <i>Porphyridium cruentum</i> .....	16
2.4.2 Medios de cultivo para <i>Porphyridium cruentum</i> .....	16
2.4.3 Inóculo.....	17
2.4.4 Biorreactores. Características.....	17
2.5 Ensayos de actividad antimicrobiana.....	18
2.5.1 Actividad antimicrobiana de las microalgas. ....	19
2.5.2 Actividad antimicrobiana de <i>Porphyridium cruentum</i> .....	20
2.5.3 Actividad antiparasitaria .....	20
2.5.4 Actividad citotóxica de <i>Porphyridium cruentum</i> .....	21
2.5.5 Determinación de toxicidad de biomasa con <i>Artemia Salina</i> . ....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1 Microalga.....	22
3.2 Condiciones de cultivo de <i>Porphyridium cruentum</i> .....	22
3.3 Recolección de Biomasa .....	24
3.4 Caracterización taxonómica y química de la biomasa de <i>P. cruentum</i> .....	24

3.5	<i>Obtención del extracto acuoso de la Biomasa</i> .....	24
3.6	<i>Microorganismos patógenos de prueba</i> .....	24
3.7	<i>Evaluación de la actividad antimicrobiana de la microalga</i> .....	25
3.7.1	<i>Leishmania infantum</i> .....	25
3.7.2	<i>Trypanosoma brucei</i> y <i>Trypanosoma rhodesiense</i> .....	25
3.7.3	<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	26
3.8	<i>Ensayo de citotoxicidad in vitro</i> .....	26
3.8.1	<i>Índice de selectividad</i> .....	26
3.9	<i>Ensayo de toxicidad con Artemia salina</i> .....	27
3.9.1	<i>Obtención de las larvas</i> .....	27
3.9.2	<i>Ensayo de letalidad</i> .....	27
4	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	28
4.1	<i>Cultivo de Porphyridium cruentum</i> .....	28
4.2	<i>Caracterización de Porphyridium cruentum</i> .....	29
4.2.1	<i>Taxonómica</i> .....	29
4.2.2	<i>Química</i> .....	30
4.3	<i>Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro</i> .....	30
4.3.1	<i>Obtención del extracto</i> .....	31
4.3.2	<i>Actividad antiparasitaria</i> .....	31
4.3.3	<i>Efecto sobre la viabilidad celular</i> .....	32
4.3.4	<i>Ensayo de toxicidad con Artemia Salina de la biomasa de Porphyridium cruentum</i> .....	33
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	35
	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	36
	<b>ABREVIATURAS</b> .....	37
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	38
	<b>ANEXOS</b> .....	39



**RESUMEN**

## RESUMEN

La resistencia antimicrobiana ha sido observada a nivel mundial en varios microorganismos patógenos, debido a ello, la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana contra cepas patógenas para el ser humano se ha convertido en algo cada vez más importante. Los microorganismos marinos, en particular, las microalgas, producen diversos tipos de metabolitos secundarios con actividad antiviral y anticancerígena, así como compuestos con actividad antibacteriana y antimicótica. Por lo anterior, este trabajo estuvo enfocado en la bioprospección de la actividad antimicrobiana y el efecto citotóxico de un extracto de la microalga *P. cruentum*. A partir de muestras de biomasa recuperadas en la fase estacionaria de crecimiento, se obtuvo un extracto acuoso donde se utilizó agua bidestilada como disolvente. La actividad antimicrobiana del extracto acuoso fue evaluada contra *Candida albicans*, *Leishmania infantum*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, por el método de microdilución con resazurina en microplacas estériles de 96 pocillos utilizando 5 concentraciones a partir de 1000 µg/ml del extracto acuoso. Los resultados mostraron un efecto antimicrobiano en *T. rhodesiense*, *T. cruzi*, *T. brucei*, mostrando una débil actividad frente a *Candida albicans*. El estudio demostró, además, que la biomasa de la microalga no ejerce actividad citotóxica sobre monocitos humanos THP-1 y macrófagos murinos RAW 264.7. La biomasa resultó ser moderadamente tóxica a las concentraciones de 100 y 1000 µg/ml en *Artemia Salina*.

**Palabras clave:** Biomasa de *Phorphyridium purpureum*, actividad antimicrobiana, líneas tumorales, *Artemia salina*

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance has been observed worldwide in several pathogenic microorganisms, due to this, the search for new compounds with antimicrobial activity against pathogenic strains for humans has become increasingly important. Marine microorganisms, in particular microalgae, produce various types of secondary metabolites with antiviral and anticancer activity, as well as compounds with antibacterial and antifungal activity. Therefore, this work was focused on the bioprospecting of the antimicrobial activity and the cytotoxic effect of an extract of the microalgae *P. cruentum*. From biomass samples recovered in the stationary phase of growth, an aqueous extract was obtained using bidistilled water as solvent. The antimicrobial activity of the aqueous extract was evaluated against *Candida albicans*, *Leishmania infantum*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, by the resazurin microdilution method in sterile 96-well microplates using 5 concentrations starting at 1000 µg/ml of the aqueous extract. . The results showed an antimicrobial effect on *T. rhodesiense*, *T. cruzi*, *T. brucei*, showing weak activity against *Candida albicans*. The study also demonstrated that the biomass of the microalgae does not exert cytotoxic activity on THP-1 human monocytes and RAW 264.7 murine macrophages. The biomass turned out to be moderately toxic at concentrations of 100 and 1000 µg/ml in Artemia Salina.

**Keywords:** *Phorphyridium purpureum* biomass, antimicrobial activity, tumor lines, Artemia salina



## INTRODUCCIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son medicamentos de origen natural, artificial o semisintético, que se emplean en la medicina tradicional para combatir microorganismos debido a que interrumpen o alteran procesos metabólicos, permitiendo combatir un sinnúmero de enfermedades producidas por infecciones bacterianas (Olmedo, 2019). Durante las últimas décadas la efectividad de los antibióticos ha disminuido notablemente debido a la resistencia que experimentan muchos microorganismos, la cual es un problema evolutivo que ocurre naturalmente y, que se ha acelerado por el uso indebido de los antibióticos en humanos, provocando un incremento en la tasa de mortalidad por esta causa (Olmedo, 2019) (Khan *et al.*, 2018). La ausencia de medicamentos efectivos para combatir estos microorganismos que han adquirido resistencias a los antimicrobianos tiene consecuencias directas como: el incremento de costos en el tratamiento de patologías, disminución de la efectividad del tratamiento terapéutico con antibióticos y el riesgo de contraer infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS).

Según (Dhanya- swati, 2016), debido a esta escasez de antibióticos eficaces, la bioprospección ha tomado fuerza investigativa en la última década, en la cual las microalgas han tomado cierto protagonismo debido a las propiedades antibacteriales que han mostrado sus metabolitos.

Las microalgas son organismos distribuidos en todo el planeta, con cientos de miles de especies. Sus componentes con potenciales propiedades benéficas en la nutrición y la salud han despertado el interés científico, industrial y comercial (Falaise *et al.*, 2016). Actualmente se han investigado varias especies de microalgas por su utilidad como productos de valor añadido con notables cualidades farmacológicas y biológicas (Hamidi *et al.*, 2019). Suponen uno de los grupos con mayor proyección en la industria farmacéutica, cosmética y/o biotecnológica; donde se han aislado, en los últimos años, compuestos con importantes propiedades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas y antivirales (Hussein *et al.*, 2020), (Sathasivam *et al.*, 2019), (Verdugo-González *et al.*, 2019), (Cano- Europa *et al.*, 2012). Sin embargo a pesar de los usos potenciales que presentan, ha sido poca la explotación que se ha dado a estos recursos.

En su composición química se encuentran pigmentos fotosintéticos que utilizan la luz solar para producir alimento y oxígeno, a partir del dióxido de carbono y agua. Además, numerosos estudios han mostrado que las microalgas representan una fuente atractiva de ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides, ficobilinas, péptidos, polisacáridos y son una buena fuente de vitaminas A, B1, B2 y B12. En la actualidad se comercializan varios productos en forma de tabletas, polvo, solución o en mezclas con snacks, galletas, fideos, bebidas, caramelos, gomas, vinos y cereales (Guevara *et al.*, 2016).

Existe una variedad de cepas de microalgas que han recibido un especial interés, por sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas, y antimicrobianas (Venkatesan *et al.*, 2007) Entre ellas se encuentran las cianobacterias (*Spirulina maxima*, *Pseudanabaena tenuis*), algunos géneros de microalgas (*Chlorella*, *Dunaliella*, *Hematococcus*), sólo unas pocas como *Spirulina*, *Porphyra*, *Porphyridium* sp., están bien caracterizadas,

(Cano- Europa *et al.*, 2012). Por su alto contenido antioxidante, debido a su condición de acumular carotenoides como  $\beta$ -caroteno, luteína y zeaxantina (Abed *et al.*, 2009)

Algunas diatomeas como *Asterionella* sp., *Rhizosolenia alata* muestran actividad antibacteriana contra bacterias patógenas para el hombre como *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras (Venkatesan *et al.*, 2007). La microalga *Porphyridium* sp. inhibe el crecimiento de diferentes cepas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras y hongos (Abed *et al.*, 2009). La capacidad antimicrobiana de las microalgas es una característica que se encuentra bajo estudio actualmente, gracias a su alto contenido de compuestos con propiedades bioactivas, como son los péptidos antimicrobianos (González- Mendoza *et al.*, 2019) La cantidad de especies caracterizadas para su potencial aplicación continúa siendo pequeña en relación con las existentes y las investigaciones acerca de sus componentes, cómo aislarlos, incrementar su rendimiento, determinar su bioactividad, sus beneficios o su toxicidad e incluso el desarrollo de productos que sean organolépticamente aceptables son todavía escasas (Olmedo, 2019). El mecanismo de acción de los antibióticos convencionales sumado al uso excesivo e inadecuado de estos compuestos ha llevado al aumento de microorganismos resistentes y multirresistentes, dificultando el tratamiento y control de enfermedades infecciosas (Erbil *et al.*, 2022) Por ello, una solución prometedora a este problema es encontrar compuestos con diferentes mecanismos de acción.

*Porphyridium purpureum* es una microalga roja que pertenece a las Rodofitas. Tiene la capacidad de acumular valiosas biomoléculas de pigmentos como la ficoeritrina y otros carotenoides). Sus células son esféricas de 4 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro, no presenta flagelos, tiene un sólo cloroplasto central y tiene pirenoides, no muestra una pared real, en su lugar está rodeada por una membrana compuesta de polisacáridos sulfatados (Benavides *et al.*, 2006). En la obtención de polisacáridos de naturaleza sulfatada (que por su viscosidad tiene potencial en la industria alimentaria y farmacéutica), en la producción de pigmentos como la ficoeritrina (utilizado como marcador en inmunoensayos) y para la obtención de enzimas de aplicación terapéutica como la superóxido dismutasa, ayudando en el tratamiento de células cancerosas, por lo que tienen un alto valor terapéutico como inmunomodulador. Recientemente se ha incrementado el interés por su habilidad de revertir el fenotipo de multirresistencia a fármacos de varios tipos de células tumorales (Pulz y Gross, 2004). Esta microalga ha demostrado tener múltiples aplicaciones en la industria biotecnológica, tal como la producción de ácido araquidónico, pigmentos (ficocianina, ficoeritrina) y polisacáridos extracelulares (Abdala-Díaz *et al.*, 2010). Los polisacáridos de la pared celular de *P. cruentum* constituyen hasta el 50-70 % de la materia seca del alga; estos por ejemplo, inhiben la replicación viral y son un potente agente hipocolesterómico en estudios realizados en ratas y aves. Además, estos polisacáridos promueven la actividad antioxidante, lo que sugiere un mecanismo de protección celular contra especies reactivas de oxígeno (Niizawa, 2015).

Como ya se mencionó anteriormente el uso de antibióticos, que en ocasiones se utiliza de una manera inadecuada, creando resistencia en los patógenos y afectando a la salud humana, ha provocado la búsqueda detallada de nuevos compuestos naturales. Por lo tanto, el propósito de este trabajo es explorar la posible actividad antimicrobiana de las microalgas ya que éstas tienen la capacidad de biosintetizar, metabolizar, acumular y secretar una gran diversidad de metabolitos secundarios que poseen potentes actividades biológicas de interés biomédico que ayuden a combatir diversas enfermedades bacterianas que enfrenta actualmente la humanidad.

**Problema científico:** Es necesario la evaluación del extracto acuoso obtenido a partir de la biomasa de *Porphyridium cruentum* para la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana, así como la evaluación de su citotoxicidad empleando como modelo de estudio líneas celulares

### **Hipótesis de trabajo**

La biomasa de *Porphyridium cruentum* posee actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos para el ser humano, así como también actividad citotóxica sobre líneas celulares conocidas.

### **Objetivo General**

Evaluar la actividad antimicrobiana y actividad citotóxica de extractos acuosos de la microalga *Porphyridium cruentum*.

### **Objetivos Específicos:**

1. Evaluar actividad antimicrobiana del extracto de la biomasa de la microalga *Porphyridium cruentum*
2. Evaluar la citotoxicidad del extracto de la microalga *Porphyridium cruentum* frente a las líneas celulares monocitos humanos THP-1 y macrófagos murinos RAW 264.7.
3. Evaluar la toxicidad del extracto de la microalga *Porphyridium cruentum* mediante bioensayos con *Artemia salina*.



*REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*

## 2.1 Antimicrobianos

Se considera que la historia de los antimicrobianos comienza en 1928, cuando Alexander Fleming, observó que un hongo que contaminaba una de sus placas de cultivo inhibía el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Fleming consiguió aislar una sustancia de acción antiséptica selectiva producida por este hongo, a la que denominó penicilina ya que la producía un hongo del género *Penicillium*. El descubrimiento de la penicilina y su posterior introducción en la clínica supuso una verdadera revolución en el tratamiento de la patología infecciosa. Desde entonces, se han incorporado a la práctica decenas de familias de antimicrobianos, con actividad frente a bacterias, hongos, parásitos y virus.

Sin embargo, no fue sino hasta la Segunda Guerra Mundial que Florey y colaboradores en 1942, consiguieron aplicar esta terapia a las enfermedades infecciosas y producir este compuesto industrialmente. En 1944, Waksman y colaboradores, lograron extraer otro antibiótico de gran importancia, la estreptomina del actinomicete *Streptomyces griseus*. Desde entonces la estreptomina se ha sintetizado artificialmente.

Los antibióticos (Martínez- Guillén, 2012) actúan de dos formas: inhibiendo el crecimiento de las bacterias (acción bacteriostática) o destruyéndolas (acción bactericida). En algunos casos inhiben las enzimas que originan la formación de la membrana celular de las bacterias; en otros casos interfieren en las reacciones enzimáticas del metabolismo intermedio o impiden por el mismo mecanismo la síntesis de proteínas. La aplicación farmacológica de los antibióticos tiene que responder a dos factores: inhibir in vivo la proliferación de gérmenes y no ser perjudicial para el organismo

Estos fármacos se dividen en antibacterianos, antivirales, antimicóticos, antimicobacterianos, antiparasitarios y antirretrovirales. Cada grupo de antibióticos actúa preferentemente de una forma u otra, aunque un mismo antibiótico puede comportarse como bactericida o bacteriostático, dependiendo de la concentración que alcance en la diana, o de su afinidad por la diana de un determinado microorganismo. En general, son bactericidas los antimicrobianos que matan a los microorganismos sin necesidad de destruirlos o lizarlos, alterando la membrana citoplásmica o interfiriendo con algunos aspectos del metabolismo del ADN, y bacteriostáticos los que inhiben la síntesis proteica, actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular es decir inhabilitan el crecimiento del microorganismo excepto los aminoglucósidos; y están los bacteriolíticos, los cuales destruyen a los microorganismos por lisis.

Las enfermedades infecciosas constituyen un problema de salud importante, tanto por su frecuencia de aparición como por su posible gravedad en las complicaciones locales o sistémicas que pudieran presentarse. La aparición (Fernández *et al.*, 2021) de los antibióticos en el siglo pasado, no solamente contribuyó a disminuir las tasas de morbilidad y mortalidad prohibitivamente altas que existían, sino que también cimentó

las bases del progreso de procedimientos complejos y altamente riesgosos, tales como la profilaxis quirúrgica, quimioterapias, trasplantes de órganos y de células hematopoyéticas. Sería inconcebible la vida tal cual la conocemos actualmente sin la presencia de los antimicrobianos.

### 2.1.1 Antibióticos

---

Sustancia producida por el metabolismo de organismos vivos, principalmente hongos y bacterias, que posee la propiedad de inhibir el crecimiento o destruir microorganismos.

Según su origen, los antibióticos pueden ser:

- Biológicos (naturales): sintetizados por organismos vivos, ej. Penicilina, Cloranfenicol
- Semisintéticos: obtenidos por modificación química de antibióticos naturales, ej. Ampicilina.
- Sintéticos: generados mediante síntesis química, ej. Sulfas.

### 2.1.2 Resistencia Antimicrobiana

---

La resistencia actual de los gérmenes a los antimicrobianos constituye un serio problema de salud, en todo el mundo y un reto para el futuro. Es el término más amplio para la resistencia de diferentes tipos de microorganismos y abarca la resistencia a los medicamentos antibacterianos, antivirales, antiparasitarios y antimicóticos y es la capacidad que tienen algunos microorganismos (como virus, bacterias, hongos y parásitos) de sufrir cambios para que los medicamentos con que se los trata no tengan efecto sobre ellos (Cutié- Aragón *et al.*, 2022).

La resistencia antimicrobiana (RAM) pone en peligro la eficacia de la prevención y el tratamiento de una gran cantidad de infecciones. Además, puede comprometer el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer, las cirugías con prótesis o los trasplantes de órganos, entre otras. En las últimas décadas la RAM ha sido observada a nivel mundial en varios microorganismos patógenos, incluidos recientemente algunos que son sensibles a los antibióticos (Martínez Guillén, 2012). Asimismo se han reportado brotes de otras especies oportunistas que también pueden ser patógenas, las cuales una vez que ha pasado el efecto del químico utilizado como antibiótico encuentran las condiciones idóneas para su proliferación.

La resistencia de los microorganismos a los antibióticos comúnmente utilizados ha hecho aumentar la morbilidad y mortalidad en la población humana y ha fomentado la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana. A consecuencia de la excesiva demanda frente a la protección microbiana, ha producido un aumento en el interés por fármacos terapéuticos a partir de productos naturales, con especial interés por los productos obtenidos del mar (Murray *et al.*, 2013).

Muchas investigaciones (Díaz- Pérez *et al.*, 2021) se han realizado, desde los últimos 30 años del siglo pasado hasta la actualidad, para conocer los mecanismos y causas que hacen posible esta resistencia y la creación de nuevos productos farmacéuticos (sintéticos y naturales) para hacerle frente. Pero el uso indiscriminado e irracional de estos fármacos por el hombre constituye la principal causa de la gravedad de la situación que hoy se presenta, por lo que la búsqueda de nuevos principios activos antimicrobianos constituye una prioridad de la investigación a nivel mundial.

La farmacorresistencia antimicrobiana constituye hoy un desafío a enfrentar por los sistemas de salud a nivel internacional, debido a que el uso y abuso de los antibióticos ha generado varios mecanismos de resistencia por parte de los microorganismos patógenos y no patógenos (López Gamboa *et al.*, 2022), siendo necesaria la búsqueda de nuevos productos para combatir esta resistencia.

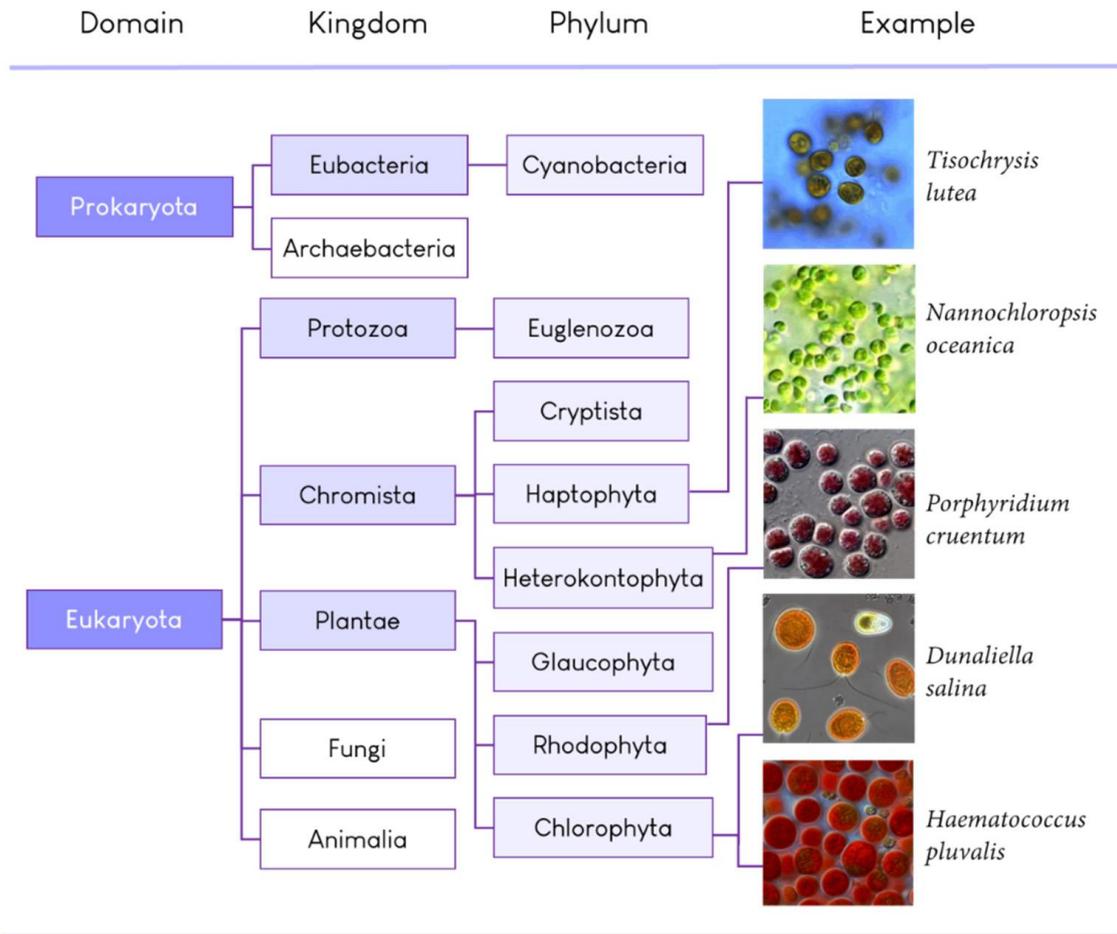
### 2.1.3 Medio marino como fuente de actividad biológica

El medio marino tiene gran diversidad biológica y debido a los mecanismos de adaptación y supervivencia de los organismos, generalmente se encuentra asociado a una gran variedad de sustancias químicas. Esta diversidad ha sido la fuente de compuestos químicos novedosos con potencial uso para el desarrollo industrial de productos farmacéuticos, cosméticos, suplementos nutricionales, sondas moleculares, enzimas, productos de química fina y agroquímicos (Murray *et al.*, 2013). Durante las últimas cuatro décadas numerosos compuestos novedales han sido aislados de organismos marinos y se ha demostrado que muchos de estos compuestos poseen actividad biológica como: actividad anticancerígena y citotóxica, antibacterial, antifúngica, inmunosupresora, algicida, antiinflamatoria y antioxidante, entre otras (El Gamal, 2010). Las tendencias recientes en la investigación de fármacos se centran en bioproductos a partir de fuentes naturales, (Mayer *et al.*, 2007).

Las algas marinas son un grupo amplio y heterogéneo de organismos vegetales, desde especies unicelulares hasta grandes plantas (Rozema *et al.*, 2002). Su distribución, el asentamiento, crecimiento y propagación dependen directamente de las corrientes oceanográficas, al igual que su estructura fisiológica, pero son un recurso abundante y muy económico. Se conocen bien las diferentes aplicaciones de las microalgas marinas en nutrición, uso en biofertilizantes, el tratamiento de aguas e incluso en la salud humana como antiinflamatorios, antialérgicos y analgésicos. Además, existen trabajos en algas unicelulares que ponen de manifiesto su aplicabilidad como agentes, alimentos funcionales, antitumorales (Fernández *et al.*, 2019)

### 2.2 Microalgas. Características Generales

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariotas (cianobacterias) y eucariotas que utilizan la luz como fuente de energía para fijar el dióxido de carbono; contienen clorofila y pigmentos carotenoides siendo una parte importante en la producción primaria de la cadena alimenticia acuática, estos pueden crecer rápidamente debido a su estructura simple (Medina *et al.*, 2017). El término microalgas hace referencia a las algas que son tan pequeñas que no pueden ser observadas a simple vista. Dentro de algunos grupos taxonómicos se incluyen: Rhodophyta (algas rojas), Chlorophyta (algas verdes), Bacillariophyta (diatomeas) y Chrysophyta (algas doradas) Comprende alrededor de 800.000 especies de las cuales solo alrededor de 50.000 han sido descritas (Mobin *et al.*, 2019).



**Fig. 1** Distribución de los distintos Filos y algunos ejemplos de microalgas según el esquema de clasificación de siete reinos. (Modificado y Tomado de (Levasseur et al., 2020).

Su tamaño varía del micrón a la centena de micrones, se encuentran en abundancia en los medios acuáticos (océanos, ríos, lagos), crecen también en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes.



**Fig. 2** Microalgas

Según (Mathimani *et al.*, 2015 y Fan *et al.*, 2020) las microalgas, dependiendo de la especie y condiciones de cultivo, tienen una rápida producción de biomasa comparada con otros cultivos; son fuentes renovables, sostenibles y económicas de biocombustibles, productos medicinales bioactivos e ingredientes alimentarios. Se han investigado varias especies de microalgas por su potencial como productos de valor añadido con notables cualidades farmacológicas y biológicas (Khan *et al.*, 2018). Las microalgas presentan una gran plasticidad ecológica, y son capaces de sintetizar una amplia gama de compuestos bioactivos de interés para la industria biotecnológica (Das *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2018; Perin *et al.*, 2019).

### 2.2.1 Composición

Las microalgas poseen estructuras sencillas, su composición consiste básicamente en carbohidratos, proteínas y lípidos, aunque también son fuente de vitaminas como la A, B1, B2, B6, C, y E. Tienen un alto contenido en proteínas, sobre todo aquellas usadas como fuente de nutrientes. En cuanto a los carbohidratos, éstos se encuentran principalmente como almidón, glucosa y otros polisacáridos de alta digestibilidad.

El contenido de lípidos para uso en alimentos varía entre 1 y 35%, mientras que el porcentaje para ser usados como biocombustibles está entre el 20 y 80%, comparado con el 15% al 30% que se utiliza de los aceites vegetales. En cualquier caso, factores ambientales, el tipo de cosecha y el método de secado de las células determinan la cantidad de sustancias potencialmente útiles en las microalgas (Satyanarayana, 2011). La productividad y la composición bioquímica de las microalgas dependen en gran medida del modo de cultivo, la composición del medio y el perfil de nutrientes que permiten incrementar o inhibir el crecimiento mediante la optimización de factores como el control de la concentración de nitrógeno, intensidad luminosa, temperatura, salinidad, concentración de CO<sub>2</sub> y el método de cosecha (Brennan *et al.*, 2010). Estos microorganismos poseen la ventaja extra de poseer un metabolismo flexible, aunque este hecho puede conllevar la dificultad de optimización de los procesos de producción de compuestos bioactivos, ya que su estado fisiológico será decisivo para incrementar o disminuir el rendimiento final (ejemplo estresado vs. no estresados). Por lo tanto, su metabolismo secundario puede ser fácilmente modulable por factores de estrés aplicados externamente, por ejemplo con la deficiencia de la fuente de nitrógeno (Guedes *et al.*, 2011).

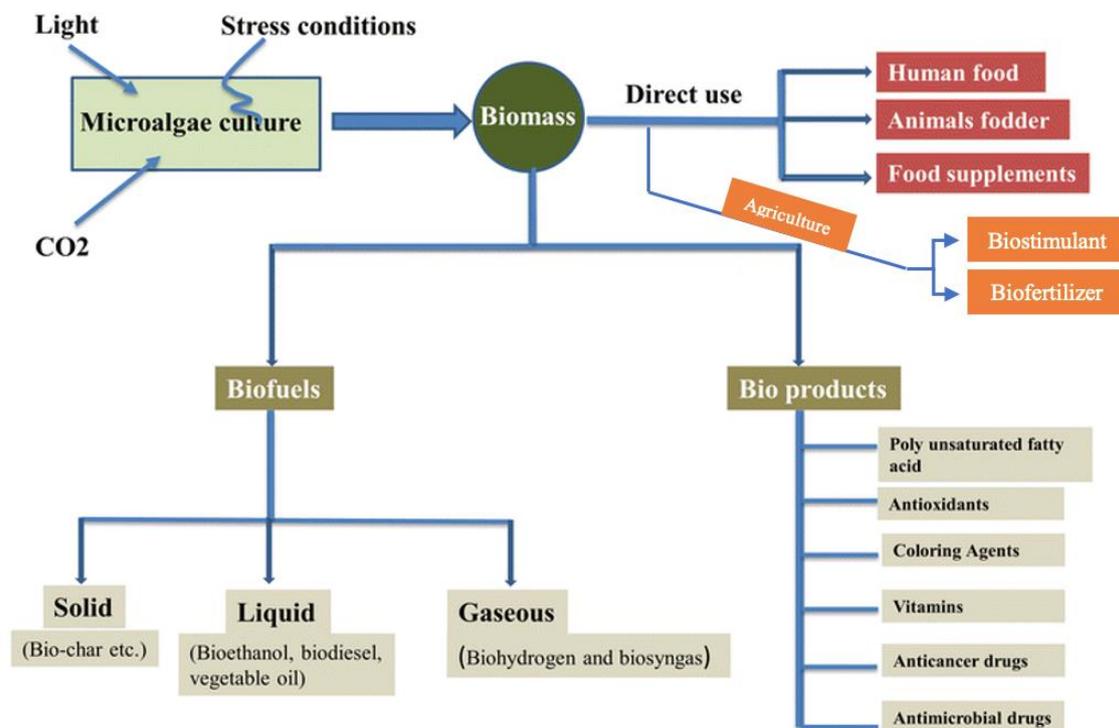
### 2.2.2 Aplicaciones

La biotecnología de las microalgas ha sido desarrollada para diferentes aplicaciones comerciales en sectores tan diversos como el alimentario, energético, farmacéutico, sanitario y medioambiental (Harun *et al.*, 2010). Como organismos fotosintéticos que son, contienen clorofila que puede ser usada para alimentos y cosméticos. Se han utilizado como fuente de alimento para humanos o suplementos nutricionales durante cientos de años. Los aztecas utilizaron la cianobacteria *Spirulina* (*Arthrospira platensis*, *Arthrospira maxima*) del lago Texcoco (México) alrededor del año 1300 d.C. Según (Basheer *et al.*, 2020) los cronistas españoles describieron a los pescadores locales recolectando masas azul verdosas de los lagos que se preparaban como una torta seca, conocida como 'te-cuitlatl'. Estudios han mostrado que las microalgas pueden representar una fuente atractiva de compuestos con actividad biológica como, por ejemplo, ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides, ficobilinas, péptidos y polisacáridos; también son una buena fuente de vitaminas A, B1, B2 y B12. Actualmente se comercializan varios productos en forma de tabletas, polvo, solución o

en mezclas con snacks, galletas, fideos, bebidas, caramelos, gomas, vinos y cereales (Sathasivam *et al.*, 2019).

Se describe que el uso de algas (González Salas, 2021) en la formulación de alimentos se está posicionando firmemente en el mercado alimentario. Anteriormente, los ingredientes de las algas se usaban principalmente como suplementos dietéticos en diferentes formas, como polvo, cápsulas y tabletas debido a su rica composición en compuestos beneficiosos para la salud. El número de lanzamientos de alimentos y bebidas que contienen microalgas o macroalgas ha aumentado significativamente durante los últimos años.

Además estos organismos son considerados de gran importancia industrial, ya que tienen la capacidad de producir metabolitos como proteínas, lípidos y azúcares complejos, donde a partir de estos productos se pueden generar bioquímicos, biocomustibles y aceites entre otros compuestos de alto valor en la biorrefinería (Bhattacharya & Goswami Saswata, 2020).



**Fig. 3** Distintos usos y aprovechamientos de las microalgas en la actualidad. (Modificada de Khan *et al.*, 2018.)

Por otra parte, (Dineshbabu *et al.*, 2019) señala que entre los metabolitos más importantes para la industria y la sociedad, se encuentran las proteínas de las microalgas; éstas contienen casi todos los aminoácidos esenciales para los seres humanos, además, tienen una alta tasa de digestión de 87.45% a 97.81% y, al constituir casi la mitad de la biomasa de las microalgas, podrían generar beneficios para el ser humano. Asimismo, los carbohidratos constituyen el 10% al 15% de la biomasa de las microalgas y se encuentran en forma de almidón, celulosa, azúcares y otros polisacáridos con aplicaciones industriales, por ejemplo, el beta-glucano, un

polisacárido abundante en *Chlorella* sp con propiedades antivirales y antibacteriales en seres humanos.

En el caso de la Biotecnología médica y farmacéutica están desempeñando un papel fundamental, utilizándose para la síntesis de factores de crecimiento, hormonas, anticuerpos, vacunas y reguladores inmunitarios (Rizwan *et al.*, 2018). Así mismo, se ha demostrado que algunos colorantes naturales, entre ellos los carotenoides y las ficobiliproteínas, presentan efectos preventivos para algunas enfermedades como: diabetes, obesidad y enfermedades cardiovasculares (De Mejia *et al.*, 2020). Gran parte de la investigación biotecnológica de las microalgas se centra en la búsqueda de nuevos compuestos para el bienestar humano. La química de los productos naturales es uno de los campos de más rápido desarrollo en biotecnología, y el descubrimiento de nuevos compuestos de microalgas. Muchas revisiones recientes han puesto de manifiesto la riqueza de compuestos que tienen aplicaciones potenciales para la salud (Jahan *et al.*, 2017), o a su vez esbozaron los muchos productos químicos que tienen aplicaciones tanto para la alimentación como para la salud, tales como aquellos compuestos con altas actividades antioxidantes. Las áreas de aplicaciones biomédicas incluyen la búsqueda de antioxidantes, anticancerígenos, antimicrobianos, antivirales, compuestos para combatir la obesidad, etc. (Suleria *et al.*, 2016).

### 2.2.3 Requerimientos Nutricionales

La disponibilidad de nutrientes y la fuente de energía son elementos clave para la biosíntesis de los componentes celulares en el crecimiento, reproducción y mantenimiento de la vida de las microalgas, al ser organismos fotoautótrofos necesitan, para transformar la energía solar en energía química, luz, CO<sub>2</sub> nutrientes y agua.

Se plantea que la luz tiene uno de los efectos más importantes en la producción de pigmentos en microalgas ya que estos son principalmente utilizados como captadores de energía para llevar a cabo la fotosíntesis. Por lo que cambios en la intensidad de luz, longitud de onda y tiempo de exposición generan cambios en la acumulación de los pigmentos. Los tiempos cortos de exposición a la luz o intensidad de la luz conllevan a una baja captura de energía, por lo que las células incrementan el número de pigmentos antena y así la captación de la energía que llega a los fotosistemas (Begum *et al.*, 2016).

Es por esto que la clorofila y las ficobiliproteínas son los pigmentos mayormente influenciados por la baja exposición a la luz. En contraparte, los carotenoides, además de ser complejos antena, son principalmente sintetizados en respuesta a la presencia de especies reactivas de oxígeno o bien en respuesta a sobreexcitación de la clorofila. Se ha demostrado que se puede lograr una mayor producción de biomasa controlando la intensidad de la luz, utilizando luz artificial como los diodos emisores de luz (LED), lámparas incandescentes o tubos fluorescentes. En la actualidad, gran parte de estudios en el crecimiento de las microalgas ha sido mediante el uso de LED, ya que son de tamaño pequeño, tienen una baja disipación de energía en forma de calor, un tiempo de vida media elevada, alta eficiencia de conversión fotoeléctrica y un reducido consumo de energía. Esta es empleada normalmente por la microalga para fijar el carbón a través de la fotosíntesis. La cantidad y calidad de luz afecta a los ratios de crecimiento de biomasa así como su composición (Khajepour *et al.*, 2015).

Por otra parte pueden obtener la luz del sol por lo que su utilización está limitada por el ciclo de luz natural y la variación estacional y restringida su viabilidad comercial a áreas con alta radiación solar. El crecimiento de la biomasa aumenta cuando la intensidad

lumínica aumenta hasta un máximo (las intensidades típicas de saturación están alrededor de 200-400  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) (González-Fernández y Muñoz, 2017), y superando este máximo podría llegar a inhibir el proceso de fotosíntesis. Se puede decir como norma general, que un incremento en la intensidad lumínica lleva a un incremento en el contenido de carbohidratos, diferente según la especie, por ejemplo, *Porphyridium* y *Arthrospira* mostraron un crecimiento en el contenido de carbohidratos de 300% y 34% respectivamente cuando se incrementó la intensidad lumínica. Aunque esto conlleva un mayor consumo energético y mayores emisiones de  $\text{CO}_2$ ; este lo pueden fijar de la atmósfera, de emisiones de gases industriales y de los carbonatos solubles, siendo lo más común la alimentación externa, bien por las emisiones industriales o por carbonatos solubles.

En cuanto a la salinidad podemos decir que si esta es elevada, el microalga normalmente responde acumulando carbohidratos intracelulares de bajo peso molecular para ajustar la presión intracelular y autoprotgerse de una ósmosis no deseada. En la especie *Scenedesmus*, el contenido de carbohidratos se vio incrementado en un 35.91% en condiciones de concentración 400 mM de NaCl (Pancha *et al.*, 2016). Con lo cual, la variación de la salinidad junto con la limitación de nutrientes es una estrategia efectiva para la acumulación de carbohidratos.

Los nutrientes necesarios para su crecimiento, así como su disponibilidad afecta al crecimiento microalgal ya que el requerimiento de nutrientes que necesitan depende de la especie de microalga. Es más, la limitación de un nutriente en particular podría tener un impacto significativo en la composición bioquímica (Kamalanathan *et al.*, 2016). En la mayoría de los casos, las condiciones de escasez de algún nutriente no tienen por qué ser necesariamente perjudiciales para que la microalga sintetice y acumule compuestos carbonados (lípidos o carbohidratos).

La acumulación de carbohidratos podría ser una opción interesante en el campo de producción de bioetanol, pese a que en la mayoría de los casos, las condiciones de déficit dificultan el crecimiento de la biomasa.

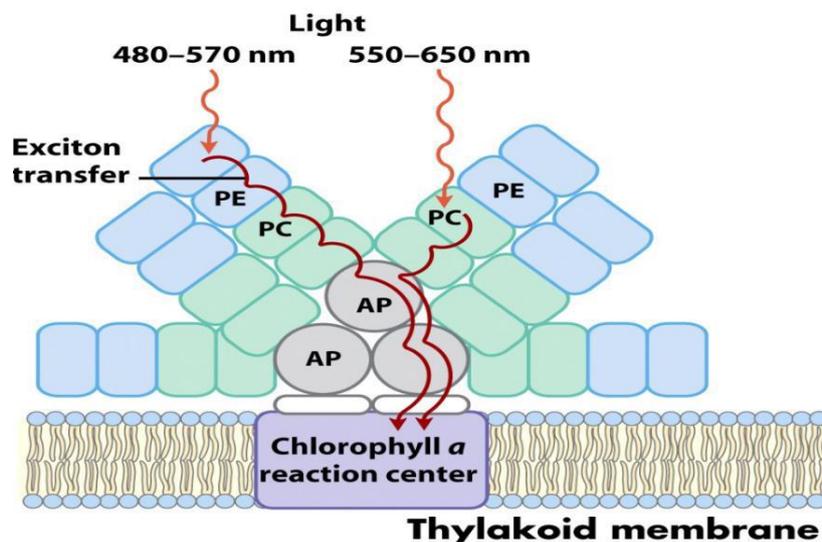
## 2.3 Microalgas Rojas

Las algas rojas, rodófitos o rodófitas son un filo de algas clasificados como plantas no vasculares. Son fotosintéticas y contienen clorofila a y clorofila d, además de pigmentos accesorios tipo ficobilinas y carotenoides. Son un grupo de 5.000 a 6.000 especies distribuidas en una única clase, *Rhodophyceae*, y dos subclases, *Bangiophycidae* y *Florideophycidae* (Fernández *et al.*, 2017) de una gran diversidad de formas y tamaños. Se caracterizan por la ausencia de células flageladas, la presencia de pigmentos ficobilínicos en los ficobilisomas. Son representativas del medio marino, encontrándose pocas en aguas dulces. Sus pigmentos fotosintéticos incluyen tres tipos de ficobilinas que les confieren su color característico, este color viene dado por la presencia de biliproteínas (ficoeritrina y ficocianina principalmente) que contribuyen a enmascarar el color verde de la clorofila (El Gamal, 2010).

### 2.3.1 Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas (FBPs) son proteínas pigmentarias que pertenecen a la familia hidrofílica, que se juntan en una matriz para construir una estructura compleja llamada ficobilisoma. Son pigmentos accesorios que se encuentran en la región visible del espectro de 495 a 650 nm, constituyendo una medida de ficocianina azul, aloficocianina

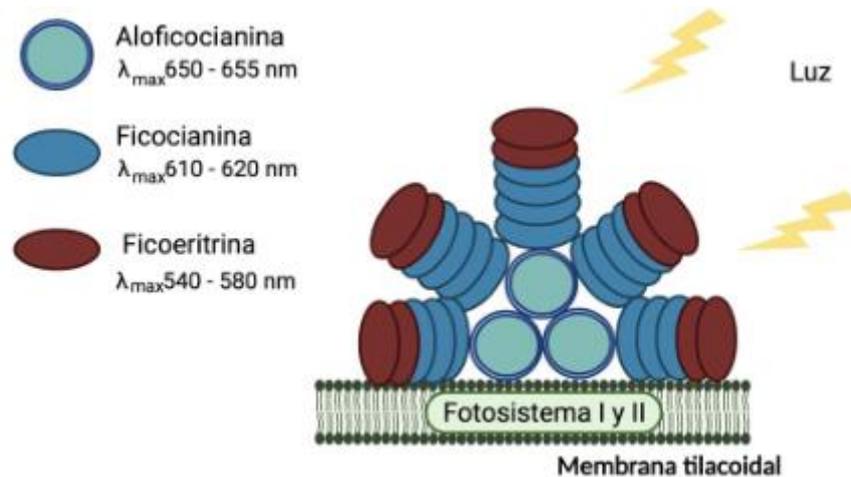
y ficoeritrina roja, que se encuentran en las cianobacterias y microalgas de los géneros *Rhodophyta* y *Cytophyta* (Marín-Prida *et al.*, 2015). Las propiedades de la cromoproteína de la ficoeritrina y la ficocianina se vienen estudiando desde hace dos décadas. Estos estudios han revelado la agregación de ficobiliproteínas y las fuerzas involucradas en el proceso de agregación, que se espera que conduzcan a la formación de estructuras de ficobilisomas. Los ficobilisomas son los sitios presuntos para la localización de ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina en la división Rhodophyta. Estas ficobiliproteínas en las algas funcionan como pigmentos de transferencia de energía. Las microalgas u otras algas rojas filamentosas son organismos microscópicos, capaces de convertir la energía solar en energía química a través de la fotosíntesis. Estudios recientes enfatizaron la función potencial de los pigmentos de algas como un agente director de electrones en la migración transmembrana de electrones contra el estrés oxidativo por reducción de metales (McDougal & Gamlin, 2010).



**Fig. 4** Descripción esquemática del ficobilisoma

Las FBP abarcan cerca del 80% del peso seco del ficobilisoma, el 20% restante lo conforman proteínas no pigmentadas, las cuales se encargan de unir y estabilizar el ficobilisoma a la membrana externa del tilacoide (Vera-López *et al.*, 2021). Las ficobiliproteínas se dividen en tres clases según sus propiedades de absorción: ficoeritrinas ( $\lambda_{\text{máx}} \sim 540\text{--}570$  nm), las cuales contienen los cromóforos ficoeritrobilina y ficourobilina; ficocianinas ( $\lambda_{\text{máx}} \sim 610\text{--}620$  nm), que contienen ya sea una mezcla de los cromóforos ficocianobilina y ficoeritrobilina o sólo ficocianobilina, según la especie de origen; y aloficocianinas ( $\lambda_{\text{máx.}} \sim 650\text{--}655$  nm), con ficocianobilina como grupo prostético (Bermejo *et al.*, 2003) Los cromóforos dan un color característico a cada ficobiliproteína: rojo a la ficoeritrina, azul brillante a la ficocianina, y verde azulado a la aloficocianina (D' Agnolo *et al.*, 1994)

Las FBP se encuentran ordenadas en los ficobilisomas con base en la emisión de fluorescencia y absorción de cada FBP y se sugiere que la transición de fotones se lleva a cabo en el siguiente orden: ficoeritrina  $\rightarrow$  ficocianina  $\rightarrow$  aloficocianina  $\rightarrow$  fotosistemas I ó II. En la Figura 5 se muestra un modelo del proceso de absorción y utilización de energía de las microalgas.



**Fig. 5** Proceso de absorción y utilización de energía de las microalgas.

Debido a su pigmentación brillante, naturaleza no tóxica y capacidad antioxidante, las FBP se consumen como suplementos alimenticios, ya sea como cultivos celulares liofilizados o bien en extractos purificados donde predominan estas proteínas. Las FBP también se emplean en diversas aplicaciones, entre las que destacan: agentes antioxidantes, neuroprotectores, hepatoprotectores, anticancerígenos, y colorantes en cosméticos y alimentos (Morales-Sánchez *et al.*, 2016). Dentro de sus aplicaciones, en el área de análisis inmunoquímicos se emplea a las FBP como marcadores fluorescentes en ensayos de citometría de flujo, en ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), técnicas de histoquímica y para la detección de especies reactivas de oxígeno (Eriksen, 2008). Actualmente existe una necesidad específica de incrementar la producción de estas proteínas pigmentadas a nivel comercial.

### 2.3.2 Biomasa

Ha surgido una búsqueda globalmente creciente para satisfacer las demandas de biomasa con la finalidad de abordar los muchos desafíos de una población humana en expansión, incluyendo el cambio climático, el envejecimiento de la población y la seguridad alimentaria, lo que da lugar a la necesidad urgente de producción sostenible de biomasa de fuentes no tradicionales como vienen siendo las fuentes vegetales.

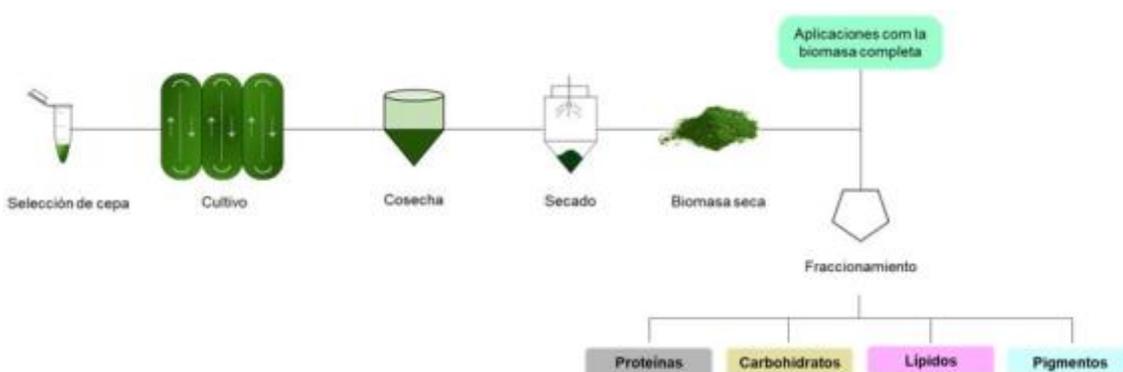
En consecuencia, ha habido un aumento de la inversión a nivel mundial en la biotecnología marina, con la investigación dirigida principalmente a las algas. Estas se caracterizan, respecto a otros organismos, por su alta productividad, muy alta diversidad de especies y de compuestos bioactivos (Blunt *et al.*, 2017). La productividad de biomasa y compuestos de alto valor añadido pasa por el desarrollo de tecnología de cultivos y cosechados para maximizar la producción y optimizar la relación coste/beneficio.

La biomasa obtenida a partir de algas es reconocida mundialmente como una fuente de valiosos componentes químicos con aplicaciones en el sector agroalimentario (incluidos alimentación humana, piensos para alimentación animal y bioestimulantes para plantas), en el sector energético (biodiesel, bioetanol, biogás, biohidrógeno, etc.) así como en el sector nutracéutico y cosmeceútico (Eppink *et al.*, 2017). Una amplia gama de moléculas de estos microorganismos como carbohidratos, proteínas, lípidos, pigmentos, minerales, vitaminas y enzimas presenta una gran variedad de potencialidades (Barros *et*

al., 2019). Sin embargo, el suministro de biomasa algal de calidad y en cantidad suficiente, sigue siendo motivo de preocupación ante las crecientes presiones ambientales que se oponen a la creciente demanda (Jung *et al.*, 2013). Los intentos recientes de suministrar una biomasa consistente, segura y ambientalmente aceptable mediante el cultivo, se han concentrado en caracterizar la variabilidad natural de los compuestos bioactivos y en optimizar los sistemas de cultivo (Barry *et al.*, 2017).

Aproximadamente 7000 toneladas de biomasa de algas secas se producen en todo el mundo cada año y el mercado mundial de biomasa de algas se valoró en USD 717.14 millones en 2018 y se prevé que alcance los USD 1365,8 millones en 2027, a una tasa de crecimiento anual compuesta de 7.42%. Estos datos muestran que la industria de las microalgas está ganando popularidad a nivel mundial, ya que además de la amplia variedad de aplicaciones, tiene varias ventajas potenciales frente a otros recursos fotosintéticos (Tang, 2020).

A diferencia de las plantas, el crecimiento de microalgas no se limita a tierras cultivables y agua dulce. Además, estos microorganismos presentan alta productividad, bajo impacto ambiental y no presentan estacionalidad; es decir, su cultivo se puede repetir durante todo el año y se puede cosechar diariamente (Daneshvar *et al.*, 2019).



**Fig. 6** Proceso simplificado para la obtención de Biomasa. (Mariana *et al.*, 2021)

Además, las herramientas biotecnológicas como la metabolómica, la cual no es más que el estudio de las huellas únicas que dejan los procesos celulares específicos; la transcriptómica, que es el estudio de todas las moléculas de ARN en una célula y la genómica, estudio completo del ADN, se han extendido recientemente a la ficología, pero en comparación con las técnicas que ya se aplican para la obtención de biomasa microbiana o vegetal, las cuales siguen estando a día de hoy subdesarrolladas (Stengel & Connan, 2015).

Para que los procesos basados en microalgas sean sostenibles, factibles y económicamente viables, es necesario desarrollar tecnologías de cultivo con alta productividad de biomasa y/o bioproductos al menor costo de producción. Con frecuencia, como el producto objetivo está relacionado con la formación de masa celular o el producto es la propia biomasa, la productividad de la biomasa es el parámetro clave a maximizar.

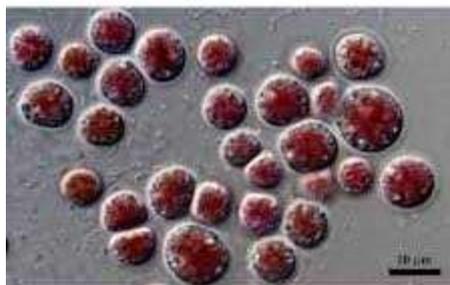
**Aplicaciones biomédicas:** gran parte de la investigación biotecnológica de las microalgas se centra en la búsqueda de nuevos compuestos para el bienestar humano basados en actividades de promoción de la salud de extractos de algas. La química de

los productos naturales es uno de los campos de más rápido desarrollo en biotecnología, y el descubrimiento de nuevos compuestos de microalgas y macroalgas es comúnmente apoyado por métodos analíticos incluyendo Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de Masas (ESI-MS). Muchas revisiones (Jahan *et al.*, 2017) recientes han puesto de manifiesto la riqueza de compuestos que tienen aplicaciones potenciales para la salud, o a su vez esbozaron los muchos productos químicos que tienen aplicaciones tanto para la alimentación como para la salud, tales como aquellos compuestos con altas actividades antioxidantes.

Se plantea (Pardo- Plaza *et al.*, 2019) que la biomasa de las microalgas puede derivarse en recursos naturales o cultivados, que pueden o no estar predefinidos mediante la selección y caracterización de especies así como por recolección de especies las cuales pueden variar según su origen. El conocimiento de la función biológica del compuesto, y de su rol ecológico, proporcionarían una notable contribución a todo el proceso, pues es probable que arroje una idea de los mecanismos bioquímicos que subyacen al componente y que podrán servir de apoyo para su utilización, por ejemplo, en el desarrollo de fármacos.

#### 2.4 *Porphyridium cruentum*

La microalga *Porphyridium cruentum*, también conocida como *Porphyridium purpureum* pertenece a la división *Rodophyta*, clase *Rhodophyceae*, familia *Porphyridiaceae*, orden *Bangiales*, género *Porphyridium*. La misma está encapsulada por una pared celular con polisacáridos extracelulares sulfatados que por su viscosidad tiene potencial en la industria alimentaria y farmacéutica.



**Fig. 7** *Porphyridium cruentum*

Ha sido estudiada por su capacidad para producir productos de alto valor o compuestos de interés, incluidas las ficobiliproteínas, pigmentos (ficocianina, ficoeritrina); en el caso de la ficoeritrina está siendo utilizada como marcador en inmunoensayos y para la obtención de enzimas de aplicación terapéutica como la superóxido dismutasa, ayudando en el tratamiento de células cancerosas, por lo que tienen un alto valor terapéutico como inmunomodulador, producción de ácido araquidónico, ácidos grasos entre otros. Recientemente se ha incrementado el interés por su habilidad de revertir el fenotipo de multirresistencia a fármacos de varios tipos de células tumorales (Pulz y Gross, 2004) demostrando tener múltiples aplicaciones en la industria biotecnológica, por lo que constituye una de las especies más prometedoras dentro del campo de la biotecnología marina (Benavides y Rito-Palomares, 2004).

#### 2.4.1 Cultivo de *Porphyridium cruentum*

---

La tecnología de cultivo está relacionada tanto con el diseño del tipo y configuración de los sistemas de cultivo abiertos o cerrados, así como con las condiciones operativas que conducen al equilibrio entre el crecimiento óptimo de las microalgas y la productividad del bioproducto. (Yen *et al.*, 2019; Maroneze *et al.*, 2020) La investigación y el desarrollo sobre la eficiencia de los sistemas y métodos de cultivo se han convertido en el principal objetivo en la producción de microalgas.

En el cultivo de *Porphyridium cruentum* se han empleado distintas variantes: los estanques a cielo abierto, los fotobiorreactores tubulares y sistemas basados en el principio de la inmovilización celular. De éstos, el cultivo a cielo abierto aunque presenta dificultades para mantener las instalaciones libres de microorganismos contaminantes y limitaciones inherentes a las variaciones de los factores ambientales, ha sido el método convencionalmente utilizado (Martínez, 2005).

Cuando *Porphyridium cruentum* crece en un medio líquido, la viscosidad del mismo aumenta como consecuencia de los procesos de síntesis y transferencia de polisacáridos a la superficie celular y su solubilización en el medio de cultivo. Para desarrollar métodos adecuados de cultivo de *P. cruentum* en las condiciones climáticas de Cuba es necesario dominar dicha tecnología a pequeña escala. Por lo que se hace necesario investigar si la cepa posee condiciones apropiadas en su desarrollo que permitan su ulterior aplicación en la biotecnología marina.

#### 2.4.2 Medios de cultivo para *Porphyridium cruentum*

---

Se han desarrollado diferentes medios de cultivo para microalgas cuyas fórmulas tienen diferentes usos o propósitos. Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en la producción de microalgas, es el de seleccionar el medio de cultivo química y económicamente apropiado para utilizar en los diferentes volúmenes del sistema de producción masiva. Cuando se trabaja con volúmenes grandes, el interés radica generalmente en el uso de elementos de bajo costo y que, a su vez, aseguren altas densidades de los cultivos y buena calidad nutricional de las células (Abalde *et al.*, 1995).

Se han desarrollado diferentes medios para el cultivo de microalgas que van desde las fórmulas para enriquecer el agua de mar natural, hasta el uso de medios artificiales que permitan resultados constantes en contraste con los resultados tan variables que brinda el uso del agua de mar natural que entre otros factores depende del lugar donde se colecta ésta, y el tiempo de almacenamiento de la misma. Los medios artificiales se usan principalmente para fines experimentales, ya que como se ha mencionado, brinda resultados constantes, aunque existen algunas especies que no crecen en medios artificiales por factores desconocidos que afectan su crecimiento.

Existen una serie de medios de cultivos que son utilizados para elevar la producción de biomasa de *Porphyridium cruentum*, el medio de cultivo Vonshak, (f/2) de GUILLARD y Walnes son los más ampliamente utilizados para el cultivo en bolsas o fotobiorreactores, ya que contienen todos los elementos necesarios para el crecimiento de estos microorganismos, aunque existen otras formulaciones para condiciones de laboratorio descritas por Vonshak (García, 2004).

### 2.4.3 Inóculo

---

Todos los inóculos, en condiciones adecuadas de luz, temperatura y nutrientes experimentan un crecimiento exponencial, pero dado que las condiciones de cultivo no suelen ser siempre estrictamente controlables es importante contar con un inóculo abundante de la especie en cuestión con objeto de evitar proliferaciones de otras especies no deseadas. Dicho inóculo abundante suele producirse en el laboratorio en cultivos unialgales ya masivos, pero rara vez axénicos. Cuando el cultivo alcanza el final de la fase exponencial, se pasa a trabajar en condiciones semicontroladas, con mayores volúmenes que se obtienen diluyendo el inóculo con medio de cultivo. Desde esta fase se comienza la fase industrial al aire libre o en el mar abierto. El inóculo en la propagación del cultivo es generalmente del orden del 1-10% del volumen total del medio y está en dependencia de cada microorganismo. En cultivos sumergidos el tamaño del inóculo se calcula entre un 5 y un 10 % en volumen de la etapa actual. Si es inferior a esta proporción puede existir un período de latencia excesivamente prolongado, lo que alargará el periodo de fermentación. Es necesario aclarar que no es solo importante el tamaño del inóculo sino también su calidad, es decir debe predominar el número de células viables. Para evitar estos problemas, el proceso de fermentación se lleva a cabo en cuatro etapas: Preservación del inóculo, multiplicación del inóculo, cultivo de pre-fermentación y fermentación de producción. (García, 2004).

### 2.4.4 Biorreactores. Características.

---

El fotobiorreactor es uno de los dispositivos que se utiliza para el cultivo masivo de microalgas, donde la productividad también está directamente relacionada con el diseño del fotobiorreactor, y esto depende de factores como la geometría, la dinámica de fluidos y la capacidad de transferencia de masa (García-Mañas *et al.*, 2019; Ación *et al.*, 2017; Kirnev *et al.*, 2020).

Los sistemas de cultivo deben diseñarse para proporcionar las condiciones óptimas requeridas por las cepas seleccionadas con una demanda y un costo mínimo de energía. Por lo tanto, se deben proporcionar condiciones de cultivo específicas. Para satisfacer estas demandas impuestas por el sistema biológico, los sistemas de cultivo deben diseñarse de manera que garanticen mezclado y transferencia de masa eficientes. Estos organismos fotosintéticos pueden crecer tanto con luz solar como artificial y se pueden cultivar básicamente en sistemas de cultivo: abierto y cerrado; el sistema abierto es el más usado a gran escala. A pesar de ello el cultivo de microalgas se ha visto limitado por el nivel de producción de biomasa y los costos asociados al cultivo (Gómez y Martínez, 2018).

Los Biorreactores de microalgas se clasifican según su diseño en dos tipos principales:

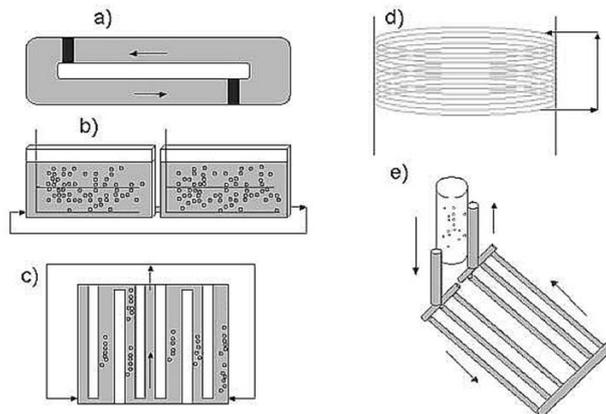
1. Los sistemas abiertos (como estanques extensos sin mezclar, estanques con canales) en los cuales existe intercambio de masa entre el sistema y los alrededores; es decir, existen flujos de entrada y/o salida

2. Los sistemas cerrados: aquellos en el que no existe intercambio de masa (flujo másico) entre el sistema (caja negra) y los alrededores (ambiente externo), como fotobiorreactores (PBR) tubulares, PBR verticales, fermentadores heterótrofos). Normalmente, estas estructuras constan de sistemas de cuatro fases: células como fase sólida, medio de crecimiento como fase líquida, fase gaseosa y colector de radiación luminosa (en el caso de cultivos fotoautótrofos) (Chang *et al.*, 2017).

Los primeros fotobiorreactores propuestos en la última década han sido tubulares y de placas planas (Contreras-Flores *et al.*, 2003) han recibido, entre otros, mucha atención, ya que permiten establecer cultivos de alta densidad celular, más veces en comparación con los sistemas convencionales de carrusel. Esto tiene ventajas como:

- 1) facilidad para cosechar la biomasa,
- 2) mantenimiento del cultivo sin contaminación,
- 3) mejor control de las condiciones de cultivo y
- 4) menor inversión de capital en el fotobiorreactor.

Este último factor es un elemento importante en el costo de producción de productos derivados de microalgas.



**Fig. 8** Tipos básicos de fotobiorreactores: a) tipo carrusel, b) tipo plano, c) con iluminación interna, d) tipo serpentín, e) tubular horizontal con *airlift*.

Un biorreactor busca mantener condiciones ambientales propicias: pH, temperatura, CO<sub>2</sub>; según el microorganismo que se cultiva. El modo de operación de un sistema de cultivo, es sinónimo del modo de operar del biorreactor o fermentador. Éste no solo influye en el diseño propio del reactor, también, en el modelo cinético de crecimiento del cultivo. Estos procesos biológicos constituyen una tecnología esencialmente multidisciplinaria y basada en la ciencia y la tecnología que permite diseñar y/o producir nuevas moléculas, nuevos productos. Podemos decir simplifcadamente que es el resultado de la integración de la bioquímica con la microbiología y la ingeniería.

## 2.5 Ensayos de actividad antimicrobiana

En la literatura se reportan varios métodos *in vitro* para determinar la actividad antimicrobiana, los cuales permiten evaluar especies vegetales que son empleadas tradicionalmente para tratar procesos infecciosos. Estos métodos son basados en

principios diferentes y no presentan igual sensibilidad, no obstante se pueden agrupar en tres metodologías principales: método de difusión, método de dilución y bioautográficos (Cos *et al.*, 2006). En cuanto a la selección de los microorganismos depende del propósito específico de la investigación. En una primera exploración son preferibles usar cepas de referencias, sensibles a antibióticos y que representen especies patógenas comunes de diferentes clases. Para estos estudios son posibles varias combinaciones pero de forma general debe ser una batería que incluya bacterias Gram positivas y Gram negativas además de al menos un representante del reino *fungi*, generalmente levaduras.

### 2.5.1 Actividad antimicrobiana de las microalgas.

En los últimos años se ha evidenciado incremento de la resistencia a los antimicrobianos a nivel mundial, convirtiéndose en un problema de salud pública, ya que los microorganismos han generado una mayor cantidad de mecanismos de resistencia antimicrobiana, por lo que se ve la necesidad de encontrar componentes bioactivos de fuentes naturales.

Las microalgas son ampliamente mencionadas como un recurso potencial de sustancias antibacteriales y antifúngicas. Se han caracterizado por su alto potencial para convertir sustancias inorgánicas en compuestos orgánicos naturales, los mismos pueden ser utilizados como ingredientes funcionales, es así que muchos de estos compuestos pueden ser células enteras de microalgas (biomasa microalgal) o sus bioproductos metabólicos (compuestos bioactivos), (Ramírez- Mérida *et al.*, 2015 y Mudimu *et al.*, 2014).

El potencial de diferentes péptidos e hidrolizados de proteínas de origen microalgal ha sido reportado por diversos autores como posibles agentes terapéuticos de origen no convencional, debido a su función antimicrobiana, antiviral, inmunorreguladora (Díaz-Pérez *et al.*, 2021).

Hasta donde se conoce, el primer reporte de actividad antibacteriana en una microalga fue descrito por Shirahama (1942), quien investigó que *Cystophyllum hakodatense* tenía efecto sobre *Lactobacillus bulgaris* y *Lactobacillus helveticus*. Sieburth en 1960, observó que la microalga de origen marino de la Antártica *Phaeocystis pouchetii*, es ingerida por Euphasia, que a su vez, es el alimento básico de los pingüinos, lo que al parecer modifica la microflora gastrointestinal de los pingüinos por la ingesta de la microalga incluida en el alimento (Martínez -Guillén, 2012).

Diferentes especies, entre ellas *Synechococcus elongatus*, *Synechocystis* sp., *Amphiprora paludosa*, *Phorphyridium cruentum* y *Chaetoceros muelleri* han mostrado actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram- negativas, (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2010).

Los medios de cultivos más utilizados para bacterias se encuentran el Mueller-Hinton y el tripticasa soya tanto en agar como en caldo. Para hongos el medio Sabouraud en agar o caldo es generalmente el más empleado; mientras que para microorganismos de difícil crecimiento tales como *Streptococcus pneumoniae* y *Legionella pneumophila* se emplean medios más complejos, enriquecidos con una atmósfera de incubación con 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y/o una extensión del tiempo de incubación (Cos *et al.*, 2006).

### 2.5.2 Actividad antimicrobiana de *Porphyridium cruentum*

---

Recientemente, los productos naturales derivados de plantas y algas marinas han llamado la atención, por las propiedades antimicrobianas que estos presentan. Muchos antioxidantes naturales, exhiben una amplia gama de efectos biológicos, incluidos antibacterianos, antivirales, antiinflamatorios, actividades antialérgicas, antitrombóticas y vasodilatadoras (Fernández, 2019). Este es el caso de *Porphyridium cruentum*; la cual produce un exopolisacárido que en estudios anteriores se plantea, que evita que *Helicobacter pylori* y *Aeromonas veronii* (bacterias patógenas del humano), se adhieran a las células hospederas (Guzmán-Murillo y Ascencio, 2000).

Los polisacáridos sulfatados presentes en la pared celular de *Porphyridium* muestran actividad antioxidante, además de actividad antiviral contra el Virus del herpes simple y de la varicela zóster, (Ramírez-Mérida, 2015). Estos polisacáridos además muestran actividades antiinflamatorias y antiproliferativas.

En un estudio realizado (Ginzberg y colaboradores 2000), se encontró que la adición de biomasa liofilizada de la microalga *Porphyridium* sp., en la dieta de gallinas, reduce la tasa alimenticia en un 10 %. Los huevos de dichas gallinas presentaron niveles menores de colesterol y un incremento en los niveles de ácido linoléico, ácido araquidónico y de carotenoides, con una coloración más oscura con respecto a los huevos de gallinas control (sin adición de la microalga). *P. cruentum* posee componentes biológicamente activos que podrían calificarse como fuente potencialmente valiosa de antioxidantes y antimicrobianos naturales, por lo que podría considerarse una fuerte alternativa a las otras fuentes naturales debido a los componentes potencialmente valiosos que presenta.

### 2.5.3 Actividad antiparasitaria

---

Las infecciones por parásitos son un gran problema de salud en varias partes del mundo, causando una significativa morbilidad. Entre ellas se encuentran, la enfermedad del sueño africano, la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas (clasificadas por la OMS como enfermedades tropicales negligenciadas) que han ganado en importancia producto a su expansión por el mundo, limitada terapia y complejo cuadro clínico.

Las leishmaniasis son un conjunto de enfermedades muy dispares entre sí, producidas por distintas especies de un protozoo perteneciente al género *Leishmania*. Hay dos formas básicas, cutánea y visceral, dependientes de la especie causante y de la respuesta inmune establecida. Tienen en común el agente causal (alguna especie de *Leishmania*), el vector (un insecto denominado flebótomo), el reservorio (vertebrados) y el parasitismo de las células del sistema reticuloendotelial del huésped (sobre todo, macrófagos). Las tripanosomiasis son las enfermedades causadas por protozoarios del género *Trypanosoma*. La enfermedad del sueño en África es causada por tripanosomas del grupo *T. brucei* (*T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*) y transmitida por la mosca tsetse. Por otro lado, la enfermedad de Chagas es producida por *T. cruzi* y transmitida por artrópodos de la familia de los *Triatómidos* (Arrieta *et al.*, 2000).

#### 2.5.4 Actividad citotóxica de *Porphyridium cruentum*

Los polisacáridos de la pared celular de *P. cruentum* están compuestos principalmente por xilosa (38%), glucosa (24%), galactosa (22%) y ácido glucurónico (10%); sin embargo, también pueden encontrarse la arabinosa, la ramnosa y la manosa en concentraciones menores (Geresh *et al.*, 2009). Estos promueven la actividad antioxidante, lo que sugiere un mecanismo de protección celular contra especies reactivas de oxígeno (Tannin-Spitz *et al.*, 2005). Aunado a lo anterior, la administración *in vivo* de polisacáridos exocelulares de *P. cruentum* a ratones ha resultado en un incremento de la población de macrófagos así como un incremento de la enzima ácido fosfatasa (Morris-Quevedo *et al.*, 2000).

Se ha reportado que los polisacáridos aislados de algas tienen la capacidad de modificar la actividad de macrófagos al inducir la producción de citoquinas y óxido nítrico (NO) (Schepetkin y Quinn 2006). Los macrófagos representan una parte esencial del sistema natural de defensa antitumoral. La modulación de la función de los macrófagos puede ayudar a incrementar la fagocitosis, la actividad antimicrobial, la quimiotaxis y la presentación antigénica a células T, por tanto sirve como estrategia preventiva y terapéutica contra algunas enfermedades (Desai *et al.*, 2007).

Las células más comúnmente empleadas en los sistemas *in vitro* de evaluación para actividad leishmanicida son las U-937 que es una línea celular de monocitos humanos derivados de un linfoma histiocítico (Qiu M. *et al.*, 2016), la línea celular THP-1 que corresponde a una línea de monocitos humanos derivados de una leucemia linfocítica aguda (Souza GSd *et al.*, 2017) y las células J774A.1 que es una línea celular de macrófagos murinos derivados de un sarcoma de células reticulares. Ocasionalmente los sistemas *in vitro* de evaluación de compuestos para actividad citotóxica y leishmanicida utilizan cultivos primarios de monocitos y macrófagos de sangre periférica de humanos y de macrófagos peritoneales de ratón y hámster, aunque, los resultados presentan una mayor variabilidad en comparación a las líneas celulares, debido a la heterogeneidad de la población inherente al donante de las células (Mesa *et al.*, 2010).

#### 2.5.5 Determinación de toxicidad de biomasa con *Artemia Salina*.

Los ensayos toxicológicos son herramientas de análisis convenientes para establecer efectos tóxicos de agentes físicos y químicos en organismos determinados (Hansen *et al.*, 2013).

Una de las pruebas iniciales más útiles, con bajo costo y de fácil manejo para determinar especies vegetales y compuestos bioactivos promisorios en este campo, es la prueba de letalidad de *Artemia salina*; en la cual, para determinar la toxicidad de una molécula se expone un extracto o la fracción de dicho extracto, contra este crustáceo (Pedro *et al.*, 2020). Sus resultados se interpretan dependiendo del contexto en que se plantea el objetivo de la investigación, si la sustancia evaluada no es citotóxica es un indicador que esta sustancia puede ser bien tolerada por un sistema biológico, y si la sustancia es citotóxica es un indicador que esta sustancia puede contener compuestos bioactivos con potencial efecto antitumoral (Rajabi *et al.*, 2015).

La *Artemia salina* es un camarón minúsculo de cuerpo blando que se desarrolla en aguas de alta salinidad (Aranda-Ventura *et al.*, 2018), además son organismos de fácil mantenimiento debido a que no es necesario conservar un cultivo de forma permanente en

laboratorio y es posible obtener comercialmente sus quistes en todas las épocas del año; su empleo se ha popularizado para experimentación en ensayos biológicos (Ibrahim, 2015) por lo que se ha propuesto su uso en bioensayos para evaluar la toxicidad de extractos de plantas.

A través de pruebas de toxicidad se estima perturbaciones en su morfología, locomoción, tasa de filtración, reproducción y supervivencia (Hernández Marín, 2015). Son organismos fundamentales para las relaciones dentro de la cadena tr



**MATERIALES Y  
MÉTODOS**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Microalga

Se utilizaron cepas de *Porphyridium cruentum*, obtenida de la Colección de Cultivos de Organismos Autotróficos de Trebon, en la República Checa. Ésta fue conservada y propagada en condiciones de laboratorio en el Cepario de la División de Biotecnología Solar del Centro de Investigaciones de Energía Solar (CIES) empleando el medio recomendado por Vonshak, pasando luego al Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX).

### 3.2 Condiciones de cultivo de *Porphyridium cruentum*

El crecimiento de las microalgas puede estar influido por una variedad de factores tanto físicos como nutricionales. Los factores físicos incluyen fundamentalmente la concentración de iones hidrógeno (pH), la temperatura, intensidad de la luz y salinidad, mientras que los factores nutricionales comprenden la disponibilidad de carbono, nitrógeno, fósforo, así como otros minerales y vitaminas (Zeng & *et al.*, 2015).

Se cultivó la microalga *P. cruentum* en placas Petri con el propósito de lograr cultivos frescos. Esto se llevó a cabo por triplicado en Erlenmeyer de 50 mL de capacidad con 10 mL de medio de cultivo. Cuando estas alcanzaron la fase de crecimiento exponencial fueron inoculados en el medio Walnes a una concentración celular de  $8,7 \times 10^5$  células/mL. Para la preparación del medio de cultivo Walnes se utilizó la formulación descrita en la **Tabla 1**.

**Tabla. 1** Formulación final del medio Walnes por litro de agua de mar

Solución	Volumen
Solución nutriente (3)	1,0 L
Solución de vitaminas (2)	0,1 mL
Agua de mar filtrada	1,0 L

**Tabla. 2** Solución de micronutrientes (1)

Reactivo	Cantidad para 100 mL de agua destilada
ZnCl <sub>2</sub>	2,1 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,9 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,0 g

**Tabla. 3** Solución de vitaminas (2)

<b>Vitamina</b>	<b>Cantidad para 100 mL de agua destilada</b>
Vitamina B12 (Cianocobalamina)	10,0 mg
Vitamina B1 (Tiamina)	10,0 mg
Vitamina H (Biotina)	200,0 $\mu$ g

**Tabla. 4** Solución nutriente (3)

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad para 1L de agua destilada</b>
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,3 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,36 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33,6 g
EDTA disódico	45,0 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	20,0 g
NaNO <sub>3</sub>	100,0 g
Solución de micronutrientes (1)	1 mL

El cultivo se realizó por triplicado en módulos (bolsas desechables) de 50 L capacidad con 10 L de medio de cultivo. Estos cultivos fueron sometidos a condiciones de temperatura de 20 a 24 °C, bajo luz artificial de 300 lux, con lámparas de 40 W (GEDEME, Suecia) dispuesto de forma lateral al módulo de cultivo. Agitación por burbujeo con un flujo de aire de 0,23 g·s<sup>-1</sup>. Los valores de pH y salinidad se ajustaron a 7,5 y 35 ‰, respectivamente. El cultivo se realizó durante 12 días, con mediciones diarias de Absorbancias a 545 nm (Espectrofotómetro UV-visible PG Instruments T60U).



**Fig. 9** Cultivo de *P. cruentum* en condiciones de laboratorio

### 3.3 Recolección de Biomasa

Una vez que los cultivos alcanzaron la fase de estacionaria de crecimiento, la biomasa fue recolectada. Por el método gravimétrico, se calculó en balanza analítica (Sartorius, BS 121S, Alemania) (Swawami *et al.*, 2008) la biomasa concentrada expresándose en g células·L<sup>-1</sup>. Diariamente se centrifugaron 25 mL de muestra del cultivo celular a 3500 rpm. La temperatura en la estufa (DHG-9146A, electrotérmica, China) fue de 105 °C hasta lograr un peso constante.

Se filtraron 5 L de *P. cruentum* a través de filtros Whatman 4, separándolo del sobrenadante. Inmediatamente después del filtrado, el paquete celular se mantuvo en congelación a -20 °C.

### 3.4 Caracterización taxonómica y química de la biomasa de *P. cruentum*

Se realizó la caracterización taxonómica de la microalga con el objetivo de garantizar su autenticidad.

El lisado de la biomasa para romper las estructuras celulares se realizó con una solución de buffer acetato de sodio pH 5,5, en una proporción de 1 g de biomasa húmeda (20 % biomasa seca) en 4 mL de buffer acetato de sodio 1 mol/L agitando, en un agitador magnético convencional a temperaturas de laboratorio produciendo la lisis celular mediante choque osmótico. Luego se remueve el debris celular en una centrífuga refrigerada (SELECTA, España) a 25 °C y a una velocidad de 2 500 rpm, durante 15–25 min, obteniéndose un sólido.

Se realizó un barrido espectrofotométrico de la biomasa obtenida para evaluar la pureza, mediante relaciones de Absorbancia a 280, 545, 565, 620 y 650 nm en un Espectrofotómetro UV-visible modelo UV-2061, Marca: Rayleigh; país, China) a 25 °C.

### 3.5 Obtención del extracto acuoso de la Biomasa

La biomasa obtenida a partir de cultivos de *P. cruentum* fue procesado para obtener un extracto a una concentración de 1000 µg/mL

El extracto se obtuvo utilizando agua bidestilada como disolvente y se mantuvo a -20°C hasta la realización del ensayo. Se utilizaron distintas concentraciones, (512, 256, 128, 64, 32, 16 µg/mL) tanto para el ensayo antimicrobiano como para la evaluación citotóxica.

### 3.6 Microorganismos patógenos de prueba

Para determinar la actividad antimicrobiana de la biomasa de *P. cruentum*, se utilizaron microorganismos de prueba *Candida albicans*, *Leishmania infantum* MHOM/MA (BE)/ 67, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen CL2, cepa  $\beta$ -galactosidasa (sensible a nifurtimox), *Trypanosoma brucei* Squib 427 (sensible a suramina) suministrados por el Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene (LMPH) de la Universidad de Amberes, Bélgica, los cuales han mostrado poseer diferentes mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. Se utilizaron los fármacos de referencia, Flucitosina, Miltefosina, Suramina, Benzinidazol, todos de Sigma-Aldrich, EE.UU., para cada uno de los microorganismos evaluados, respectivamente. Se

utilizaron condiciones de cultivo específicas para garantizar el crecimiento satisfactorio de levaduras y parásitos de acuerdo con los procedimientos estándar.

### 3.7 Evaluación de la actividad antimicrobiana de la microalga

El potencial antimicrobiano *in vitro* del extracto, de la biomasa se determinó por el método de microdilución con resazurina (Yen *et al.*, 2019). Este es un método cualitativo, que se caracteriza por ser de fácil estandarización y está indicado para microorganismos no exigentes y crecimiento rápido. Presenta la ventaja de ser reproducible (Ramírez & Marin, 2009).

Esta actividad antimicrobiana *in vitro* se llevó a cabo frente a hongos y parásitos. Los ensayos fueron realizados en microplacas estériles de 96 pocillos. Diez microlitros de cada una de las muestras diluidas en agua se adicionaron a cada pocillo ( $5 \times 10^5$  UFC/mL) y/o hongo ( $5 \times 10^3$  UFC/mL). El crecimiento microbiano fue comparado con los pozos controles no tratados, (100% crecimiento celular) y con los pozos controles que contienen sólo el medio de cultivo (0% de crecimiento celular). Las placas fueron incubadas bajo condiciones según el microorganismo. Luego se adicionaron 20  $\mu$ L de resazurina ( $c(x)=50 \mu\text{g/mL}$ ) por pocillo, incubando nuevamente bajo las mismas condiciones y por el tiempo requerido.

Posteriormente se determinó el porcentaje de crecimiento microbiano por fluorimetría a una longitud de onda de excitación de 550 nm y de 590 nm de emisión (Cos *et al.*, 2006) en un fluorímetro para microplacas (TECAN GENios, Alemania).

#### 3.7.1 *Leishmania infantum*

Los ensayos de actividad antiprotozoaria frente a *Leishmania infantum* fueron colectadas del bazo de un hámster infectado mediante tres pasos de purificación por centrifugación. El ensayo fue realizado en microplacas estériles de 96 pocillos, las que contenían 10  $\mu$ L de cada una de las muestras a las concentraciones preparadas por pocillo junto con 190  $\mu$ L del inóculo macrófago/parásito ( $3 \times 10^5/3 \times 10^6$ ). Después de 5 días de incubación a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub>, se realizó la tinción con solución de Giemsa al 10 % y se determinó el grado de infestación por conteo directo mediante un microscopio. Los resultados fueron expresados como porcentaje de reducción de la infectación comparada con los controles de pocillo no tratados.

#### 3.7.2 *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma rhodesiense*

Los ensayos de actividad antiprotozoaria frente a *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma rhodesiense* fueron realizados en microplacas estériles de 96 pocillos que contenían por cada pocillo 10  $\mu$ L de cada una de las muestras a las concentraciones preparadas y 190  $\mu$ L de la suspensión de tripomastigotes de parásitos ( $1,5 \times 10^4$  para *T. brucei* y  $4 \times 10^3$  para *T. rhodensiense*) (Raz B. *et al.*, 1997). Después de tres días de incubación, a cada pocillo fueron adicionados 50  $\mu$ L de resazurina. Posteriormente las placas fueron incubadas por 6 horas para *T. rhodesiense* y 24 horas para *T. brucei*, realizando la lectura de las mismas en un fluorímetro para microplacas (TECAN GENios, Alemania) a una longitud de onda de excitación de 550 nm y de 590 nm de emisión. Los resultados fueron expresados como porcentaje de reducción del crecimiento del parásito en comparación con los controles. El crecimiento del parásito fue comparado con los

pocillos controles infectados no tratados, (100% crecimiento) y con los pocillos controles no infectados (0% de crecimiento).

### 3.7.3 *Trypanosoma cruzi*

En este ensayo fueron las formas tripomastigotes ( $4 \times 10^4$  parásitos/pocillo) fueron sembrados junto con 10  $\mu\text{L}$  de las muestras en microplacas estériles de 96 pocillos. El crecimiento del parásito fue comparado con los pocillos controles infectados no tratados, (100% de crecimiento) y con los pocillos controles no infectados (0% de crecimiento) después de 7 días de incubación (37 °C). Posteriormente a cada pocillo fue adicionada el sustrato clorofenol rojo- $\beta$ -D-galactopiranosido (CPRG, acrónimo en inglés) y las microplacas fueron incubadas durante otras 4 horas a 37 °C. El grado de infestación del parásito fue medido espectrofotométricamente a 540 nm<sup>93</sup>.

### 3.8 Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

Se evaluó el efecto citotóxico a diferentes concentraciones (512, 256, 128, 64, 32, 16  $\mu\text{g/mL}$ ) del extracto de biomasa, por el método de Reducción de Rezasurina sobre la viabilidad celular de las líneas RAW 264.7 (macrófagos murinos, adherentes) y TPH-1 (pre-monocitos de leucemia humana en suspensión). Ambas líneas celulares se adquirieron de ATCC (American Type Culture Collection). Se usó tamoxifeno como control estándar. Se utilizaron condiciones de cultivo específicas para garantizar el crecimiento satisfactorio de las líneas celulares, de acuerdo con los procedimientos estándar.

Las mismas fueron mantenidas en atmósfera de  $\text{CO}_2$  5% en medios DMEN (células RAW 264.7 y TPH-1), (Gibco-BRL, EE.UU); todos enriquecidos con 10% de suero fetal bovino, 2% de *L*-glutamina y *D*-glucosa (4,5 g/L).

Para los ensayos de citotoxicidad las células RAW 264.7 fueron sembradas en matraces a 37°C, a 5% de  $\text{CO}_2$ , se retiraron con raspado celular (solo para células adherentes) y centrifugaron a 130 xg (10 min, 4°C). Se contaron las células y se les ajustó la concentración de la suspensión celular. Seguidamente las células ( $5 \times 10^5$  células) en 200  $\mu\text{l}$  fueron añadidas a cada pocillo de las placas de 96 pocillos. Posteriormente se incubaron las placas durante 24 h a 37°C en  $\text{CO}_2$  al 5%. Pasado este tiempo se centrifugaron las placas. Esta etapa de centrifugación solo se llevó a cabo para THP-1, (células no adherentes) 1800 rpm/10 min/RT donde se desechó suavemente el sobrenadante. Se añadió 200  $\mu\text{L}$  de medio fresco en las placas de 96 pocillos (las concentraciones del extracto y el disolvente que en este caso se trató del agua, deben diluirse en el medio antes). Las células de control se incubarán únicamente con 200  $\mu\text{L}$  de medio. Se agregó 10  $\mu\text{L}$  de medicamentos de referencia (Tamoxifeno), se incubaron las placas durante 24-48 a 37°C en  $\text{CO}_2$  al 5%, para luego añadir 50  $\mu\text{L}$  de resazurina (2,2  $\mu\text{g/mL}$ ) a cada pozo e incubar por 4 a 37°C. Se medirá la fluorescencia (excitación a 550 nm y emisión a 590 nm).

#### 3.8.1 Índice de selectividad

Se calcularon los índices de selectividad (IS) a través de la ecuación, relacionando la actividad antimicrobiana y la citotoxicidad. La importancia de la determinación del índice de selectividad radica, en que utiliza las células invasoras y las células tipo hospedero, discerniendo así que la acción antimicrobiana que se reporta no está asociada a una toxicidad celular inespecífica. Las muestras con valores de índices de selectividad < 5 clasificaron como no selectivas, entre 5 y 10 selectivas y mayor que 10 altamente selectivas, de acuerdo a lo normado en el laboratorio de referencia y a la literatura especializada (Chatelain E., 2015).

$$IS = CC\ 50 / CI50$$

Donde: IS: Índice de selectividad  
CC50: Concentración citotóxica media  
CI50: Concentración inhibitoria media

### 3.9 Ensayo de toxicidad con *Artemia salina*

#### 3.9.1 Obtención de las larvas

Los quistes de *A. salina*, donados gentilmente por especialistas del Centro de Investigaciones Pesqueras de Cuba, fueron puestos a eclosionar en un recipiente con agua de mar esterilizada, a temperatura ambiente durante 48 h bajo régimen continuo de luz. Después de la incubación, se colocó una fuente de luz a un lado del recipiente para atraer a las larvas y separarlas de los huevos aún sin eclosionar. Los crustáceos se colectaron y trasladaron a los pozos de la placa de ensayo utilizando una pipeta Pasteur. El número de larvas colectadas y añadidas a la placa se determinó utilizando un microscopio estereoscópico.

#### 3.9.2 Ensayo de letalidad

Se prepararon placas de 24 pozos, con 1,5 mL de agua de mar filtrada y con las diluciones del extracto de la biomasa de *P. cruentum* (1000, 100, 10 y 1 µg/mL). Se transfirieron entre 10 y 15 larvas a cada pozo durante 24 h a temperatura ambiente y bajo régimen continuo de luz. A las 24 h de exposición, se calculó el porcentaje de mortalidad, considerando muertas las larvas que no exhibieron movimiento durante varios segundos de observación.

Cada concentración se evaluó por triplicado. La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) se calculó mediante interpolación lineal de los valores del porcentaje de mortalidad, para cada concentración, en cada experimento.

El grado de toxicidad del extracto se definió en función del rango en que se encontraron los valores de CL<sub>50</sub> de acuerdo con las categorías siguientes: extremadamente tóxico (CL<sub>50</sub> < 10 µg/mL), muy tóxico (10 < CL<sub>50</sub> < 100), moderadamente tóxico (100 < CL<sub>50</sub> < 1 000) y no tóxico (CL<sub>50</sub> > 1 000 µg/mL).

El método de la prueba de toxicidad está diseñado según las buenas prácticas de laboratorio establecidas para este tipo de ensayo, la prueba fue desarrollada según los métodos descritos por (González-Lozano et al., 2010, Arencibia-Carballo et al., 2010) y la norma regulatoria mexicana NMX-AA-110-1995-SCFI (1996), adaptada a las condiciones de laboratorio del Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP), de Cuba.



## *RESULTADOS Y DISCUSIÓN*

#### 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La búsqueda de nuevos compuestos activos derivados de fuentes naturales con potencial farmacológico ha aumentado en los últimos años. En este sentido existe un mayor número de investigaciones con el fin de aislar sustancias que puedan combatir una gran variedad de enfermedades y que sirvan como base para la síntesis de nuevos fármacos. Dentro de las fuentes naturales más estudiadas se encuentran las algas y microalgas, siendo nichos de sustancias con actividad biológica verdaderamente aún inexplorados. Considerando lo antes expuesto, el presente trabajo explora el potencial antimicrobiano de la microalga *P. cruentum* y su efecto sobre diferentes cepas de microorganismos patógenos, así como en el impacto sobre la viabilidad celular de leucocitos humanos y murinos, y mediante la utilización de un modelo *in vitro* que permita explorar su no toxicidad, como es el sistema de estudio con *Artemia salina*.

##### 4.1 Cultivo de *Porphyridium cruentum*

En primer lugar se procedió al cultivo de la microalga *Porphyridium cruentum*, el cual se llevó a cabo utilizando un fotobiorreactor. El fotobiorreactor es considerado el corazón de todo proceso biotecnológico, ya que es donde se lleva a cabo el crecimiento celular, acompañado de los nutrientes específicos de cada especie. Su operación deberá garantizar la máxima transformación, por lo que su funcionamiento es de vital importancia en la rentabilidad de bioprocesos.

El comportamiento del cultivo de *P. cruentum* en el medio de cultivo Walnes, fue observado durante 12 días con mediciones diarias de Absorbancia a 545 nm, estos valores se muestran en la Tabla.4. Los datos obtenidos durante este tiempo fueron promediados y graficados para evaluar la curva de crecimiento de la microalga en estudio (Figura 10).

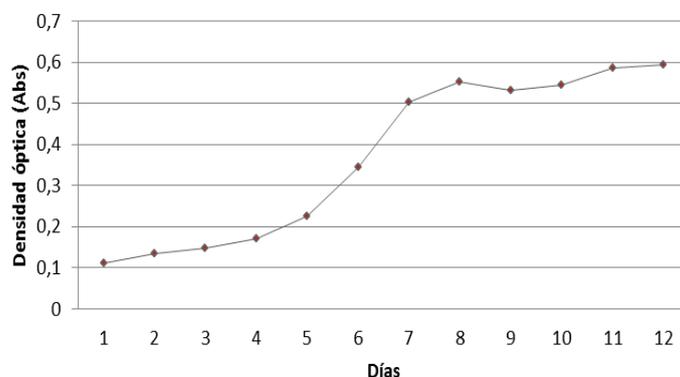
**Tabla. 4** Valores de Absorbancia en medio Walnes.

	Días											
Sistemas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0,143	0,167	0,177	0,178	0,214	0,376	0,492	0,565	0,561	0,568	0,589	0,598
2	0,100	0,172	0,181	0,213	0,222	0,302	0,420	0,489	0,527	0,545	0,548	0,609
3	0,080	0,100	0,118	0,164	0,237	0,313	0,516	0,542	0,501	0,523	0,586	0,592

La adaptación al medio de cultivo no se comportó de manera rápida durante los primeros cuatro días, su crecimiento fue lento lo cual no es muy beneficioso, pues esta adaptación debe ser alrededor de las 48 horas de iniciado el cultivo.

La fase de crecimiento exponencial o aceleración positiva comenzó a observarse al quinto día de cultivada la microalga, donde se observó un resultado importante, ya que evidencia un crecimiento celular con respecto a los niveles de producción al comienzo de los cultivos. Si se toma en cuenta que el conteo celular o la medición de Absorbancia son medidas de la producción de biomasa microalgal, podemos decir que a los cinco días los cultivos muestran un buen rendimiento. Esta fase fue solo de cuatro días lo cual desde el punto de vista productivo no es favorable; pues lo que se requiere es que las células alcancen la densidad máxima en un corto periodo de tiempo, siendo este uno de los principales requerimientos para apoyar el desarrollo de la industria de las microalgas, donde el cultivo de estas debe ser eficiente a gran escala. La tecnología del

cultivo está relacionada tanto con el diseño y configuración de los sistemas de cultivo abiertos o cerrados, así como con las condiciones operativas que conducen al equilibrio entre el crecimiento óptimo de las microalgas y la productividad.



**Fig. 10** Curva de crecimiento de *Porphyridium cruentum* en medio Walnes.

La etapa de crecimiento estacionario comenzó a partir del día ocho de iniciado el cultivo con una pequeña desaceleración en su crecimiento, que pudiera deberse al suministro de aire ya que el crecimiento de la microalga se comporta proporcionalmente a este, ya que los cultivos alcanzan densidades superiores a medida que este aumenta. Esta fase es de vital importancia en el cultivo de las microalgas, debido a que es el período donde se alcanza la máxima velocidad de crecimiento.

La adaptación de la microalga a un medio de cultivo artificial sugiere un proceso de desarrollo de investigación que establezca las condiciones óptimas para el desarrollo microalgal. Investigaciones a escala de laboratorio se han realizado en LABEX sobre el proceso de cultivo de esta microalga: crecimiento de *P. cruentum* bajo determinadas condiciones con diferentes medios de cultivo, velocidades de agitación y empleando agentes aceleradores del crecimiento como la zeolita y el campo magnético.

Con la utilización de bolsas desechables de 10 L el proceso de cultivo presentó algunos inconvenientes principalmente con la agitación, la alimentación al sistema del aire enriquecido con CO<sub>2</sub> y con la adherencia de las células a las paredes de las bolsas desechables, imposibilitando el apropiado crecimiento celular.

La recolección de microalgas o cosecha es una de las etapas claves del proceso. El éxito de esta etapa depende de varios factores entre ellos el tipo de microalga, el proceso productivo, la presencia de contaminantes, la velocidad de producción, entre otros factores, La biomasa es un producto que debe tratarse con rapidez para evitar su deterioro (Cervantes *et al.*, 2020).

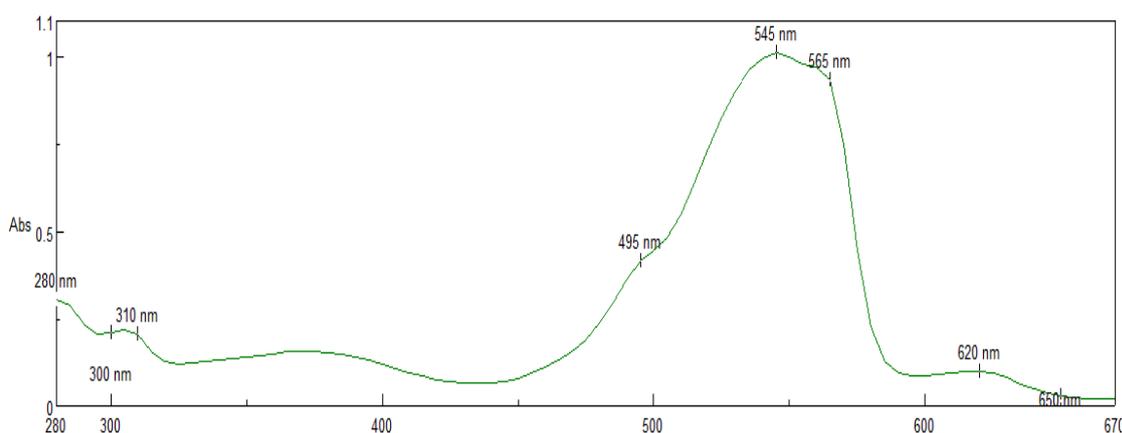
## 4.2 Caracterización de *Porphyridium cruentum*

### 4.2.1 Taxonómica

Considerando que la microalga presenta forma esférica, carece de pared celular organizada, las células de *P. cruentum* están encapsuladas en un complejo de polisacáridos sulfatados, teniendo en cuenta estos factores se realizó una caracterización taxonómica, donde se concluyó la autenticidad de la *P. cruentum*, donde su nombre correcto es *P. purpureum* (Anexo 1).

## 4.2.2 Química

La microalga *Porphyridium cruentum* ha demostrado ser eficiente en la producción de  $\beta$ -ficoeritrina, ya que se ha encontrado que esta especie produce grandes cantidades de esta proteína (Hernández míreles, 2006), por lo que llevar a cabo un barrido espectrofotométrico nos puede indicar la presencia de este compuesto químico en la microalga, además de otros métodos que nos pueden indicar con exactitud la composición química de *Porphyridium cruentum*. El barrido de las muestras de biomasa lisadas, obtenidas mediante la relación de absorbancias a estas longitudes de onda, (545nm /280nm), se obtuvo una pureza promedio de 4,7 lo cual está en correspondencia con lo reportado en la literatura (Hemlata *et al.*, 2018). En la figura 11 se muestra la curva de barrido obtenida.



**Fig. 11** Barrido espectrofotométrico biomasa de *Porphyridium cruentum* lisada.

Se observó la presencia de bandas que corresponden con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , y a través de la relación de Absorbancia  $545/280 > 4$ , se evidencia la presencia de las subunidades proteicas. Esta relación de pureza es un indicador de que puede ser utilizada como grado analítico (Rito-Palomares *et al.*, 2001). Sobre la base del espectro se puede observar la presencia de ficoeritrinas con un máximo a una longitud de onda de 545 nm, y un hombro a 495 nm, lo cual corresponde a la  $\beta$ -ficoeritrina, demostrando la presencia de esta ficobiliproteína en la biomasa utilizada.

## 4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro

Actualmente existe una alarmante preocupación frente al exponencial crecimiento de la resistencia antimicrobiana, frente a numerosos patógenos que afectan a la humanidad. La organización mundial de la salud, en el 2014, ya señaló que nos dirigimos hacia la era post-antibiótica ante la alarmante resistencia a los antibióticos (WHO, 2014). Muchos son los intentos desde diferentes campos para combatir esta resistencia. Uno de éstos, es el uso de fuentes naturales para la obtención de nuevos antibióticos eficaces contra microorganismos resistentes. La microalga *P. cruentum* ha recibido un especial interés, por sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antimicrobianas, además de inhibir el crecimiento de diferentes cepas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras y hongos (Abed *et al.*, 2009). A partir de esta información se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a hongos y parásitos. Atendiendo a que el uso excesivo e indiscriminado de los antibióticos, provoca la resistencia de

numerosos patógenos a estos, actualmente se intensifica la búsqueda de nuevos candidatos derivados de fuentes naturales.

#### 4.3.1 Obtención del extracto

Se realizó una ruptura y lisis de la biomasa, mezclando la misma con buffer acetato de sodio pH 5,5, en una proporción de 1g de biomasa húmeda (20 % biomasa seca) en 4 mL de buffer acetato de sodio 1 mol/L agitando, en un agitador magnético convencional (Polymix, Suecia) durante 50 minutos a 2,0 W de potencia, a temperatura de laboratorio, produciendo la lisis celular mediante choque osmótico. Luego se remueve el debris celular en una centrífuga refrigerada (SELECTA, España) a 25 °C y a una velocidad de 2 500 rpm, durante 15–25 min, obteniéndose un sólido que se desecha y un sobrenadante que se filtró posteriormente a través de un filtro con un diámetro de poro de 1,2 µm obteniéndose un extracto acuoso de la biomasa de *P. cruentum*.

#### 4.3.2 Actividad antiparasitaria

Dentro de los microorganismos con mayor incidencia en las infecciones que afectan los seres humanos se encuentran los hongos y los parásitos, los cuales al ser agentes intracelulares, dificultan su erradicación a través de los mecanismos inmunitarios y también por la acción de compuestos quimioterapéuticos.

Las infecciones ocasionadas por parásitos, hoy en día constituyen un problema serio en los sistemas de salud de numerosos países. Dentro de estas infecciones la *Leishmaniasis* (causada por *Leishmania* spp.), la enfermedad de Chagas (causada por *T. cruzi*) y la enfermedad del sueño africano (causada por *T. brucei* y *T. rhodensis*) presentan una alta morbimortalidad en regiones tropicales y subtropicales de América, África y Asia, y son clasificadas por la OMS como enfermedades negligenciadas o desatendidas. De ahí que la búsqueda de productos naturales como alternativa de tratamiento ha motivado el interés de la comunidad científica.

En la presente investigación se evaluó la actividad antiprotozoaria del extracto de la biomasa de *P. cruentum*, frente a las formas amastigotes (intracelular) de *L. infantum* y *T. cruzi* y las formas tripomastigotes (extracelular) de *T. brucei* y *T. rhodensis*.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana de la biomasa *Porphyridium cruentum*

Muestra	Actividad(IC50µg/mL)				
	<i>Candidaal bicans</i>	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Trypanosoma rhodensiense</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<b>Biomasa microalga</b>	>32	4.06±0.12	1.01±0.03	1.06±0.03	0.82±0.02

Compuestos de referencia: IC<sub>50</sub> (µM): Benznidazol, 1.66 (*T. cruzi*); Miltefosina, 4.54 (*L. inf.*); Suramina, 0.05 (*T. brucei.*); Suramina, 0.06 (*T. rhod.*); Flucytosine, 0.53 (*C.albicans*).

La biomasa de *P. cruentum* mostró buenos valores de actividad sobre los parásitos del género *Trypanosoma*: *T. brucei*, *T. rhodensiensis* y *T. cruzi*. La forma tripomastigote de *T. brucei* fue la más sensible frente al extracto total seguida por amastigotes de *T. rhodensis* y tripomastigotes de *T. cruzi*. Las formas amastigotes de *L. infantum* fueron también sensible al extracto con un CI<sub>50</sub> = 16,23 µg/mL.

En el caso del estudio frente a *L. infantum*, los resultados muestran un marcado efecto inhibitorio, pero por debajo de lo exhibido contra el género *Trypanosoma*, lo que denota una mayor sensibilidad por estos parásitos frente a componentes presentes en la biomasa de la microalga.

En el caso del efecto observado frente a la levadura *C. albicans*, uno de los patógenos responsables en la aparición de cuadros clínicos de candidiasis en humanos. Estas infecciones en ocasiones de difícil control, resultan comunes en el adulto mayor, en pacientes hospitalizados y en personas inmunodeprimidas. En la actualidad su tratamiento se complejiza debido a la aparición de resistencia a las alternativas terapéuticas, por lo que la búsqueda de nuevos productos naturales resultan de interés de la comunidad científica. Los exopolisacáridos presentes en *P. cruentum* muestran un gran potencial para lidiar con las biopelículas provocadas por *Candida albicans* (Aqil F. *et al.*, 2010). El estudio demostró que la microalga posee actividad frente a este hongo, aunque en valores superiores al grupo control (Tabla 2).

Los resultados alcanzados en el estudio sugieren que metabolitos activos presentes en la biomasa de *Porphyridium cruentum* son activos frente a patógenos intracelulares. Tanto los hongos como los parásitos son microorganismos difíciles de erradicar por el sistema inmune, ya que desarrollan diversos mecanismos de evasión a las respuestas inmunitarias que ayudan a la persistencia de estas infecciones y las complicaciones clínicas (Abbas *et al.*, 2012).

#### 4.3.3 Efecto sobre la viabilidad celular

Los ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular en cultivos celulares se utilizan en diversas investigaciones para evaluar la citotoxicidad o la inhibición del crecimiento de células normales y tumorales durante el desarrollo de productos de interés farmacológico. Estos ensayos tienen la ventaja de analizar un gran número de muestras, ser rápidos, a un costo reducido, potencial de automatización y además el uso de células humanas pueden ser más relevantes que las pruebas en animales *in vivo* (Aslantürk, 2018).

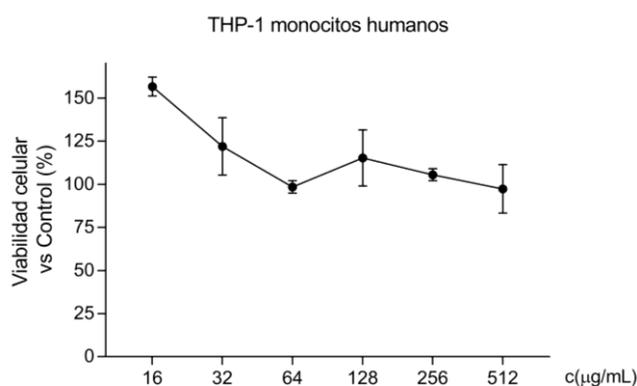
La determinación de la citotoxicidad sobre células hospederas es un criterio determinante para estimar la selectividad de la actividad farmacológica objeto de estudio. Diferentes líneas celulares son empleadas en función de la actividad a evaluar, el microorganismo, la sensibilidad y características específicas de cada línea.

Los macrófagos desarrollan la principal respuesta inmune frente a parásitos intracelulares, (Giudice A. *et al.*, 2007; Weinkopff T. *et al.*, 2013). Los mecanismos fagocíticos dependiente (especies reactivas del oxígeno y nitrógeno) e independiente del oxígeno (enzimas lisosomales) favorecen la eliminación de estos microorganismos (Montiel y Díaz, 2002; Stempin y Cerban, 2007). Sin embargo, algunos parásitos desarrollan mecanismos para evadir la respuesta defensiva de estas células y sobreviven en el interior del macrófago, derivando en la cronicidad de la infección y dificultades para su eliminación por agentes antimicrobianos. De ahí la importancia que los agentes antiparasitarios sean capaces de eliminar los parásitos sin afectar la viabilidad celular de estas poblaciones de monocitos-macrófagos

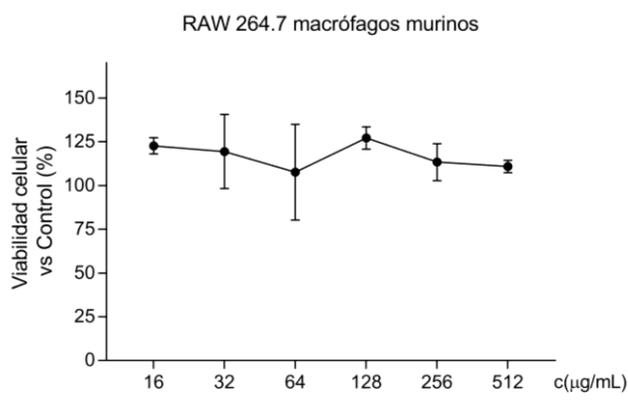
En tal sentido, se realizó en forma paralela el ensayo de viabilidad celular utilizando dos líneas de leucocitos, la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 y la línea monocítica humana THP-1. El estudio demostró que la biomasa de la microalga *P. cruentum* no afectó la viabilidad celular de estas células ( $CC_{50} > 512 \mu\text{g/mL}$ ), siendo

entonces selectiva frente a los parásitos seleccionados. En las siguientes figuras se muestra el efecto de la biomasa sobre estas líneas celulares.

Los polisacáridos presentes en la microalga pudieran sugerir que estos compuestos incrementan la actividad fagocítica y de secreción de otros mediadores en los macrófagos, específicamente la inducción o la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Abdala-Díaz *et al.*, 2010). Además, estos polisacáridos activos han demostrado también poseer actividad anti-proliferativa en varias líneas de células cancerígenas humanas (Berge JP., 2002) sin embargo estudios más profundos en modelos *in vivo* son necesarios para corroborar estos resultados.



**Fig. 12** Efecto de la biomasa de *P. cruentum* sobre la viabilidad celular de la línea celular THP-1



**Fig. 13** Efecto de la biomasa de *P. cruentum* sobre la viabilidad celular de macrófagos murinos RAW 264.7

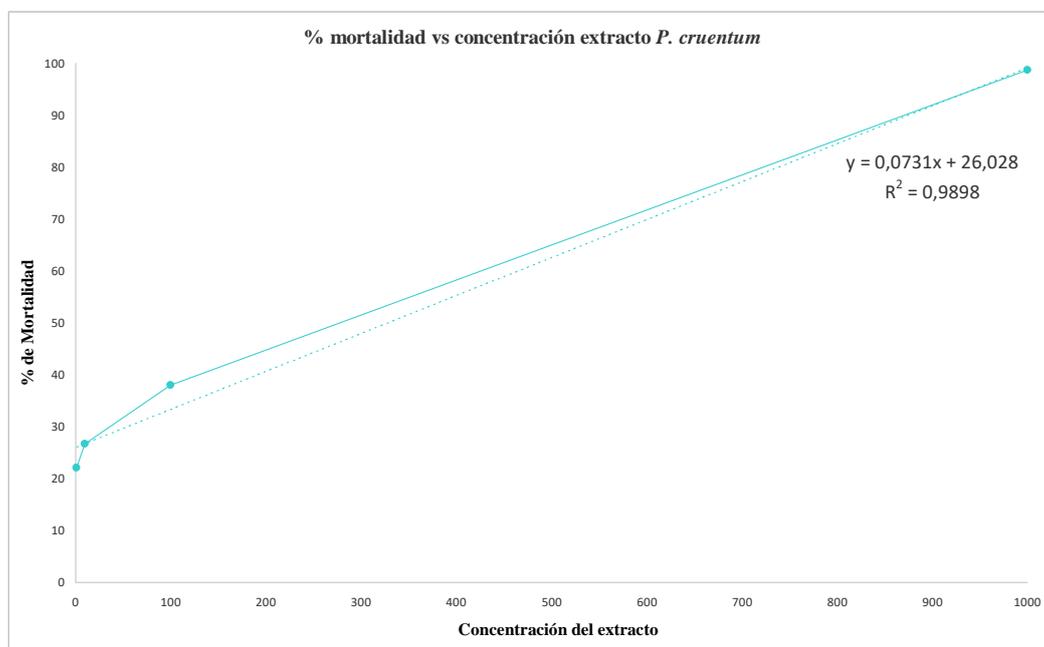
#### 4.3.4 Ensayo de toxicidad con *Artemia Salina* de la biomasa de *Porphyridium cruentum*

Adicionalmente, se tuvo en cuenta el efecto de la biomasa de *Porphyridium cruentum* sobre la viabilidad de *Artemia salina* como un ensayo indirecto de evaluación de la toxicidad de los compuestos activos presentes en la microalga. Las larvas de *Artemia salina* han sido utilizadas como un bioensayo en diferentes investigaciones y los resultados en la determinación de la  $CL_{50}$  han sido publicados tanto para una serie de toxinas animales, productos naturales y químicos conocidos, como aquellos derivados de las microalgas (Carballo *et al.*, 2002, Otieno *et al.*, 2021).

El ensayo de letalidad de larvas de *A. salina* ha sido utilizado con eficiencia para detectar componentes con acción citotóxica (Mackeen MM. *et al.*, 2000) y ha demostrado buena correlación al evaluar extractos de plantas con otras actividades biológicas o con la presencia de determinados componentes químicos. Estos hallazgos refuerzan la importancia de la utilización de este ensayo como prueba alternativa de toxicidad, donde reportan una clasificación de la toxicidad según el valor de la CL<sub>50</sub> del extracto. Aunque estas clasificaciones poseen variaciones entre sí, todas coinciden en agrupar los extractos con CL<sub>50</sub> inferiores a 100 µg/mL en las categorías de mayor toxicidad, mientras, los que muestran valores superiores a 1000 µg/mL se clasifican como no tóxicos (Valdés-Iglesias *et al.*, 2003).

Todos los parámetros medidos en el bioensayo se comportaron dentro de los rangos establecidos para este tipo de estudio. El pH se mantuvo en el rango de 7-8 y la temperatura se mantuvo entre 27-29 °C.

En los resultados de los bioensayos con *Artemia salina* se pudo observar la presencia de mortalidad significativa de los nauplios a la concentración de 100 y 1000 µg/mL. En la Figura 14 se observa el comportamiento de la mortalidad.



**Fig.14** Comportamiento de *Artemia salina* frente al extracto de la biomasa de *Porphyridium cruentum*.

Según el criterio de toxicidad mencionado anteriormente podemos señalar que la biomasa a esas concentraciones es moderadamente tóxica, frente a los crustáceos de *Artemia salina*.



**CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Al finalizar este trabajo y bajo las condiciones en la que se desarrolló el mismo se concluyó que:

1. La biomasa de *Porphyridium cruentum* mostró buenos valores de actividad sobre todo frente a parásitos del género *Trypanosoma*: *T. brucei*, *T. rhodesiensis* y *T. cruzi*. En el caso del estudio frente a *L. infantum*, los resultados muestran un marcado efecto inhibitorio, pero por debajo de lo exhibido contra el género *Trypanosoma*, lo que denota una mayor sensibilidad por estos parásitos frente a componentes presentes en la biomasa de la microalga.
2. El estudio demostró que la biomasa de la microalga *Porphyridium cruentum* no afectó la viabilidad celular de la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 y la línea monocítica humana THP-1 ( $CC_{50} > 512 \mu\text{g/mL}$ ), siendo entonces selectiva frente a los parásitos seleccionados.
3. La biomasa de *Porphyridium cruentum* a esas concentraciones es moderadamente tóxica, frente a los crustáceos de *Artemia Salina*.



**RECOMENDACIONES**

## RECOMENDACIONES

1. Continuar trabajando en la optimización del proceso de obtención de biomasa de *Porphyridium cruentum*.
2. Realizar una caracterización bioquímica de la biomasa de *Porphyridium cruentum*.



## ABREVIATURAS

## ABREVIATURAS

IAAS.....	Infecciones Asociadas a la Atención en Salud
AND.....	Ácido Desoxirribonucleico
FBP.....	Ficobiliproteínas
ARN.....	Ácido ribonucleico
RMN.....	Resonancia Magnética Nuclear
ESI-MS.....	Espectrometría de Masas
PBR .....	Fotobioreactores
OMS.....	Organización Mundial de Salud
CIES.....	Centro de Investigaciones de Energía Solar
UFC.....	Unidad Formadoras de Colonias
ATCC.....	American Type Culture Collection
DMEN.....	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
USD.....	Dólar estadounidense
RAM.....	Resistencia antimicrobiana
ESI-MS.....	Espectrometría de Masas
LABEX.....	Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales
IS.....	Índice de selectividad
CIP.....	Centro de Investigaciones Pesqueras
LED.....	Diodo Emisor de luz (light-emitting diode)



## BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

**Abalde, J., A. Cid, P. Fidalgo, E. Torres y C. Herrero.** Microalgas: cultivo y aplicaciones. Universidad da Coruña, Monografías N° 26, 1995; 210 p.

**Abbas, D., Ezzat, Y., Hamdy, E., & Gamil, M.** Angiotensin-converting enzyme (ACE) serum levels and gene polymorphism in Egyptian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2012; 103-110.

**Abdala-Díaz, RT, Chabrellón M., Cabello-Pasini A., López-Soler B., Figueroa FL.** Effect of *Porphyridium cruentum* polysaccharides on the activity of murine macrophage cell line RAW 264.7. *Ciencias Marinas*. 2010; 36(4): 345–353.

**Ación, F. G., Molina, E., Reis, A., Torzillo, G., Zittelli, G. C., Sepúlveda, C., & Masojídek, J.** Photobioreactors for the production of microalgae. In *Microalgae-based biofuels and bioproducts*. 2017 (pp. 1-44).

**Aqil F, Zahin M, Ahmad I, Owais M, Khan MSA, Bansal SS, Farooq S.** Antifungal activity of medicinal plant extracts and phytochemicals: A review. In *Combating Fungal Infections*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2010: 449-484 p.

**Aranda-Ventura, J., Villacrés-Vallejo, J., Núñez-Tuesta, L., Marín-Sisley, P., Nonato-Ramírez, L., & González-Aspajo, G.** Evaluación de la bioactividad de plantas medicinales cultivadas en el Perú usando la prueba de letalidad de *Artemia salina*. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*. 2018; 3(3), 132-137.

**Arencibia Carballo, G., Tizol Correa, R. A., & Rodríguez, R. O.** 2010. Toxicidad de nauplios de *Artemia franciscana* a dos piretroides de uso comercial.

**Arrieta, R., Daquino, B., Rosso, N., Ferreras, M. G., & Juárez, N.** Evaluación de una metodología de tamizaje en la enfermedad de Chagas en San Luis, Argentina. *Salud Pública de México*. 2004; 46(5), 430-437.

**Aslantürk, Ö. S.** In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity- A predictable risk to our actual World*. 2018; 2, 64-80.

**Barry, A.N., Starkenburg, S.R. & Sayre, R.** Strategies for optimizing algal biology for enhanced biomass production. *Adv. Algal Biofuels Res. Eval. Algal Biomass Prod. Convers. Methods into Fuels High Value Co-products*. 6. 2017.

**Begum, S., Johnson, W. E., Worthington, T., & Martin, R. A.** The influence of pH and fluid dynamics on the antibacterial efficacy of 45S5 Bioglass. *Biomedical Materials*. 2016; 11(1).

**Benavides J, Rito-Palomares M.** Bioprocess intensification: A potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *J. Chromatogr. B*. 2004; 807: 33–38.

**Bergé JP, Debiton E, Durand P, Barthomeuf C.** In vitro anti-inflammatory and anti-proliferative activity of sulfolipids from the red alga *Porphyridium cruentum*. *J. Agric. Food Chem*. 2002. 50:6227–6232.

**Bermejo R., Acién FG., Ibáñez MJ., Fernández JM.** Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *J. Chromatogr.* 2003; 790: 317–325.

**Bhattacharya, M., & Goswami, S.** Microalgae—A green multi-product biorefinery for future industrial prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 2020; 25.

**Blunt J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G. & Prinsep, M.R.** *Marine natural products.* *Nat. Prod. Rep.* 2017; 34:235–94.

**Brennan L. & Owende P.** Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 2010; 14: 557-577.

**Carballo, J. L., Hernández-Inda, Z. L., Pérez, P., & García-Grávalos, M. D.** A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC biotechnology.* 2002; 2(1), 1-5.

**Cervantes-Urieta, V. A., Pérez-Castro, D., Galeana-Parra, M. A., Ramírez-Fuentes, E., & Trujillo-Tapia, M. ().** Cultivo y composición bioquímica de diatomeas marinas (Bacillariophyta) de la Bahía de Santa Lucía, Acapulco, México. *Gayana. Botánica.* 2020, 77(1), 11-22.

**Contreras-Flores, Coral; Peña-Castro, Julián Mario; Flores-Cotera, Luis Bernardo; Cañizares-Villanueva, Rosa Olivia.** Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. 2003; 28 :( 8) 450-456.

**Cos P, Vlietinck AJ, Vanden D, Maesa L.** Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. *J. of Ethnopharma.* 2006; 106: 290-302.

**Cutié-Aragón Y, Bello-Fernández ZL, Pacheco-Pérez Y, Laffita-Matos R, Ochoa-Sánchez A.** Resistencia antimicrobiana en pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos de un hospital general. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta.* 2022; 47(2): e3035.

**D'Agnolo E, Rizzo R, Paoletti S, Murano E.** R-phycoerythrin from the red alga *Gracilaria longa*. *Phytochemistry.* 1994; 35: 693–696.

**Daneshvar, E., Zarrinmehr, M. J., Kousha, M., Hashtjin, A. M., Saratale, G. D., Maiti, A., Vithanage, M., y Bhatnagar, A. ().** Hexavalent chromium removal from water by microalgal -based materials: Adsorption, desorption and recovery studies. *Bioresource Technology.* 2019; 293.

**Das, N., & Chandran, P.** Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international,* 2011.

**Davoren, M., Ní Shúilleabháin, S., Halloran, J., Hartl, M. G. J., Sheehan, D., O'brien, N. M., & Mothersill, C.** A test battery approach for the ecotoxicological evaluation of estuarine sediments. *Ecotoxicology,* 2005; 14(7), 741-755.

**Desai, M. M., & Fisher, D. S.** Beneficial mutation–selection balance and the effect of linkage on positive selection. *Genetics.* 2007; 176(3), 1759-1798.

- Dineshbabu, G., Goswami, G., Kumar, R., Sinha, A., & Das, D.** Microalgae–nutritious, sustainable aqua-and animal feed source. *Journal of Functional Foods*, 2019 62.
- Eppink, M. H., Olivieri, G., Reith, H., Berg, C. V. D., Barbosa, M. J., & Wijffels, R. H.** From current algae products to future biorefinery practices: a review. *Biorefineries*. 2017; 99-123.
- Eriksen, N. T. Production of phycocyanin.** A pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008. doi:10.1007/s00253 – 008 – 1542 .
- Fan, H., Wang, K., Wang, C., Yu, F., He, X., Ma, J., & Li, X.** A comparative study on growth characters and nutrients removal from wastewater by two microalgae under optimized light regimes. *Environmental Technology & Innovation*, 2020; 19, 100849.
- Fernández, T. V., Suárez-Muñoz, M., Trebuch, L. M., Verbraak, P. J., & Van de Waal, D. B.** Toward an ecologically optimized N: P recovery from wastewater by microalgae. *Frontiers in microbiology*. 2017; 8, 1742.
- Fernández AC., Rosa MF., Fernandez CM., Borto lucci WC., Melo UZ., Siqueira VLD., Cortez DAG., Gonçalves JE, Linde GA., Gazim ZC.** Antimicrobial and antioxidant activities of the extract and fractions of tetradenia riparia (Hochst.) Codd (Lamiaceae) leaves from Brazil. *Curr Microbiol*. 2017; 74: 1453 - 1460.
- Fernández, G. J. J.; CARMONA, L. M. I.; SALVADOR, S. N.** Propiedades antimicrobianas de algas de importancia económica en Chile. *J. health med. sci.*, 2019; 5(2): 125-131.
- Fernández-Ruiz D, Pérez-Meneses Z, Cuevas-Pérez O, Quirós-Enríquez M, Barrios-Romero B, Dueñas-Pérez Y.** Utilización de antibióticos en una población del municipio Cienfuegos. *Medisur*. 2021, 19(1).
- García J.** 2004. Elementos de microbiología. Post-grado. Maestría en procesos Biotecnológicos. CIGB-CUJAE. C. Habana. Cuba.
- García-Mañas, F., Guzmán, J. L., Berenguel, M., & Acién, F. G.** Biomass estimation of an industrial raceway photobioreactor using an extended Kalman filter and a dynamic model for microalgae production. *Algal Research*. 2019; 37, 103-114.
- Geresh S, Arad S, Levy Ontman O, Zhang W, Tekoah Y, Glaser R.** Isolation and characterization of poly- and oligo-saccharides from the red microalga *Porphyridium* sp. *Carbohydr*. 2009; 344: 343–349
- Ginzberg, A., M. Cohen, U. A. Sod-Moriah, S. Shany, A. Rosenshtrauch y S. Arad.** Chikens fed with biom ass of the red microalgae *Porphyridium* sp. Have reduced blood cholesterol level and midified fatty acid composition in egg yolk. *Journal of Applied Phycology*. 2000; 12:325-330.
- Giudice A., Camada I., Leopoldo P., Pereira J. MB, Riley Lee W. et al.,** Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensisto* nitric oxide correlates with disease severity in tegumentary leishmaniasis . *BMC Infectious Diseases*. 2007. 7 (7).

**Gomez-Martin, A., Martinez-Fernandez, J., Ruttert, M., Heckmann, A., Winter, M., Placke, T., & Ramirez Rico, J.** Iron catalyzed graphitic carbon materials from biomass resources as anodes for lithiumion batteries. *Chem. Sus. Chem.* 2018; 11(16), 2776-2787.

**González J. M., Ávila Cuéllar A., Puerta Bula. J.C.** La respuesta inmunitaria adaptativa en la infección crónica por *Trypanosoma cruzi*. *Revista de la Academia Colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales.* 2017, Vol. 41, Nº. 161, 456-465.

**González Salas, R., Vidal del Río, M. M., & Pimienta Concepción, I.** Microalgas: ecología, repercusión en la salud y nutrición. *Universidad Y Sociedad*, 2021; 13(S3), 297-302. Recuperado a partir de <https://rus.ucf.edu/cu/index.php/rus/article/view/2481>

**González-Lozano, M. C., Mendez-Rodriguez, L. C., Maeda-Martinez, A. M., Murugan, G., & Vazquez-Botello, A.** Evaluation of toxicity of polluted marine sediments from Bahía Salina Cruz, México. *Journal of Environmental Science and Health, Part A.* 2010; 45(1), 121-127.

**Guedes, A. C., Amaro, H. M., Barbosa, C. R., Pereira, R. D., & Malcata, F. X. ().** Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and  $\alpha$ -linolenic acids for eventual dietary uses. *Food Research International.* 2011; 44 (9), 2721–2729.

**Guillén, J. B. M.** 2012. Bioprospección de la actividad antimicrobiana y biotóxica de extractos de cianobacterias y microalgas. TESIS.

**Gul, R., Jan, S. U., Faridullah, S., Sherani, S., & Jahan, N.** Preliminary phytochemical screening, quantitative analysis of alkaloids, and antioxidant activity of crude plant extracts from *Ephedra intermedia* indigenous to Balochistan. *The Scientific World Journal*, 2017.

**Guzmán-Murillo, M. y F. Ascencio.** Antiadhesive activity of sulphated exopolisaccharides of microalgae on attachment of red sore disease associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. *Applied Microbiology.* 2000; 12:273-476.

**Hansen, A., Treviño, Luis., Márquez, Henri., Villada, M., González, L., Guillén, R., & Hernández, A.** Atrazina: Un herbicida polémico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.* 2013.

**Harun, R., Singh, M., Forde, G. M., & Danquah, M. K.** Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and sustainable energy reviews.* 2010; 14(3), 1037-1047.

**Hemlata, Afreen S, Fatma T.** Extraction, purification and characterization of phycoerythrin from *Microchaete* and its biological activities. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2018; 13:84–89

**Hernández Marín, D. A.** 2015. Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios de plantas con actividad antimicrobiana contra microorganismos farmacorresistentes del grupo ESKAPE (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

**Hernandez-Mireles, T., & Rito-Palomares, M.** Improved recovery of B-phycoerythrin produced by the red microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of*

Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, *Environmental & Clean Technology*. 2006; 81(6), 989-996.

**Huleihel, M., & Isanu.** Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. *The Israel medical association journal: IMAJ*. 2002; 4(11 Suppl), 923-927.

**Jung, KA. Lim, S-R.; Kim, Y.; Park, JM.** Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. *Bioresour Technol*. 2013; 135: 182 -90.

**Kamalanathan, M., Pierangelini, M., Shearman, L. A., Gleadow, R., & Beardall, J.** Impacts of nitrogen and phosphorus starvation on the physiology of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*. 2016; 28(3), 1509-1520.

**Khajepour, F., Hosseini, S. A., Ghorbani Nasrabadi, R., & Markou, G.** Effect of light intensity and photoperiod on growth and biochemical composition of a local isolate of *Nostoc calcicola*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2015; 176(8), 2279-2289.

**Kirnev, P. C. S., Carvalho, J. C., Vandenberghe, L. P. S., Karp, S. G., & Soccol, C. R.** Technological mapping and trends in photobioreactors for the production of microalgae. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2020; 36(3), 1-9.

**Levasseur, W., Perré, P., & Pozzobon, V.** A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology advances*, 2020. 41.

**Mackeen MM, Ali AM, Lajis NH, Kawazu K, Hassan Z, Amran M, et al.** Antimicrobial, antioxidant, anti-tumourpromoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. Ex T. Anders. *J. Ethnopharmacol*. 2000; 72:395-402.

**Marín-Prida, J., Llopiz-Arzuaga, A., Pavón, N., Pentón-Rol, G., & Pardo-Andreu, G. L.** Aplicaciones de la C-Ficocianina: Métodos de obtención y propiedades farmacológicas/Applications of C-Phycocyanin: Methods of purification and pharmacological properties. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*. 2015; 1(1).

**Maroneze Manzoni M. \*, Montenegro Herrera C. A., Martínez Jiménez A.** Insights into microalgae culture systems: A critical review. *Rev. Biotecnología*. 2021, Vol. 25 No. 5.

**Martínez Guillén, J. B.** 2012. Bioprospección de la actividad antimicrobiana y biotóxica de extractos de cianobacterias y microalgas. Tesis. Baja California, México.

**Martínez S.** 2005. Alternativa de cultivo incrementado para el aumento de rendimiento de biomasa en la fermentación de *Estreptoquinasa*. Tesis de Maestría. CUJAE. C. Habana. Cuba

**Mesa Villanueva, M. C.** 2010. Estudio de la respuesta inmune humana mediada por linfocitos T contra rotavirus.

**Mobin, S. M., Chowdhury, H., & Alam, F.** Commercially important bioproducts from microalgae and their current applications—A review. *Energy Procedia*, 2019; 160, 752-760.

**MORALES - SANCHEZ, D. et al.** Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2015; v. 31, n. 1, p. 1 – 9.

**Morris, H., et al.** Cinética de crecimiento y producción de polisacáridos por la microalga *Porphyridium cruentum* (Rhodophyta, Porphyridiaceae ) en condiciones de radiación solar difusa. *Tecnología Química*. 2004, 24 (1), 73 - 78.

**Mudimu, O., Rybalka, N., Bauersachs, T., Born, J., Friedl, T., & Schulz, R.** Biotechnological screening of microalgal and cyanobacterial strains for biogas production and antibacterial and antifungal effects. *Metabolites*. 2014; 4(2), 373-393.

**Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R., Bhattacharya, S., Bachani, P., & Mishra, S.** Comparative evaluation of chemical and enzymatic saccharification of mixotrophically grown de-oiled microalgal biomass for reducing sugar production. *Bioresource Technology*. 2016; 204, 9 – 16.

**Pardo-Plaza, Y. J., Paolini Gómez, J. E., & Cantero-Guevara, M. E. ()**. Biomasa microbiana y respiración basal del suelo bajo sistemas agroforestales con cultivos de café. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*. 2019; 22(1).

**Pérez, L. D., Pérez, Y. S., Ortega, A. R., & Novelles, M. D. C. T.** Actualidad y perspectivas de los antimicrobianos naturales. *Revista Cubana de Farmacia*. 2021; 54(3).

**Perin, G., & Jones, P. R.** Economic feasibility and long-term sustainability criteria on the path to enable a transition from fossil fuels to biofuels. *Current opinion in biotechnology*, 2019. **57**, 175-182.

**Pompilho, W. M., Marcondes, H. C., & Oliveira, T. T.** Bioatividade de três espécies vegetais nativas da Floresta Atlântica brasileira frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2014; 16, 473-480.

**Qiu M, Cao D, Gao Y, Li S, Zhu J, Yang B, et al.** New clerodane diterpenoids from *Croton crassifolius*. *Fitoterapia*. 2016; 108: 81-6.

**Quevedo, H. J. M., Manrique, C. E. M., Díaz, R. T. A., & Pupo, G. C.** Evidencias preliminares de la actividad inmunomoduladora de la fracción polisacárida de origen marino PC-1. *Rev Cubana Oncol*. 2000; 16(3), 171-6.

**Ramirez, L. S., & Castaño, D. M.** Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et técnica*. 2009; 15(42), 263-268.

**Ramírez-Mérida, L. G., de Menezes, C. R., Zepka, L. Q., & Jacob-Lopes, E.** Microalgas: potencial para la producción de compuestos bioactivos nanoencapsulados. *Ciência e Natura*. 2015; 37(5), 7-17.

**Ramírez-Mérida, L. G., Ragagnin de Menezes, C., Queiroz Zepka, L. J.** Microalgas: potencial para la producción de compuestos bioactivos nanoencapsulados. *Ciencia e Natura*. 2015, 37(5), 7-17.

- Rozema, J., Bjorn, L. O., Bornman, J. F., Gaberšček, A., Häder, D. P., Trošt, T. & Meijkamp, B. B.** The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems and experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2002; **66**(1), 2-12.
- Ruiz-García, A., Arranz-Martínez, E., García-Álvarez, J. C., García-Fernández, M. E., Palacios-Martínez, D., Montero-Costa, A., & Vieira-Pascual, M. C.** Prevalencia de diabetes mellitus en el ámbito de la atención primaria española y su asociación con factores de riesgo cardiovascular y enfermedades cardiovasculares. Estudio SIMETAP-DM. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. 2020; 32(1), 15-26.
- Sánchez-Saavedra M. del Pilar, Licea-Navarro M., A. & Bernáldez-Sarabia, J.** Evaluation of the antibacterial activity of different species of phytoplankton. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 2010; 45(3), 531-536.
- Schepetkin, I. A., & Quinn, M. T.** Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International immunopharmacology*, 2006; 6(3), 317-333.
- Souza GSd, Bonilla OH, Lucena EMPd, Barbosa YP.** Chemical composition and yield of essential oil from three Croton species. *Cienc Rural*. 2017; 47(8): 1-8.
- Stempin C. C., Cerban M. F.** Macrófagos e inducción de arginasa como mecanismo de evasión de parásitos medicina.2007; 67: 737-746.
- Stengel, D. B., & Connan, S.** Marine algae: A source of biomass for biotechnological applications. In *Natural products from marine alga*. 2015 (pp. 1-37). Humana Press, New York, NY.
- Suleria, H. A. R., Gobe, G., Masci, P., & Osborne, S. A.** Marine bioactive compounds and health promoting perspectives; innovation pathways for drug discovery. *Trends in Food Science & Technology*. 2016; 50, 44-55.
- Tannin-Spitz, T., Bergman, M., Van-Moppes, D., Grossman, S., & Arad, S. M.** Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *Journal of Applied Phycology*, 2005; 17(3), 215-222.
- Valdés-Iglesias O, Díaz N, Cabranes Y, Acevedo ME, Areces AJ, Graña L, et al.** Macroalgas de la plataforma insular cubana como fuente de extractos bioactivos. *Avicennia*. 2003; 16:36-45.
- Weinkopff T., Mariotto A., TACCHINI-COTTIER F., et al.,** Role of Toll-like receptor 9 signaling in experimental *Leishmania braziliensis* infection. *Infection and immunity*. 2013, 81, 1575-1584.
- Zeng X, X Guo, G Su, MK Danquah, S Zhang, Y Lu, Y Sun & L Lin.** Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015; 42: 1385-1392.



***ANEXOS***

**C E A C**

*... un puente al desarrollo sostenible*

---

**REPORTE FINAL:** No 10/2011

**TTULO: Identificación de microalgas.**

Contrato: No. CS 16/2011

Julio/2011

**Cliente:** Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales. Centro de Inmunología Molecular.

**Confeccionado por:** Dr. Augusto Abilio Comas González, División de Gestión Ambiental, Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos, CITMA.

### **Introducción:**

Dada la importancia biotecnológica de las especies del género *Porphyridium* NÄGELI 1849 (Bangiales, Rhodophyceae, Rhodophyta), el Cliente solicitó nuestros servicios para la identificación de una cepa determinada como *P. cruentum* (GRAY) NÄG., para lo cual entregó los materiales de acuerdo con las especificaciones requeridas.

### **Metodología:**

El material facilitado por el Cliente consistía en seis frascos, cuatro contenían el cultivo vivo (uno sobre agar y tres en suspensión). Los otros dos frascos eran muestras líquidas. Antes de su estudio, las muestras se mantuvieron cubiertas con papel de aluminio dentro de un refrigerador (aprox. 4°C).

La observación y estudio se realizó en las muestras de cultivo en suspensión en un microscopio Laborlux, Leica-Leitz. Para las mediciones se usó una escala micrométrica calibrada con una platina Carl Zeiss de 0,01 mm para los distintos objetivos utilizados (40 y 100X). Se obtuvieron microfotos con una cámara digital Samsung, provisoriamente acoplada al microscopio.

### **Desarrollo:**

Observación de los cultivos.- A simple vista se apreció la composición mucosa y la coloración rojo púrpura, típicos de los cultivos de *Porphyridium purpureum* (otras especies del género presentan una coloración diferente).

Las observaciones al microscopio confirmaron la identidad de *P. purpureum* (BORY) DREW et ROSS (= *P. cruentum* (GRAY) NÄG.), teniendo en cuenta los caracteres siguientes:

**Colonias mucilaginosas formadas básicamente por subgrupos de pocas células que dado a las condiciones de cultivo se extendían de manera difusa; células esferoidales hasta esféricas de 5,3-(7,5)-12,8 µm de diámetro de color rojo púrpura o rojo pardo, a veces gris plateado en los bordes externos de los cromoplastidios, cada célula o grupos de células rodeadas de un amplio mucílago. Cromoplastidio axial, que por las condiciones de cultivo puede extenderse hasta los márgenes internos de las células, po leve o conspicuamente lobulado hacia esos márgenes, con un pirenoide central, a veces poco visible. (Figs. 1-5)**

En los cultivos aparece como contaminante *Chlorella vulgaris* BEIJ. (Chlorellales, Trebouxiophyceae)(Figs.6-7).

### **Conclusiones:**

Esta especie era conocida como *P. cruentum* (GRAY) NÄG. 1849; pero de acuerdo con DREW & ROSS (1965) y STARMACH (1977) el nombre correcto es *Porphyridium purpureum* (BORY) DREW et ROSS 1965 (Bangiales, Rhodophyceae, Rhodophyta).

De acuerdo con el Cliente, la cepa procede de la Colección de Organismos Autotróficos de Třeboň, República Checa. En esta colección (LUKÁVSKY et al., 1992) aparecen dos cepas:

- 1- No.415- VISCHER 1925/107. Loc. Desconocida (determinada como *P. cruentum*).
- 2- No. 416- **PRINGSHEIM/GÖTT. 1380-1e.** Loc.: Holanda, Amsterdam (determinada como *P. purpureum* y presente también en las Colecciones **SAUG 1380-1e** y **UTEX 637** (en esta última sub *Porphyridium* sp.)..

## Referencias:

DREW, K.M. & R. ROSS (1965): Some generic names in the Bangiophycideae.-  
**Taxon** 14: 93-99.

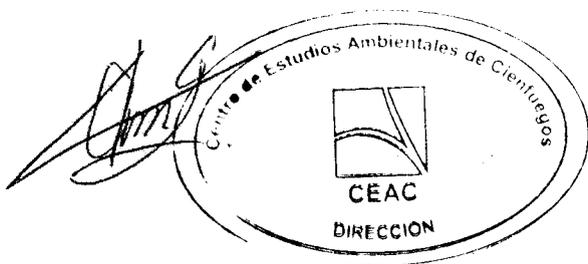
LUKÁVSKY, J., V. CEPÁK, J. KOMÁREK, M. KAŠPÁRKOVÁ & M. TAKÁČOVÁ (1992):  
Catalogue of algae and cyanobacterial strains of Culture Collection of  
Autotrophic Organisms of Třeboň.-

**Arch. Hydrobiol.** Suppl.91, **Algolog. Stud.** 63: 59-112.

STARMACH, K. (1977): **Phaeophyta, Rhodophyta**. En: STARMACH, K. & J.  
SIEMINSKA (eds.):

**Flora Słodkowodna Polski**.- Państwowe Wydaw. Nauk., Warszawa-Króków, Vol.  
14, 445 pp.

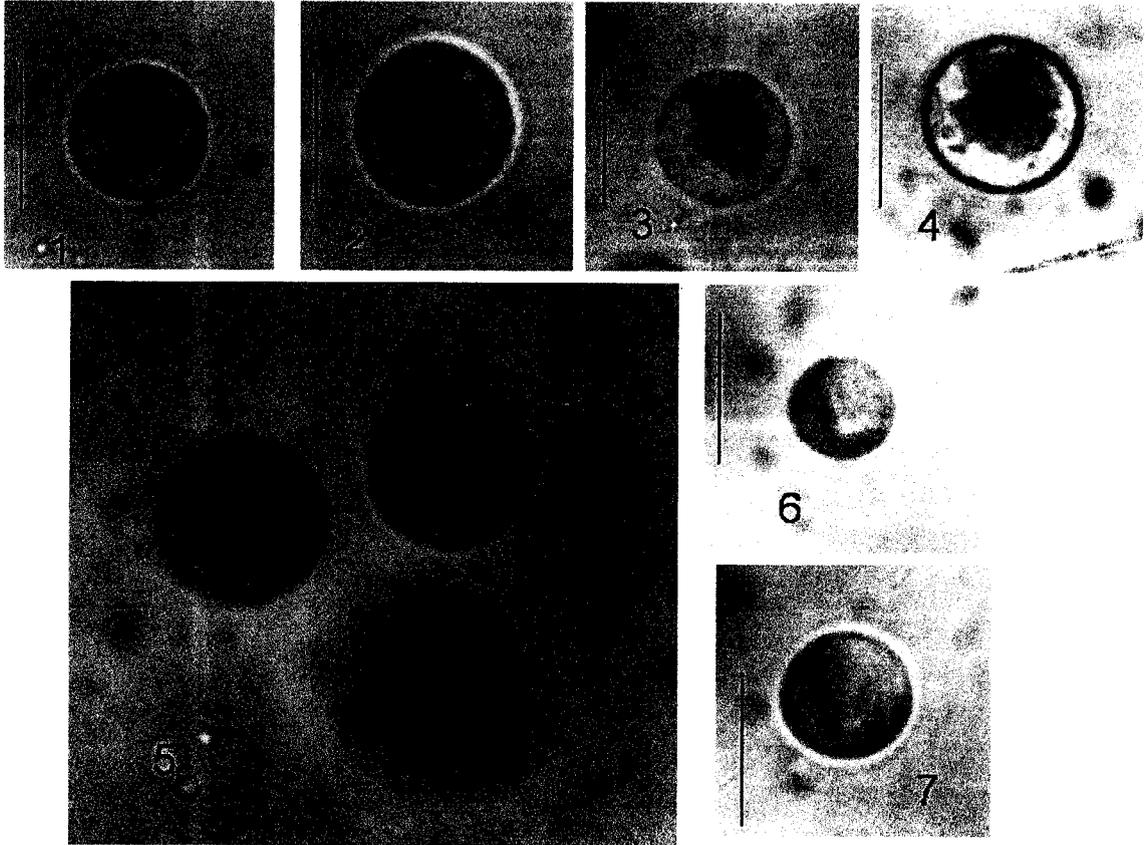
Confecionado por:



**Dr. Augusto Abilio Comas González**

**Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos,**

**CTMA. Cienfuegos.**



Figs. 1-7: 1-5) *Porphyridium purpureum*; 6-7) *Chlorella vulgaris*. Barra= 10 $\mu$ m.