

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOCAMPUESTOS CON
ACTIVIDAD ANTITUMORAL PRODUCIDOS POR LA MICROALGA

Chlorella sorokiniana

Por

Saúl Orlando Fernández Valenzuela

Como requisito parcial para obtener el Grado de

MÁSTER EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA
APLICADA

Enero, 2022

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOCAMPUESTOS CON
ACTIVIDAD ANTITUMORAL PRODUCIDOS POR LA MICROALGA *Chlorella*
sorokiniana.

Comité de tesis.



Director: Dr. Gustavo Raúl Reyna Martínez

Director: Dr. Ulrico López Chuken

Presidente

Secretario

Vocal

Vocal

Vocal

RESUMEN

Lic. Saúl Orlando Fernández Valenzuela
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Nuevo León

Enero 2022

Título del estudio: Producción y caracterización de biocompuestos con actividad antitumoral producidos por la microalga *Chlorella sorokiniana*.

Número de páginas: 64

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada.

Área de estudio:

Propósito y método de estudio: El objetivo de la investigación es producir y caracterizar biocompuestos usando la microalga *Chlorella sorokiniana* (cepa autóctona del Estado de Nuevo León) bajo condiciones de cultivo mixotróficas y evaluar su efecto antitumoral contra las líneas celulares humanas de cáncer MCF-7 y HT29.

Contribuciones y conclusiones: Se produjeron biocompuestos que presentaron actividad citotóxica contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7, incluida la isoramnetina 3-glucósido-7-ramnósido, previamente no reportada para la especie *Chlorella sorokiniana*, los cuales lograron una reducción de la viabilidad celular a una concentración de 500 µg/mL en más de un 70%. Al fraccionarse el extracto metanólico se pierde la actividad biológica del mismo. Esta pérdida de la actividad biológica se atribuye a que la acción observada es producto de la acción sinérgica de los compuestos que conforman el extracto y no de uno en particular.

FIRMA DEL ASESOR:



Dr. Gustavo Raúl Reyna Martínez

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) de la Facultad de Ciencias Químicas y en la Unidad de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas de la Facultad de Ciencias Biológicas, dichas unidades de investigación se encuentran en las instalaciones de Ciudad Universitaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se otorgó una beca por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de becario 1011553.

DEDICATORIA

A mi familia, en especial a mis padres y a mi compañera de vida.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Doctor Gustavo Raúl Reyna Martínez y al Doctor Ulrico Javier López quienes fungieron como mis asesores de tesis y en todo momento proporcionaron su apoyo incondicional para llevar a cabo este trabajo de investigación, así como a las Doctoras María Elena Cantú, Alcione García González, Melissa Marlene Rodríguez y al Dr, Xristo Zarate Kalfópulos por haber formado parte del comité de tesis y haber aportado siempre valiosas sugerencias y revisiones del presente trabajo.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. por las facilidades del uso de sus instalaciones durante parte de la transición de Laboratorio, en especial al Dr. Alonso y al MsC. Ricardo que me brindaron su apoyo en todo momento.

A la Dra. María del Rayo Camacho Corona quien nos ayudó en la identificación de los compuestos presentes en el extracto y en las fracciones. Sin su ayuda la tesis no hubiese concluido.

A Karina y a Ricardo de la secretaría de posgrado por ser siempre tan atentos, amables y apoyarnos en todos los trámites escolares.

A CONACYT por la beca otorgada que me sirvió para sustentarme como único ingreso durante los dos años del proyecto.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio quienes hicieron mi estancia amena y placentera durante estos años en la Facultad de Ciencias Químicas.

A mi familia, quien siempre ha brindado todo de su parte para mi desarrollo profesional y que han hecho posible la realización de esta meta,

A mi compañera de batalla. Sin ti no lo hubiese logrado.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
TABLA DE CONTENIDO	7
Lista de Figuras.....	9
Lista de tablas	11
CAPÍTULO 1	14
INTRODUCCIÓN.....	14
CAPÍTULO 2	16
ANTECEDENTES.....	16
2.1 Microalgas	16
2.2 <i>Chlorella sorokiniana</i>	17
2.3 Empleo de <i>Chlorella sorokiniana</i> para la producción de biomoléculas con actividad antitumoral.	18
2.4 Compuestos carotenoides.....	20
2.4.1 Ruta del metileritritol fosfato.....	22
2.4.2 Biosíntesis de carotenoides y xantofilas.....	23
2.5 Cáncer y actividad anticancerígena	25
2.6. Líneas celulares	28
2.6.1 HT29	28
2.6.2 MCF7.....	28
2.6.3 Vero	28
2.6.4 L5178Y-R.....	29
CAPÍTULO 3	30
3.1 Hipótesis.....	30
3.2 Objetivo general.....	30
4.3 Objetivos específicos	30
CAPÍTULO 4	31
METODOLOGÍA	31
4.1 Reactivación de la cepa <i>Chlorella sorokiniana</i>	31
4.2 Crioconservación	31
4.3 Producción de la biomasa de <i>Chlorella sorokiniana</i> bajo condiciones mixotróficas.....	32
4.3.1 Monitoreo de la producción	32

4.4 Obtención del extracto metanólico (EM)	33
4.5 Evaluación de la actividad citotóxica <i>in vitro</i> del extracto metanólico contra las líneas celulares MCF-7, HT29, Vero y L5178Y-R	34
4.6 Obtención de las fracciones del Extracto Metanólico	35
4.6.1 Selección de disolventes	35
4.6.2 Cromatografía en columna	35
4.6.3 Cromatografía en capa fina	35
4.7 Evaluación de la actividad citotóxica <i>in vitro</i> de las fracciones del extracto metanólico contra la línea celular MCF-7.....	36
4.8 Elucidación de la composición química del extracto metanólico y de las fracciones.	36
CAPÍTULO 5	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
5.1 Reactivación y crioconservación de la cepa <i>Chlorella sorokiniana</i>	37
5.2 Producción de la biomasa de <i>Chlorella sorokiniana</i> bajo condiciones mixotróficas.....	40
5.3 Obtención del extracto metanólico.....	41
5.4 Evaluación de la actividad citotóxica <i>in vitro</i> del extracto metanólico contra las líneas celulares MCF-7, HT29, Vero y L5178Y-R	43
5.5 Obtención de las fracciones del Extracto Metanólico.....	47
5.6 Evaluación de la actividad citotóxica <i>in vitro</i> de las fracciones del extracto metanólico contra la línea celular MCF-7.....	48
5.7 Compuestos identificados del extracto metanólico mediante la técnica cromatográfica UPLC MS.....	52
5.7.1 Ácido Elaguico Acetil Xilósido	54
5.7.2 Hidrato de Catequina.....	54
5.7.3 Cianidina	55
5.7.4 Fitoflueno	56
5.7.5 Astaxantina y Antheraxantina	57
5.7.6 Isoramnetina 3-glucósido-7-ramnósido	57
5.8 Compuestos identificados de las fracciones mediante la técnica cromatográfica UPLC MS	59
5.8.1 Beta-Sitosterol.....	61
CAPÍTULO 6	63
CONCLUSIONES.....	63
PERSPECTIVAS.....	64
REFERENCIAS.....	65

Lista de figuras

Figura	Página
1. Ruta metabólica del metileritritol fosfato.....	23
2. Ciclación del licopeno.....	24
3. Biosíntesis de xantofilas por oxigenación de α y β - carotenos.....	25
4. Valor estimado del número de muertes y casos de incidencias por tipo de cáncer a nivel mundial.....	26
5. Valor estimado del número de muertes y casos de incidencias por tipo de cáncer para el Continente Americano.....	27
6. Crecimiento de la cepa <i>C. sorokiniana</i> en condiciones de fotoautotrofia.....	37
7. Crecimiento de <i>C. sorokiniana</i> mostrado después de la criopreservación con DMSO al 10%.....	38
8. Crecimiento de <i>C. sorokiniana</i> en condiciones de mixotrofia.....	40
9. Valores de citotoxicidad obtenidos al enfrentar el EM contra la línea celular MCF7.....	44
10. Valores de citotoxicidad obtenidos al enfrentar el EM contra la línea celular HT29	45
11. Valores de citotoxicidad obtenidos al enfrentar el EM contra la línea celular Vero.....	46
12. Valores de citotoxicidad obtenidos al enfrentar el EM contra la línea celular L5178-R.	46
13. Fracciones obtenidas del EM empleando Acetato de etilo y n-hexano 1:1.....	47
14. Enfrentamiento de la Fracción 1 del EM contra la línea celular MCF-7.....	50
15. Enfrentamiento de la Fracción 2 del EM contra la línea celular MCF-7.....	50
16. Enfrentamiento de la Fracción 3 del EM contra la línea celular MCF-7.	50

17. Enfrentamiento de la Fracción 4 del EM contra la línea celular	
MCF-7.	51
18. Enfrentamiento de la Fracción 5 del EM contra la línea celular	
MCF-7.....	51
19. Enfrentamiento de la Fracción 6 del EM contra la línea celular	
MCF-7.	51

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Descripción de las líneas celulares HT29, MCF7, Vero y L5178Y-R.....	29
2. Compuestos detectados en el EM de <i>Chlorella sorokiniana</i>	52
3. Compuestos detectados en las fracciones de <i>Chlorella sorokiniana</i>	59

RESUMEN

Las microalgas son organismos autótrofos, fotosintéticos, generalmente unicelulares que han demostrado una gran fuente sustentable de compuestos tales como pigmentos, lactonas, polisacáridos sulfatados, proteínas y lípidos; los cuales han presentado actividad biológica *in vitro* e *in vivo* en contra de distintas líneas celulares de cáncer. Se estima que existen más de 200,000 especies, sin embargo, se han identificado alrededor de 40,000. Las microalgas nativas del estado de Nuevo León han sido poco estudiadas y representan una fuente no explotada de nuevas moléculas de interés farmacéutico. Por otro lado, el cáncer es la segunda causa de muerte en América y se estima que cada año 2,9 millones de personas son diagnosticadas y 1,3 millones mueren por esta enfermedad. El tratamiento del cáncer requiere una cuidadosa selección de una o más modalidades terapéuticas tales como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Debido a que son procedimientos altamente invasivos y producen efectos secundarios muy dañinos para el paciente, constantemente se están buscando nuevas opciones farmacológicas de tratamiento. En el presente estudio se determinó la actividad citotóxica *in vitro* en contra de las líneas celulares HT29, MCF7, L5178Y-R y Vero, del extracto metanólico crudo obtenido de la biomasa de la microalga *Chlorella sorokiniana* aislada en el estado de Nuevo León, obteniendo resultados positivos para línea celular MCF7 y confirmando la citotoxicidad del extracto ante L5178Y-R previamente reportado, también se logró elucidar la composición de dicho extracto en el cual se confirmó la presencia de compuestos que no habían sido reportados previamente producidos por el género *Chlorella* tal como la isorhamnetina 3-glucósido-7-ramnósido, previamente no reportada para la especie *Chlorella sorokiniana*. Con esto contribuimos al conocimiento de la biodiversidad y potencial terapéutico de las microalgas presentes en el estado de Nuevo León.

Palabras Clave: Microalgas, *Chlorella sorokiniana*, Biocompuestos, Citotoxicidad, Cáncer, Adenocarcinoma, Isorhamnetina 3-glucósido-7-ramnósido.

ABSTRACT

Microalgae are autotrophic, photosynthetic, unicellular organisms that produce a great sustainable source of compounds such as pigments, lactones, sulfated polysaccharides, proteins and lipids; which have shown biological activity *in vitro* and *in vivo* against different cancer cell lines. It is estimated that there are more than 200,000 species, however, only about 40,000 have been identified. The native microalgae of the state of Nuevo León have been little studied and represent an unexploited source of new molecules of pharmaceutical interest. On the other hand, cancer is the second leading cause of death in America and it is estimated that every year 2.9 million people are diagnosed and 1.3 million die from this disease. Cancer treatment requires careful selection of one or more therapeutic modalities such as surgery, radiation therapy and chemotherapy. Because these are highly invasive procedures and produce very harmful side effects for the patient, new pharmacological treatment options are constantly being sought. In the present study we determined the *in vitro* cytotoxic activity against HT29, MCF7, L5178Y-R and Vero cell lines, of the crude methanolic extract obtained from the biomass of the microalga *Chlorella sorokiniana* present in the state of Nuevo León, obtaining positive results for MCF7 cell line and confirming the cytotoxicity of the extract against L5178Y-R previously reported, also we manage to elucidate the composition of the extract which showed presence of compounds that to our knowledge did not been reported as produced by the genus *Chlorella* such as isorhamnetin 3-glucoside-7-ramnoside, previously unreported for *Chlorella sorokiniana* species. With this, we contribute to the knowledge of the biodiversity and therapeutic potential of the microalgae present in the state of Nuevo León.

Keywords: Microalgae, *Chlorella sorokiniana*, Compounds,, Cytotoxicity, Cancer, Murine lymphoma, Adenocarcinoma, Isorhamnetine 3-Glucoside-7-Ramnosido.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Las microalgas representan una fuente prometedora de materias primas para la obtención sustentable de biocombustibles, complementos nutricionales y biomoléculas con alto valor agregado (Pérez *et al.* 2015). En la actualidad los complementos nutricionales producidos por microalgas constituyen un mercado importante en el cual compuestos como los β -carotenos, astaxantinas, ácidos grasos poli-insaturados y polisacáridos exhiben alta demanda (Hudek *et al.* 2014; Pérez *et al.* 2015). Los lípidos microalgales se relacionan con la producción de biocombustibles como el biodiesel, el cual es una interesante alternativa biodegradable que produce menos emisiones de gases con efecto invernadero (Rubio *et al.* 2013, Nancuda, 2015). Las biomoléculas con alto valor agregado para la industria farmacéutica generalmente son carotenoides, flavonoides, vitaminas, proteínas, lipopéptidos, aminoácidos, ácidos grasos, macrólidos, amidas y polisacáridos sulfatados (Encarnacao *et al.* 2015; Talero *et al.* 2015; Intan *et al.* 2018). Estos biocompuestos pueden actuar como agentes antiproliferativos, antivirales, antifúngicos o antibacterianos y se encuentran tanto en el interior, como en el exterior celular (Chowdhury *et al.* 2015; Intan *et al.* 2018).

La simplicidad del cultivo de estos microorganismos representa una gran ventaja para la producción de cualquier biocompuesto. Una de las microalgas más empleadas por su versatilidad de cultivo y por su potencial de escalamiento es *Chlorella sorokiniana* (Lizzul *et al.* 2018). Este organismo ha demostrado una gran capacidad para obtención de biodiesel y otros biocompuestos de alto valor agregado, que son de alta demanda en la industria alimentaria y farmacéutica (Talero *et al.* 2015). Su alto rendimiento de biomasa, así como, su estabilidad en producciones a escala industrial en fotobiorreactores, la han convertido en una especie atractiva para la obtención de biocompuestos mediante diferentes procesos biotecnológicos.

En el Estado de Nuevo León son escasos los estudios con especies de microalgas nativas, más aún con aquellas productoras de biocompuestos con alguna actividad biológica. Por otro lado, es conocida la resistencia a muchos fármacos que se utilizan para el tratamiento del cáncer y los efectos secundarios que producen. En tal sentido,

la industria farmacéutica se encuentra en una constante búsqueda de nuevas moléculas con actividad biológica que puedan utilizarse como fármacos de nueva generación.

Es debido a lo anteriormente planteado, que en el presente trabajo se pretende caracterizar biocompuestos producidos por la microalga *Chlorella sorokiniana* (cepa autóctona del Estado de Nuevo León) bajo condiciones de cultivo mixotróficas y evaluar su efecto antitumoral contra líneas celulares humanas de cáncer MCF-7 y HT29.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES.

2.1 Microalgas

Las microalgas son organismos microscópicos unicelulares que carecen de raíces, tallos, hojas y presentan como principal pigmento fotosintético: clorofila a (Maldonado, 2011; Palacio, 2015). Estos microorganismos presentan diferentes tipos de organización celular, ya sea unicelular, colonial o filamentosa (Gómez, 2015). Habitan generalmente los ecosistemas acuáticos, pero pueden encontrarse en suelos, rocas y plantas, de forma libre o simbiótica con otros organismos (Madigan *et al.* 2014). Se han identificado alrededor de 40,000 especies, aunque se estima que existe más de 200,000 de las cuales con frecuencia se desconoce su composición química y las particularidades de su metabolismo (Galarza, 2019). Se clasifican de acuerdo con varios parámetros tales como: ciclo de vida, tipos de pigmentos, naturaleza química de los productos que utilizan como reserva de energía, modo de reproducción y constituyentes de la pared celular, además de sus características morfológicas. (Maldonado, 2011; Reyna *et al.* 2018). En México, los estudios taxonómicos registran más de 837 taxa, de ellos 15 taxa intraespecíficos corresponden a *Pediastrum* sp. y 60 a *Scenedesmus* sp. en 24 localidades de la Ciudad de México, Estado de México, Veracruz, Puebla y Jalisco (Reyna *et al.* 2018).

Este grupo de microorganismos se caracterizan por ser fotosintéticos y oxigénicos, es decir, producen energía a partir de la radiación solar. Este proceso se desarrolla en un orgánulo especializado: el cloroplasto. Dicha estructura celular contiene en su interior las enzimas y pigmentos (clorofila, ficobilinas, carotenos y xantofilas), necesarios para la captación de la radiación solar y su conversión en energía química (Safi *et al.* 2014; Palacio, 2015). Estos microorganismos también son autótrofos, crecen utilizando como fuente de carbono el CO₂ (González *et al.* 2017). La energía de la luz se emplea en la reducción de CO₂ a compuestos orgánicos complejos como carbohidratos, lípidos y proteínas (Madigan *et al.* 2014; Safi *et al.* 2014). Además del metabolismo fotoautótrofo, ha sido referido en la literatura el cultivo de microalgas en condiciones heterotróficas y mixotróficas (González *et al.* 2017; Roostaei *et al.* 2018).

Las especies de microalgas heterótrofas emplean como fuente de carbono y de energía compuestos orgánicos presentes en el medio de cultivo y no necesitan luz como fuente de energía (Wang *et al.* 2014; Pérez *et al.* 2015). En un cultivo mixotrófico en cambio, las microalgas asimilan diferentes fuentes de carbono, tanto orgánicas como inorgánicas y obtienen su energía a partir de la degradación de compuestos orgánicos o directamente de la radiación solar (Subashchandrabose *et al.* 2013; Wang *et al.* 2014). A diferencia de algunas especies que cambian su metabolismo heterótrofo a fotoautótrofo en dependencia de la disponibilidad de nutrientes; las especies mixótrofas emplean ambas vías de crecimiento al mismo tiempo (Pérez *et al.* 2015; Roostaei *et al.* 2018).

2.2 *Chlorella sorokiniana*

Es una microalga verde, no motil, unicelular, que se encuentra ampliamente distribuida en diferentes ecosistemas. Según su clasificación taxonómica, pertenece a la División Chlorophyta, Clase Trebouxiophyceae, Familia Chlorellaceae (Baudefet *et al.* 2017). Es una especie altamente productora de biocompuestos, que presenta un gran potencial para la producción de biocombustibles, suplementos nutricionales y de alto valor agregado (Palacio, 2015; Cecchin *et al.* 2018). A pesar de su metabolismo fotoautótrofo, la asimilación de diferentes compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía, permiten su crecimiento de forma mixótrofa en medios suplementados con estos nutrientes (Pérez *et al.* 2015; González *et al.* 2017; Roostaei *et al.* 2018). Las condiciones de cultivo de este microorganismo influyen en el rendimiento de los metabolitos de interés. El uso de fuentes sencillas de carbono, como acetato, potencian el rendimiento de biomasa, proteínas, lípidos y polisacáridos (Cecchin *et al.* 2018). Azaman y colaboradores (2017) observaron un aumento del volumen celular de *C. sorokiniana* cuando crecía en condiciones mixotróficas en comparación cuando el crecimiento se desarrollaba de forma autotrófica. Los autores determinaron que el aumento del tamaño celular es resultado de la acumulación de cuerpos lipídicos y otros metabolitos celulares, principalmente carotenoides. Aunque estas condiciones de cultivo son beneficiosas para la obtención de los compuestos antes mencionados, induce a la vez, la disminución del contenido fenólico y clorofílico que ha sido asociado con una baja actividad antioxidante (Azaman *et al.* 2017). Otro factor importante es la intensidad lumínica, la cual incide en la producción de los

compuestos carotenoides. Un aumento en la radiación luminosa genera un incremento de radicales libres que son perjudiciales para el microorganismo como respuesta a este proceso, aumenta la síntesis de xantofilas y carotenos que actúan como agentes antioxidantes (Safafar *et al.* 2015; Azaman *et al.* 2017). Según Lizzul y colaboradores (2018), la velocidad máxima de crecimiento para *C. sorokiniana* tanto en condiciones de autotrofia, como de mixotrofia empleando como fuente de carbono acetato de sodio, se obtuvo en el intervalo de temperaturas de 30 a 35 °C y con una intensidad lumínica entre 100–500 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Resultados similares obtuvieron Kumar y colaboradores (2014), quienes observaron que la temperatura óptima de crecimiento fue de 30 °C y la intensidad lumínica de 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y a pH 7.5. En ambas investigaciones el mayor rendimiento de biomasa se obtuvo en condiciones de cultivo mixotrófico. En las investigaciones mencionadas se establecen las condiciones óptimas para la obtención de biomasa y metabolitos de interés. No obstante, en ninguno de los casos se evalúa la actividad biológica de los biocompuestos obtenidos.

2.3 Empleo de *Chlorella sorokiniana* para la producción de biomoléculas con actividad antitumoral.

Pocas son las investigaciones que refieren la producción de biomoléculas con actividad antitumoral por *C. sorokiniana*, a pesar de que la especie ha mostrado un gran potencial para la obtención de diferentes biocompuestos. En una investigación realizada por Chung y colaboradores (2012), se enfrentó un extracto etanólico de *C. sorokiniana* contra una línea celular humana de cáncer de hígado y se observó una actividad apoptótica y anti-invasiva del extracto, mediada por la expresión de caspasas. La caracterización del extracto mostró la presencia de luteína, β -caroteno, clorofila a y b, compuestos a los cuales los autores le atribuyen la actividad antitumoral observada (Chung *et al.*, 2012). Resultados similares obtuvieron Lin y colaboradores (2017), quienes reportaron la reducción de la viabilidad celular de dos líneas celulares humanas de cáncer de pulmón al enfrentarla a un extracto acuoso de *C. sorokiniana*. En el estudio determinan que el extracto incrementa la expresión de las proteínas caspasa-3, caspasa-9 y PARP (del inglés Poly ADP-ribose Polymerases) las cuales participan en los eventos de apoptosis (Lin *et al.*, 2017). Safafar y colaboradores (2015), caracterizaron un extracto metanólico obtenido de *C. sorokiniana* en el cual se determinó la presencia de astaxantina, β -caroteno, fenoles, clorofila a y b. Dicho

extracto demostró una alta actividad antioxidante pero no se evaluó la actividad antitumoral del mismo (Safafar *et al.*, 2015). En un estudio más reciente Ishiguro *et al.* (2020) aislaron y purificaron una fracción de la membrana citoplasmática de esta especie en particular y la enfrentaron a una línea celular de carcinoma colorrectal murino. Los autores evaluaron el efecto antitumoral e inmunomodulador sobre las células cancerígenas y llegaron a la conclusión de que la fracción evaluada contiene un compuesto bioactivo que inhibe el crecimiento del carcinoma colorrectal y estimula la inmunidad antitumoral del hospedero (Ishiguro *et al.*, 2020). Aunque estas investigaciones demostraron la producción de los biocompuestos de interés, no se logra dilucidar que biomolécula es la que presenta el efecto deseado. Además, usualmente emplean como sustrato para la obtención del extracto biomasa comercial por lo que no establecen condiciones de cultivo para la óptima obtención de los metabolitos. En este proyecto proponemos realizar la elucidación de los compuestos por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplado a masas, la cual aportará información precisa sobre los compuestos presentes en el extracto metanólico. Esta técnica no ha sido empleada para la caracterización de dicho extracto.

Una investigación previa realizada por Reyna *et al.* (2018), demostró la actividad citotóxica y apoptótica de un extracto metanólico obtenido de una cepa de *C. sorokiniana* nativa del Estado de Nuevo León. En dicho estudio, el extracto microalgal fue enfrentado a la línea celular de linfoma murino L5178Y-R obteniéndose un 61.89% de citotoxicidad. No obstante, dicha investigación dejó área de oportunidad para la optimización de las condiciones cultivo, debido que se produjo el extracto bajo condiciones autotróficas. Se evaluó el efecto deseado en una línea celular de cáncer de origen animal y no de origen humano y no se caracterizó el extracto obtenido para la determinación de los diferentes biocompuestos que lo componen, por lo cual no se logró determinar el compuesto responsable de dicha actividad

Por lo antes mencionado consideramos necesario realizar un estudio donde se provean las condiciones de cultivo óptimas previamente reportadas en la literatura, para potenciar la producción de los metabolitos deseados y que permita determinar la composición del extracto mediante su fraccionamiento, caracterización y elucidación de su estructura para posteriormente evaluar su actividad antitumoral contra líneas celulares humanas de cáncer MCF-7 y HT29, sobre las cuales no se ha descrito ningún efecto antitumoral.

2.4 Compuestos carotenoides

Los isoprenoides son una de las familias de compuestos más extensas que se conocen en la naturaleza con más de 50.000 moléculas isoprenoides diferentes descritas en plantas, animales, bacterias y otros organismos (Villavicencio, 2015). La mayor diversidad de estos compuestos se encuentra en las plantas, donde desempeñan funciones esenciales, que se clasifican en primarias y secundarias. Las primarias son de importancia vital para la célula como: el mantenimiento de la fluidez de las membranas a través de la inserción de esteroides, su intervención en la cadena de transporte electrónico mitocondrial y fotosintética, así como la prenilación y glicosilación de proteínas en procesos de modificación pos-traducciona (Caraballo, 2013; Dissook *et al.* 2021). La interacción de las células con su entorno, la protección contra especies reactiva del oxígeno, fotoprotección y la defensa contra patógenos han sido descritas como sus funciones secundarias.

Los carotenoides son los pigmentos isoprenoides con mayor distribución y abundancia en la naturaleza. Contienen una serie de dobles enlaces conjugados que constituyen el grupo cromóforo de la molécula, responsable del color y de las propiedades de absorción de luz en estos compuestos. Estos pigmentos han sido ampliamente estudiados por sus diversas funciones biológicas como: la captación de luz, fotoprotección, precursores de hormonas, antioxidantes y anticancerígenos (Talero *et al.* 2015; Cardoso *et al.* 2017; El-Hacka *et al.* 2019, Kusumaningrum *et al.*, 2019). Se localizan en los centros de reacción de los fotosistemas y en los complejos antena, donde se unen a proteínas integrales de membrana y participan en la absorción de la luz y en la protección del aparato fotosintético frente a daños fotooxidativos.

Existen dos tipos de carotenoides: los carotenos, que no contienen oxígeno en sus anillos terminales y las xantofilas, luteínas, astaxantinas, violaxantinas y fucoxantinas, que contienen oxígeno en sus anillos terminales (Arruabarrena *et al.* 2019). Los carotenos son hidrocarburos polinsaturados lineales o cíclicos en uno o ambos extremos de la molécula, siendo los más abundantes el α -caroteno, el β -caroteno y el licopeno. Son responsables del color amarillento o anaranjado de muchas frutas y verduras. El β -caroteno está compuesto de dos grupos retinilo que al escindirlos forma dos moléculas de vitamina A. El α -caroteno y el γ -caroteno también son precursores de vitamina A, pero en menor medida que el β -caroteno, debido a que solo

presentan un grupo retinilo. Según Pham y colaboradores (2013) la producción de β -caroteno redujo la migración, invasión, y la expresión de metaloproteinasas en la línea celular humana de cáncer de colon LoVo (Pham *et al.*, 2013). Las xantofilas son derivados oxigenados de los carotenos y presentan una gran variedad de funciones en los organismos fotosintéticos. La astaxantina ha demostrado la inhibición del crecimiento de líneas celulares de cáncer colorrectal humano (CRC), incluyendo las líneas celulares HCT-116, HT-29, LS-174, WiDr y SW-480 (Palozza *et al.* 2009). Además, su actividad antioxidante impide la genotoxicidad y la citotoxicidad de las especies reactivas del oxígeno (El-Hacka *et al.* 2019). La luteína también ha mostrado actividad anti-inflamatoria, antitumoral y anticancerígena (Cardoso *et al.* 2017; Intan *et al.* 2018). Extractos de *Chlorella vulgaris*, cuyo constituyente mayoritario fue la luteína, mostró un efecto anti-proliferativo en la línea celular de cáncer de colon HCT-116 (Cha *et al.* 2008). Según Cordero y colaboradores *C. sorokiniana* constituye una excelente fuente para la obtención de esta biomolécula (Cordero *et al.* 2011). La violaxantina obtenida de *Dunaliella tertiolecta* (Pasquet *et al.* 2011) y *Chlorella ellipsoidea* han mostrado efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos contra la línea celular HCT-116 (Soontornchaiboon *et al.* 2012).

Además de los biocompuestos carotenoides, las microalgas producen otras biomoléculas con actividad anticancerígena. Los glicolípidos como monogalactosil-diacilglicerol (MGDG) y digalactosil-diacilglicerol (DGDG) presentan una destacada capacidad de inhibición de la ADN-polimerasa y la topoisomerasa II, por lo cual se les ha atribuido el papel de inmunomoduladores y agentes antitumorales (Rodríguez, 2017). La evaluación de la actividad de compuestos polisacáridicos y de origen peptídico también ha demostrado un gran potencial en la inhibición del crecimiento de las células cancerígenas (Talero *et al.* 2015; Intan *et al.* 2018).

2.4.1 Ruta del metileritritol fosfato.

Para la formación de los carotenoides se necesita la presencia de dos precursores fundamentales los cuales son los isoprenos activos de 5 átomos de carbono, isopentenil pirofosfato (IPP) y dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Mediante la vía del Mevalonato (MVA) muchos organismos sintetizan el IPP y posteriormente lo isomerizan a DMAPP por la enzima isopentenilo pirofosfato isomerasa (IPI) (Caraballo, 2013). Sin embargo, existe una ruta alternativa independiente de la del mevalonato (MVA), denominada ruta del no mevalonato o 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) definida completamente hace tan solo unos años, la cual es la principal responsable de la síntesis de carotenoides en plantas, algas y bacterias (Dissook *et al.* 2021). Ambas rutas se localizan en compartimientos celulares diferentes. La ruta MEP se desarrolla en los cloroplastos y la ruta MVA en el citoplasma. Además, difieren en el paso de condensación inicial. En la ruta citosólica MVA, el IPP se sintetiza por condensación de 3 moléculas de acetil CoA, mientras que la ruta del MEP se produce por la condensación de piruvato con el gliceraldehído 3 fosfato (Koley *et al.* 2020). Además, en la ruta MEP, a diferencia de la ruta MVA, produce en el último paso IPP y DMAPP. En plantas y algunas clases de algas la ruta MVA, suministra precursores para la biosíntesis de citoquinas, ubiquinona mitocondrial, esteroides citosólicos y poliprenoides mientras que la ruta MEP, reproduce precursores para isoprenoides plastídicos tales como carotenoides, fitol, fitohormonas, cadena lateral de la plastoquinona y productos mono y diterpenos de plantas y algas. La unión del IPP con DMAPP catalizada por la enzima geranyl geranyl pirofosfato sintasa (GGPPS) da como resultado la formación del intermediario geranyl geranyl pirofosfato (GGPP), precursor de fitoeno e imprescindible para la síntesis de carotenos (Alquéazar, 2007; Caraballo, 2013). En la Figura 1 se muestra de forma esquemática la ruta MEP.

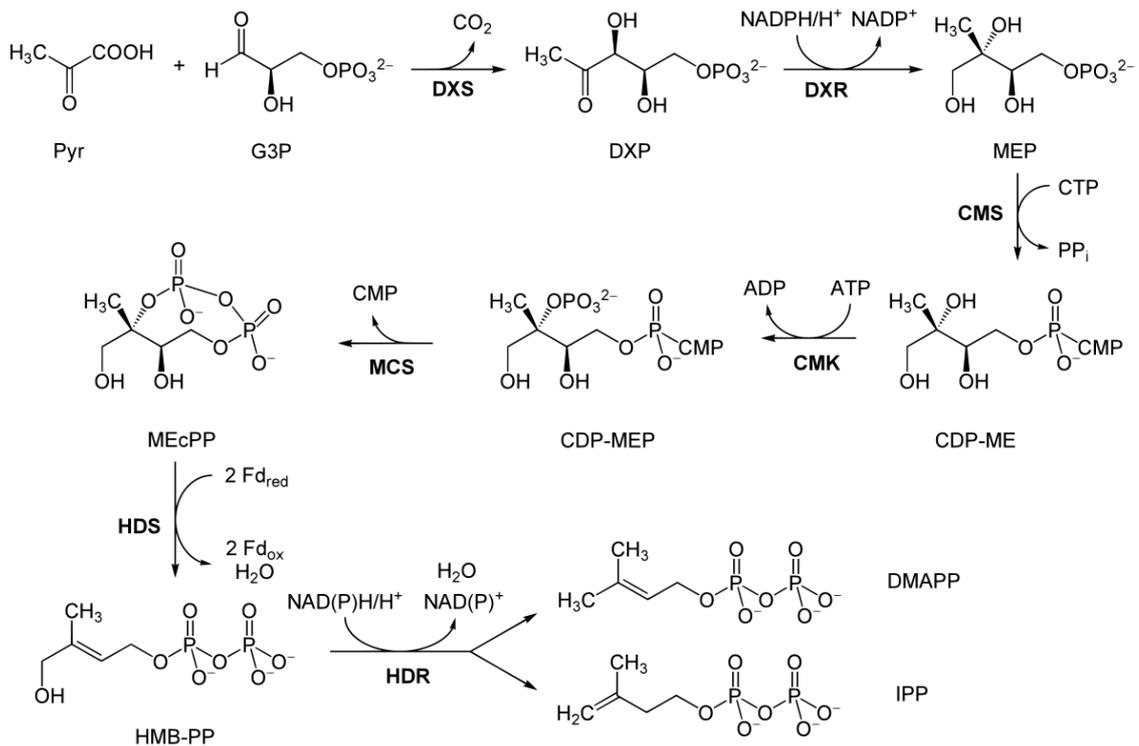


Figura 1. Ruta metabólica del metileritritol fosfato. Abreviaciones: Pyr, piruvato; G3P, gliceraldehído 3 fosfato; DXS, 1-Desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa, DXR, 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa; MEP, 2-C-metileritritol 4-fosfato; CMS, 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidiltransferasa; CMK, 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa; MCS, 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa; HDS, HMB-PP sintasa; HMB-PP, €-4-hidroxi-3-metil-but-2-enil pirofosfato; HDR, HMB-PP reductasa; IPP, isopentenil difosfato; DMAPP, dimetilalil pirofosfato.

2.4.2 Biosíntesis de carotenoides y xantofilas.

La síntesis de fitoeno a partir de GGPP representa el primer paso en la biosíntesis de carotenoides. La reacción es catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY), llevando a cabo la condensación de dos moléculas de GGPP en una molécula de fitoeno, primer caroteno incoloro de la ruta biosintética (Alquéazar, 2007). En los siguientes pasos, una serie de cuatro desaturaciones y dos isomerizaciones incrementan la serie de dobles enlaces conjugados y transforman el 15- cis isómero fitoeno en todo-trans licopeno, un carotenoide rosa/rojo. En este proceso participan las enzimas fitoeno desaturasa (PDS), ζ-caroteno isomerasa (Z-ISO), ζ-caroteno isomerasa (ZDS) y carotenoide isomerasa (CRTISO), así como una isomerización mediante luz (Koley *et al.* 2020). Los pasos de desaturación transforman el fitoeno a licopeno, incrementando el número de dobles enlaces conjugados de cinco a once.

El licopeno es el principal precursor de los carotenos y xantofilas. La ciclación del licopeno en sus extremos por licopenos ciclasas (LCY) produce dos tipos de anillos β y ϵ , los cuales difieren únicamente en un solo doble enlace en el ciclohexano. La enzima β -LCY actúa en ambos extremos de la molécula de licopeno produciéndose γ -caroteno en el proceso. En cambio, ϵ -LCY solo actúa en uno de los extremos de la molécula originándose δ -caroteno. La formación de α -caroteno depende de la acción de β -LCY en el extremo lineal de δ -caroteno.

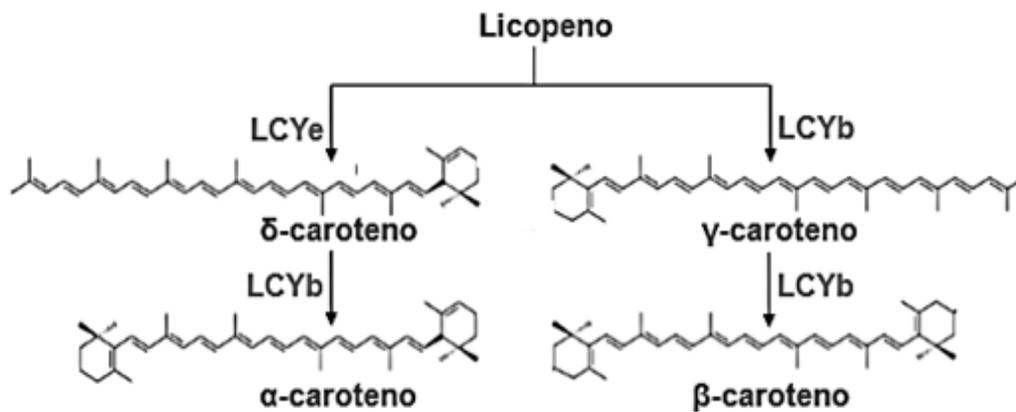


Figura 2. Ciclación del licopeno. Las enzimas que catalizan cada reacción: LCYe, ϵ -licopeno ciclasa; LCYb, β -licopeno ciclasa. Adaptado de Alquézar (2007).

Las xantofilas se diferencian de los carotenos por ser compuestos oxigenados. La oxidación enzimática tanto del α -caroteno como del β -caroteno produce luteína y zeaxantina respectivamente. La hidroxilación de los anillos β es catalizado por la acción de la enzima β -caroteno hidroxilasa (β -CHX), mientras que sobre los anillos ϵ actúa la ϵ -CHX (Caraballo, 2013). Posteriores modificaciones de la zeaxantina por la introducción de grupos epoxi debido a la acción de la enzima zeaxantina epoxidasas (ZEP) da como resultado anteraxantina y violaxantina. La reversión de este paso es posible por la acción de la enzima violaxantina epoxidasa (VDE) la cual cataliza la epoxidación de la violaxantina revertiendo así el paso anterior.

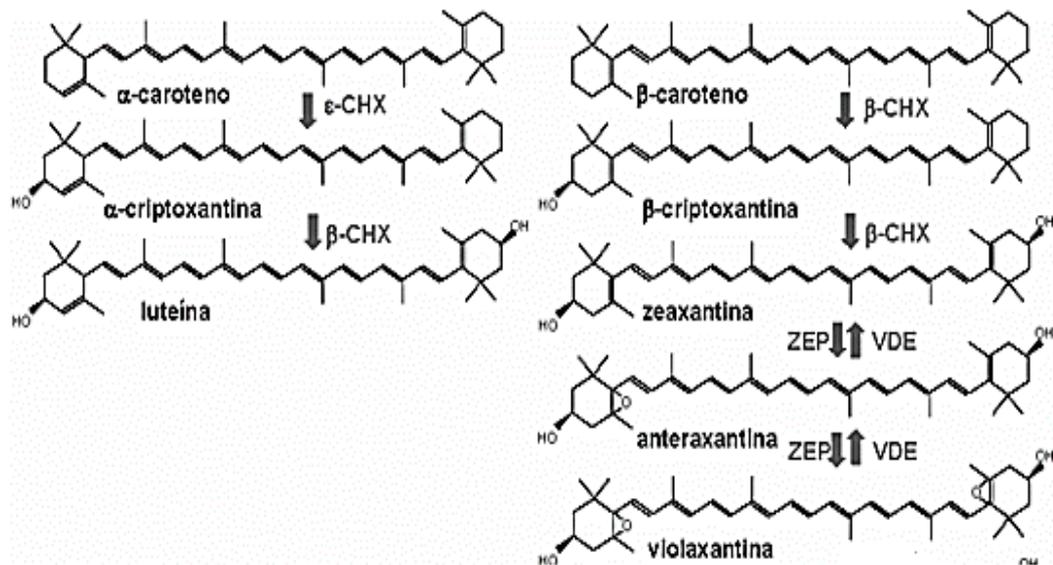


Figura 3. Biosíntesis de xantofilas por oxigenación de α y β -carotenos. Las enzimas que catalizan cada reacción: β -CHX, β -caroteno hidroxilasa; ϵ -CHX, ϵ -caroteno hidroxilasa; ZEP, zeaxantina epoxidasa; VDE, violaxantina epoxidasa. Adaptado de Alquézar (2007).

2.5 Cáncer y actividad anticancerígena

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define "Cáncer" como término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Una característica definitoria del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, por un proceso que se denomina metástasis. Para el año 2019 las afecciones por cáncer de tráquea, bronquios y pulmón representaban la sexta causa de muerte en el mundo aumentado de 1.2 millones a 1.8 millones de fallecidos con respecto al año 2000. En el año 2020 se reportaron casi 10 millones de fallecimientos siendo los de mayor incidencia el cáncer de mama (2,26 millones de casos), pulmonar (2,21 millones de casos), colorrectal (1,93 millones de casos), de próstata (1,41 millones de casos), de piel (no melanoma) (1,20 millones de casos) y gástrico (1,09 millones de casos). En la Figura 4, se muestra un valor estimado del número de muertes y casos de incidencias por tipo de cáncer hasta diciembre 2020. Como se puede observar el cáncer de pulmón y el colorrectal

son los causantes de mayor mortalidad con 1 796 144 y 935 173 muertes respectivamente.

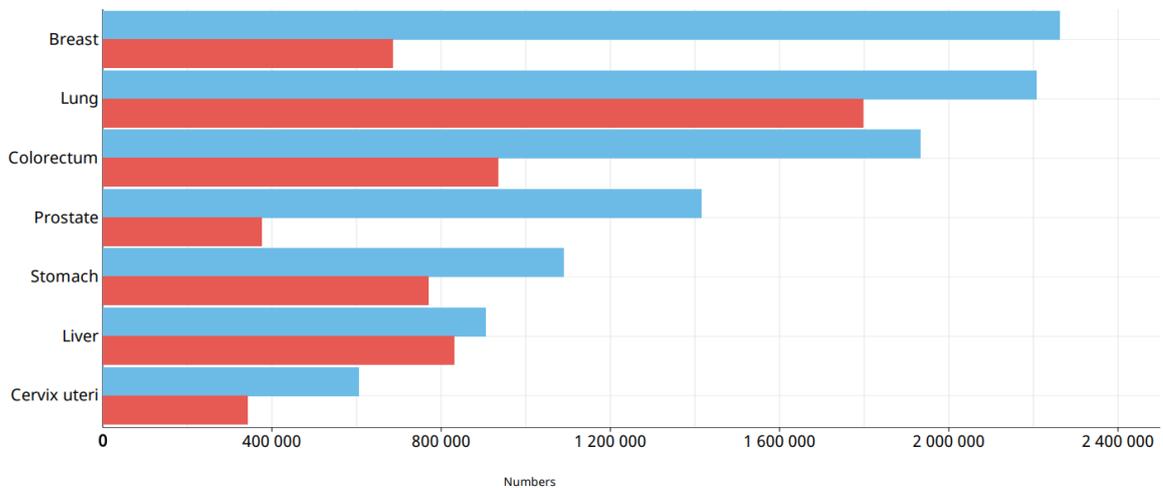


Figura 4. Valor estimado del número de muertes y casos de incidencias por tipo de cáncer a nivel mundial. Las barras azules representan los casos incidentes y las rojas las muertes. Tomado de Cancer Today (iarc.fr).

Cerca del 70% de las muertes por cáncer se registran en países de ingresos medios y bajos. La detección de cáncer en una fase avanzada y la falta de diagnóstico y tratamiento son problemas frecuentes. En 2017, solo el 26% de los países de ingresos bajos informaron que la sanidad pública contaba con servicios de patología para atender a la población en general. Más del 90% de los países de ingresos altos ofrecen tratamiento a los enfermos oncológicos, mientras que en los países de ingresos bajos este porcentaje es inferior al 30% (OMS, 2018). Además, según la Organización Panamericana de la Salud (OPS) el cáncer también es la segunda causa de muerte en América y se estima que cada año 2.9 millones de personas son diagnosticadas y 1.3 millones mueren por esta enfermedad. Para el año 2025 se prevé que, la carga del cáncer aumente a más de 4 millones de nuevos casos y 1.9 millones de muertes, si no se toman medidas adicionales (OPS, 2018). Como se muestra en la Figura 5 en el Continente Americano en el 2020, al igual que el resto del mundo, la mayor mortalidad la posee el cáncer de pulmón seguido por el colorrectal con 246 268 y 133 422 muertes al año respectivamente. Otro aspecto para tener en cuenta es que la mayor incidencia de casos corresponde al cáncer de mama, tanto a nivel mundial como regional. A pesar de que esta enfermedad no sea tan letal como las antes mencionadas, causa más de 650 000 muertes al año en el mundo y más de 100 mil en el Continente Americano. Los datos expuestos señalan que estos dos tipos de cáncer en específico presentan una

gran letalidad y se han convertido en un reto a superar a través de la generación de nuevos fármacos y terapias más eficaces. En tal sentido, en nuestro proyecto trabajamos con las líneas celulares HT29, la cual es una línea de adenocarcinoma humano de colon y la MFC7 que es de adenocarcinoma humano de mama. Las líneas fueron enfrentadas al extracto metanólico y a las fracciones y/o compuestos puros obtenidos a partir de la biomasa de *C. sorokiniana* y se evaluó su efecto citotóxico sobre las células. El tratamiento del cáncer requiere una cuidadosa selección de una o más modalidades terapéuticas tales como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Debido a que son procedimientos altamente invasivos y producen efectos secundarios muy dañinos para el paciente, constantemente se están buscando nuevas opciones farmacológicas de tratamiento (OMS, 2018). Los productos naturales, fundamentalmente aquellos producidos por microalgas han sido estudiados por su efecto anticancerígeno (Palozza *et al.* 2009; Pham *et al.* 2013; Talero *et al.* 2015; Encarnacao *et al.* 2015). Se presume que estas biomoléculas interfieren con la iniciación, desarrollo y progresión del cáncer por medio de la modulación de varios mecanismos como: la proliferación celular, diferenciación, apoptosis, angiogénesis y metástasis (Intan *et al.* 2018). Aunque bien no se han dilucidado los mecanismos de acción de estos compuestos, los resultados obtenidos en las diferentes investigaciones desarrolladas son esperanzadores e indican que las microalgas son una fuente sustentable de componentes bioactivos de interés para la industria biofarmacéutica.

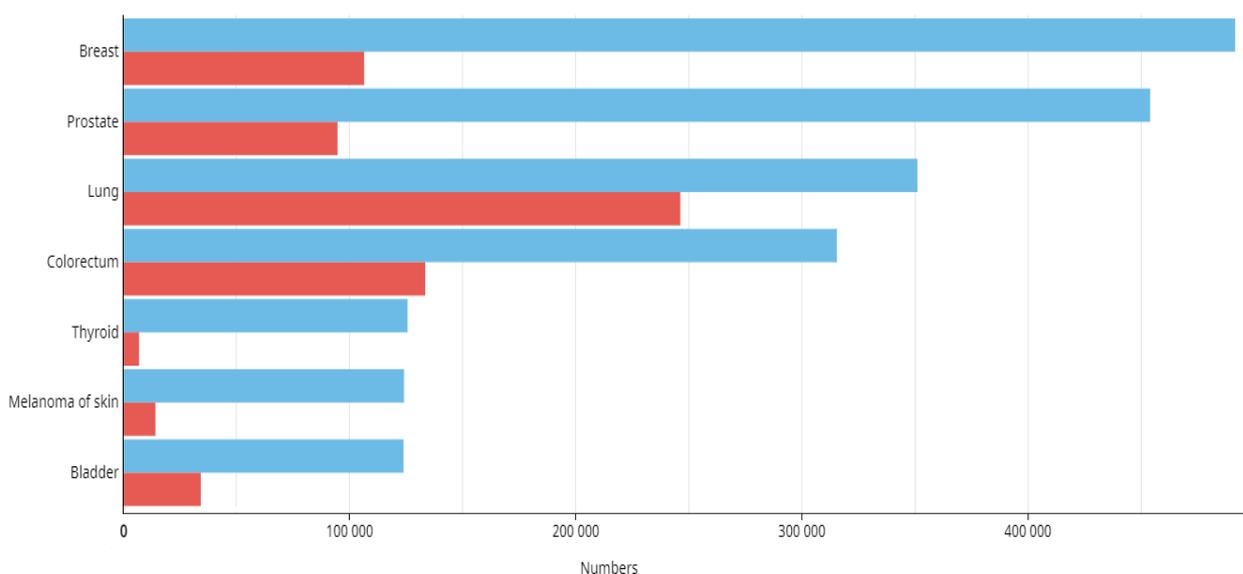


Figura 5. Valor estimado del número de muertes y casos de incidencias por tipo de cáncer para el Continente Americano. Las barras azules representan los casos incidentes y las rojas las muertes. Tomado de Cancer Today (iarc.fr).

2.6. Líneas celulares

2.6.1 HT29

La línea celular HT29 proviene de un tumor primario de colon de una mujer caucásica de 44 años. Forma un adenocarcinoma bien diferenciado. Presenta un modo de crecimiento adherente y su morfología es epitelial. El medio de cultivo recomendado para esta línea celular es el Medio Esencial Mínimo de Eagle suplementado con 2mM Glutamina + 1% Aminoácidos no Esenciales + 10% Suero Fetal Bovino (ATCC, 2021).

2.6.2 MCF7

Se estableció a partir del derrame pleural de una mujer caucásica de 69 años que padecía un adenocarcinoma de mama. Las células presentan algunas características del epitelio mamario diferenciado, incluyendo la síntesis de estradiol y la formación de cúpulas. Las células pueden ser portadoras de retrovirus de tipo B o C y se considera que representan un patógeno de categoría 2. Las células expresan tanto los receptores de estrógeno de tipo salvaje como la variante, así como el receptor de progesterona. Las células deben manipularse bajo el nivel de contención 2 del laboratorio. Se emplea ampliamente para estudios de radio sensibilidad y toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo* (Venugopal *et al.* 2017).

2.6.3 Vero

Aisladas del riñón de un Mono Verde africano adulto normal. Las células Vero son células dependientes de anclaje y tienen amplias aplicaciones en la investigación de biología molecular y celular. Las células Vero tienen un cariotipo pseudodiploide y son las líneas celulares preferidas para la propagación de diversos virus, como el poliovirus, el rotavirus de la gripe y el virus de la rabia. Estas células son huéspedes útiles para la producción de vacunas. Se han aplicado en diferentes estudios para evaluar la actividad citotóxica de determinados compuestos frente a células sanas y para la determinación del efecto antiviral de fármacos (ATCC, 2ª21a).

2.6.4 L5178Y-R

Esta línea celular es un linfoma murino que se obtuvo de la ATCC (American Type Culture Collection). Esta deriva de un tumor de timo inducido con metilcolantreno, en ratones DBA/2. Las células fueron adaptadas a crecimiento *in vitro*, en una suspensión celular llamada L5178Y. Se emplea ampliamente para estudios de radio sensibilidad y toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo* (Sigma Aldich, 2021).

Las líneas celulares HT29, MCF7 y Vero fueron proporcionadas por el Laboratorio de farmacología molecular y modelos biológicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL. En la Tabla 1 se muestra una descripción más específica de las líneas celulares mencionadas.

Tabla 1. Descripción de las líneas celulares HT29, MCF7, Vero y L5178Y-R.

Línea celular	HT29	MCF7	VERO	L5178Y-R.
Morfología	Epitelial	Epitelial	Fibroblasto	Células tipo linfoblasto
Tejido	Epitelio colorrectal	Epitelio mamario	Conectivo	Linfoide
Origen	Colon humano	Mama humana	Riñón de Mono Verde africano	Timo de ratón DBA/2
Crecimiento	Adherente	Adherente	Adherente	Suspensión

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La microalga *Chlorella sorokiniana* produce al menos un compuesto carotenoide con actividad antitumoral *in vitro* contra las líneas celulares humanas de cáncer MCF-7 y HT29 bajo condiciones mixotróficas.

3.2 Objetivo general

Caracterizar y elucidar la estructura de los biocompuestos con actividad antitumoral *in vitro* producidos por la cepa *Chlorella sorokiniana* bajo condiciones de cultivo mixotrófica.

4.3 Objetivos específicos

- Reactivación, establecimiento y crioconservación de un cultivo axénico de *C. sorokiniana*.
- Producción de la biomasa de *C. sorokiniana* bajo condiciones mixotróficas para la posterior obtención de extracto metanólico crudo.
- Determinación del efecto citotóxico *in vitro* del extracto metanólico crudo en contra de las líneas celulares MCF-7, HT29, L5178Y-R y Vero.
- Fraccionamiento de los compuestos presentes en el extracto crudo metanólico por medio de cromatografía en columna.
- Evaluación del efecto antitumoral *in vitro* de los compuestos puros y/o fracciones obtenidas en contra de las líneas celulares MCF-7, HT29, L5178Y-R y Vero.
- Identificación de los compuestos presentes en el extracto crudo y en las fracciones.

CAPÍTULO 4

METODOLOGÍA

4.1 Reactivación de la cepa *Chlorella sorokiniana*

La cepa de *Chlorella sorokiniana* se encontraba preservada a una temperatura de 4°C en medio líquido, en condiciones axénicas. La reactivación de la cepa se realizó mediante su cultivo en el medio mínimo salino LC líquido (López *et al.*, 2010) tomando 1 mL del medio original. Se emplearon matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de volumen de trabajo. Se incubaron durante 192 horas a una temperatura de 30°C, pH 7 e intensidad lumínica de $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La pureza de la cepa se evaluó mediante tinción de Gram y siembra en medio semi sólido Luria Bertani (LB) (Mergeay, 1985) para descartar la contaminación de las microalgas por hongos o bacterias. El aumento de la densidad celular se determinó por recuento en cámara de Neubauer (Neubauer improved, Marienfeld, Alemania) de 0,1 mm de profundidad.

4.2 Crioconservación

La crioconservación de la cepa se llevó a cabo empleando como Agente Crioprotector DMSO al 10% (v/v) y se almacenaron en congelación a -80 °C (ThermoScientific, 8744) hasta su posterior uso en los ensayos biológicos. Posteriormente, se determinó su índice de viabilidad (ver Ec 1) post-congelación por la siguiente fórmula planteada por Cañavate y Lubian (1995). La concentración de DMSO empleada ha mostrado ser la más eficaz para la criopreservación de microalgas clorofitas (Bui *et al.* 2013; Morschett *et al.* 2016; Tessarolli).

$$IV = \left(\left(\frac{C_0}{C_i} \right) \times \left(\frac{C_{10}}{aC_0^b} \right) \right) \times 100$$

Ec 1

Donde IV es el Índice de viabilidad, C_0 y C_{10} son las concentraciones inicial y final después de la criopreservación respectivamente. C_i es la concentración máxima obtenida antes de la conservación y tanto a como b son coeficientes de regresión obtenidos al graficar el crecimiento postcongelación.

4.3 Producción de la biomasa de *Chlorella sorokiniana* bajo condiciones mixotróficas

Para la obtención de la biomasa requerida en los ensayos de citotoxicidad *in vitro* se cultivó de la cepa *C. sorokiniana* en condiciones de mixotrofia. Se empleó el medio nutritivo LC (López *et al.*, 2010) modificado con glucosa como fuente de carbono a una concentración final de 4 g/L. Se prepararon 9 matraces Erlenmeyer de 2 L de volumen total con capacidad de trabajo de 1 L para un total de 9 L de medio de cultivo. La cepa se incubó durante 10 días bajo las condiciones de cultivo óptimas previamente descritas (temperatura 30 °C, intensidad lumínica de 100 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y pH 7.0).

4.3.1 Monitoreo de la producción

Durante el tiempo de cultivo se evaluó la pureza por microscopía óptica, tinción de Gram y mediante su crecimiento en el medio semi sólido LB. El monitoreo del crecimiento microalgal se efectuó mediante la medición de la absorbancia a 750 nm con un espectrofotómetro (7200 Unico) cada 24 horas de cultivo.

4.3.2 Colecta, concentración y liofilización de la biomasa

Una vez que el cultivo llegó a la fase estacionaria mostrando un estancamiento en la producción de biomasa, se procedió a la colecta y concentración dejando sedimentar la biomasa por 24 horas a 4°C. Una vez terminado este proceso, se descartó parte del sobrenadante y se centrifugó el cultivo a 5000g durante 15 minutos (THERMO Scientific, ST16R, Waltham MA) descartando el sobrenadante. La biomasa obtenida se conservó a 4°C, posteriormente se realizó un secado por liofilización (Labconco, Freezone 4.5, Kansas City MO) y una vez que se obtuvo la biomasa seca, se procedió

a su pesado y obtención del extracto metanólico. Debido al limitado volumen de secado del equipo de liofilización se empleó el secado por pulverización (Mobile Minor™ Spray Drye) para procesar mayor volumen de cultivo. La temperatura de entrada se fijó a 50°C y la de salida a 80°C con un flujo de trabajo de 20 mL/min. Bajo estas condiciones de operación se redujo la exposición de la biomasa al calor y se logró la deshidratación deseada.

4.4 Obtención del extracto metanólico (EM)

Para la obtención del extracto metanólico se resuspendieron 2 g de la biomasa seca en 10 mL de metanol al 99.98% en frascos de vidrio color ámbar de 100 mL. Para homogeneizar la disolución los frascos se colocaron sobre una placa de agitación, agregando un agitador magnético dentro de los mismos. La mezcla se mantuvo en agitación por 48 horas. Transcurrido este periodo, se filtró el líquido utilizando microfiltros de 0.22 µm y se dispensó en viales de 2 mL a razón de un 1 mL por vial. Para la evaporación del solvente y lograr la sequedad total del extracto se colocaron los viales en un desecador al vacío por 6 horas (SpeedVac, Savant SPD121P). Una vez evaporado el solvente se procedió a disolver el extracto orgánico (7 mg) en 1 mL de solución 1:10 de metanol-medio RPMI y posteriormente se diluyó en 6 mL de medio RPMI adicionales, logrando así una concentración de 1 mg/mL. Los extractos se mantuvieron en congelación hasta su posterior uso. Este procedimiento se empleó para la obtención de baja cantidad de extracto; la necesaria para hacer los ensayos de citotoxicidad. Para la identificación de los compuestos presentes en el extracto se trabajó con un volumen tres veces mayor, por tanto, se le hicieron cambios a la metodología antes descrita. La biomasa (16 g) fue tratada con metanol durante 48 h. Transcurrido este tiempo se filtró utilizando un embudo de vidrio y un papel filtro Whatman No. 1. La evaporación del solvente se realizó en un rotaevaporador (Buchi, Rotavapor® R-300) hasta alcanzar un volumen de 50 mL y se añadió 10 g de sílica gel para impregnar el EM y lograr la sequedad total. Una vez impregnado el extracto crudo se procedió a su fraccionamiento en columna cromatográfica.

4.5 Evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* del extracto metanólico contra las líneas celulares MCF-7, HT29, Vero y L5178Y-R

La actividad citotóxica *in vitro* del extracto metanólico en contra de las líneas celulares MCF-7, HT29, Vero y L5178Y-R se determinó mediante ensayos en microplaca utilizando la técnica colorimétrica del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazán), que se producen de forma natural cuando las células son viables. Las líneas celulares fueron facilitadas por el laboratorio de farmacología molecular y modelos biológicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL y se cultivaron en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Las células se sembraron en microplacas de 96 pozos de fondo plano (Corning, New York, USA), ajustando a 1×10^4 células/pozo y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ durante 48 horas o hasta que se alcanzara una confluencia del 80%. Posteriormente se desechó el medio de cultivo exhausto y se le añadió 100 µL de medio fresco por pozo y se colocó 100 µL del tratamiento (extracto metanólico 1 mg/mL) realizando diluciones seriadas 1:2 partiendo de 500 µg/mL. Como control positivo se utilizaron 100 µL del antineoplásico vincristina (0.5 µg/mL de concentración), como control negativo 100 µL de medio de cultivo y como vehículo metanol al 1% diluido en RPMI. El metanol no presenta citotoxicidad para las células tratadas a concentraciones inferiores al 5% (v/v), no obstante, se evaluó su efecto y se le restó al efecto citotóxico total. Los cultivos se incubaron durante 48h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Al finalizar este período de tiempo, se colocaron 15 µL de MTT a una concentración final de 0.5 mg/mL y se incubaron 3 h adicionales; posteriormente se retiró el sobrenadante y se añadieron 80 µL de DMSO a todos los pozos, las densidades ópticas se determinaron en un lector de microplacas (DTX 880 Multimode detector, Becton Dickinson, Austria) a 570 nm (Reyna *et al.*, 2018).

4.6 Obtención de las fracciones del Extracto Metanólico

4.6.1 Selección de disolventes

El extracto metanólico crudo se llevó a sequedad por medio de rotaevaporación (alcanzando una temperatura de 37°C y una presión de 150 mBar). El deshidratado obtenido se mezcló con diferentes solventes seleccionados en base a su solubilidad (Metanol, Acetato de etilo y n-Hexano). Mediante cromatografía en capa fina se observó que la mezcla de solventes proporcionaba mayor separación de los compuestos.

4.6.2 Cromatografía en columna

Se utilizaron 3 g del extracto metanólico crudo de la microalga llevado a sequedad por medio de rotaevaporación. El proceso se realizó en una columna de sílica gel 60, empacada con n-hexano, utilizando un gradiente de concentración de los disolventes n-Hexano y Acetato de etilo en una proporción 1:1. Las fracciones del proceso se colectaron y concentraron por medio de rotaevaporación, para observar la composición mediante cromatografía en capa fina.

4.6.3 Cromatografía en capa fina

Mediante una placa cromatográfica TLC Sílica gel 60 (20 x 20 cm) activada, se aplicaron las diversas fracciones en la placa mediante un minicapilar (1.15 mm de diámetro), la cámara fue saturada con la mezcla de disolventes escogidos n-hexano y Acetato de etilo, como fase móvil. La cantidad de muestra aplicada fue ensayada previamente, dejando secar entre cada gota, una vez aplicada la muestra se procedió a hacer la separación cromatográfica, durante aproximadamente 5 min, de modo que la longitud de corrida de la fase móvil llegara a 0.5 cm del borde, distancia que permitió observar la separación de grupos de compuestos de acuerdo a la polaridad. Posteriormente se dejó secar la placa a temperatura ambiente y se observó bajo la luz de una lámpara UV a 234 nm, 326 nm y 204 nm. En algunos casos se reveló con vapores de Yodo.

4.7 Evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de las fracciones del extracto metanólico contra la línea celular MCF-7

La actividad citotóxica *in vitro* de las fracciones del extracto metanólico en contra de la línea celular MCF-7 se determinó mediante la técnica colorimétrica antes descrita en el apartado 4.5. Cada fracción se enfrentó de forma individual contra la línea de cáncer de mama a las mismas concentraciones evaluadas para el EM. Cada experimento se hizo por triplicado. Como control positivo se utilizaron 100 µL del antineoplásico vincristina (0.5 µg/mL de concentración), como control negativo 100 µL de medio de cultivo y como vehículo metanol al 1% diluido en RPMI.

4.8 Elucidación de la composición química del extracto metanólico y de las fracciones.

La elucidación de los compuestos químicos presentes en el EM y en las fracciones se llevó a cabo mediante un equipo de cromatografía líquida de ultra resolución UPLC-MS/MS, acoplado a un detector de masas QDA® de Waters (Milford, MA, EE. UU.). Columna ACQUITY UPLC CORTECS® C18 1.6 µm 3.0 x 100 mm. Modo Ion positivo, temperatura de columna 40 °C, temperatura de automuestreador 15 °C. Se tomó 1mg de la muestra y se disolvió en metanol grado HPLC, la muestra se filtró a través de un filtro 0.45 µm y se traspasó a un vial de vidrio. La elución se logró con ácido fórmico al 0.1% en agua ultra pura (Fase A), acetonitrilo (Fase B) y acetato de amonio al 5 mM (Fase C). Velocidad de flujo 0.3 mL/min, volumen de inyección 3 µL. La composición de los solventes a lo largo del tiempo fue la siguiente: inicial A: 5%; B: 85%; C: 10%, a los 3.0 min aumento A: 15%; B: 75%; C: 10%, cambiando a los 10.0 min A: 5%; B: 85%; C:10%. Tiempo de corrida fue de 15.0 min.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Reactivación y crioconservación de la cepa *Chlorella sorokiniana*

La reactivación de la cepa *C. sorokiniana* se llevó a cabo como se describió en el apartado 4.1. La evaluación de la pureza del cultivo se hizo mediante tinción de Gram y crecimiento en medio agarizado LB. Por lo general, las microalgas crecen asociadas a otros microorganismos como bacterias, hongos o levaduras y se dificulta su cultivo axénico. Su tiempo de generación es una gran desventaja ante otros microorganismos como las bacterias que se multiplican considerablemente en un menor lapso de tiempo bajo las mismas condiciones ambientales. Sin embargo, el metabolismo fotoautótrofo de las microalgas les permite su desarrollo en condiciones donde los nutrientes sean limitados en el medio dándole ventaja sobre otros microorganismos que necesiten fuente de carbono y de energía orgánica para su supervivencia. La reactivación de la cepa se realizó en condiciones de fotoautotrofía como medida preventiva para minimizar el riesgo de contaminación.

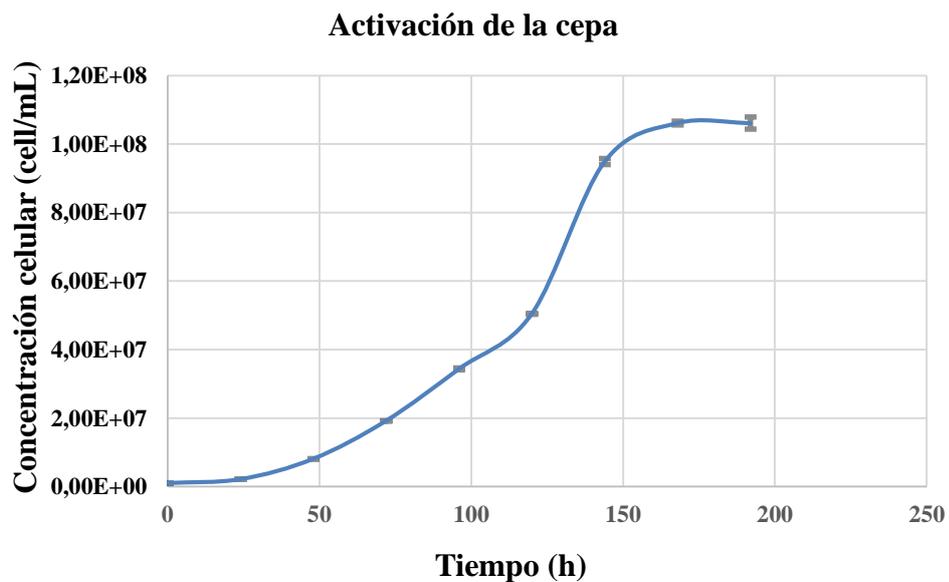


Figura 6. Reactivación de la cepa *Chlorella sorokiniana* en condiciones de fotoautotrofía.

La criopreservación se realizó con el objetivo de almacenar durante el tiempo de investigación la cepa, sin dañar sus propiedades biológicas. El proceso de criopreservación se desarrolló como se describe en la sección 4.2. Para la determinación del índice de viabilidad, se compararon los crecimientos pre y post-congelación a través de la fórmula propuesta por Cañavate y Lubian (1995). Como se observa en la Figura 6, la concentración celular máxima alcanzada antes de la preservación (C_i) fue de 1.06×10^8 células/mL y de 4.29×10^7 células/mL la máxima alcanzada post conservación. El índice de viabilidad calculado para la criopreservación al 10% de DMSO fue del 35.95%. Unas de las causas de la baja viabilidad se le puede atribuir a la diferencia de concentración inicial en ambas etapas. Al inicio del cultivo de preconservación, la cantidad de células por mililitro era de 9.91×10^5 y solo de 3.21×10^5 células por mililitro para el cultivo de poscongelación. La diferencia de concentración de células iniciales también influyó en el tiempo que demoró el cultivo en alcanzar la fase exponencial del crecimiento observándose una diferencia entre ambas etapas de 50 horas (Fig. 6). Otro factor que influye en la viabilidad es la toxicidad que presenta el DMSO sobre las células, razón por la cual generalmente se emplea en concentraciones bajas.

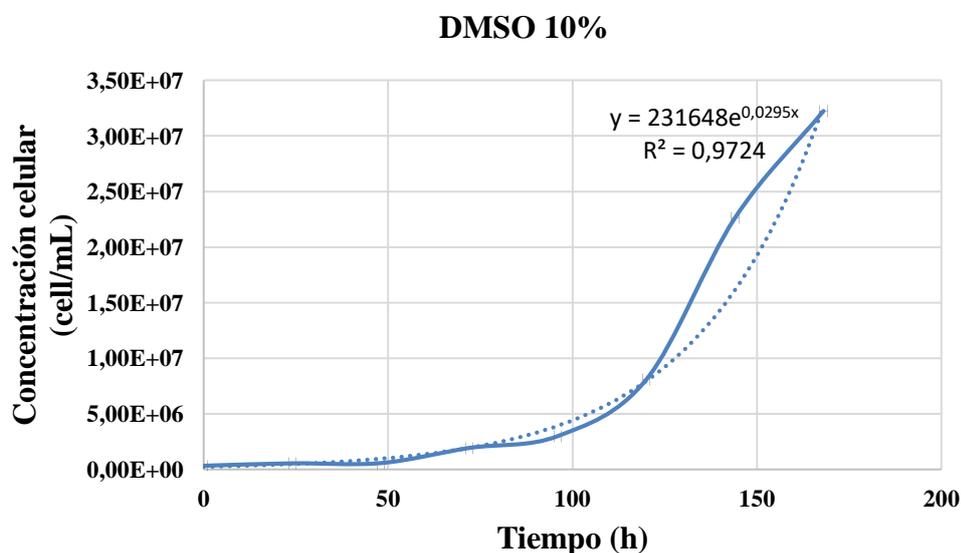


Figura 7. Crecimiento de *C. sorokiniana* mostrado después de la criopreservación con DMSO al 10%.

La criopreservación de los microorganismos es un método ampliamente empleado para almacenar los mismos por prolongados periodos de tiempo reduciendo el riesgo de contaminación y sin que pierdan sus características de interés. En el caso de las microalgas se han realizado diferentes investigaciones para determinar los agentes

crioprotectores (ACP) más eficaces en el proceso de congelación. Según un estudio realizado por Tessarolli y colaboradores (2017) el uso de DMSO al 5% como ACP para microalgas clorofitas fue satisfactorio. De las 62 especies evaluadas 58 superaron con éxito la etapa de congelación de las cuales, el 74% presentó valores de viabilidad superiores al 70%. Las características de este grupo de algas como su reducido tamaño y su simplicidad morfológica lo hacen más tolerante al proceso de criopreservación. El principal problema durante la congelación es la nucleación del agua formando cristales de hielo en el interior celular provocando daños fatales. El éxito de la operación depende indiscutiblemente del equilibrio de pérdida de agua celular a medida que disminuya la temperatura para evitar la formación de hielo intracelular, mientras se mantienen las condiciones mínimas necesarias para la supervivencia de las células (Tessarolli *et al.* 2017). Los CPA penetrantes, como el MeOH y el DMSO pueden permeabilizar rápidamente las membranas celulares, lo que además de su capacidad coligativa de mantener las sales en solución, afectan a la nucleación de los cristales de hielo formando fuertes enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua. EL DMSO es un ACP muy empleado en la criopreservación de células de forma general. Su concentración óptima varía entre 5 – 10% (v/v) por ser un compuesto que presenta toxicidad. El empleo de concentraciones inferiores al 5% (v/v) no garantizan una alta supervivencia celular. Un estudio realizado por Avila y Llano. (2014) mostró un índice de viabilidad para *Chlorella vulgaris* del 1.63% empleando como crioprotector DMSO al 3% (v/v). A pesar de la baja viabilidad, los autores refieren que la concentración celular post-congelación luego de 5 días no fue diferente a los valores reportados en cultivos no congelados. Además, no se evidenció alteraciones morfológicas con respecto a células no congeladas. La combinación de DMSO al 10% (v/v), etilenglicol 10% (v/v) y L-prolina al 10% (w/v) demostró ser efectiva para la crioconservación de *C. vulgaris*, obteniendo un índice de viabilidad superior al 60% (Morschett *et al.* 2016). Bui y colaboradores (2013) evaluaron diferentes concentraciones de DMSO (0, 0.5, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 15% (v/v)) en tres aislados de microalgas clorofitas pertenecientes a los géneros *Palmellopsis* y *Chlamydomonas* observando que a una concentración de 6.5 (v/v) se obtuvo el mayor índice de viabilidad (35%). Los autores también refieren el uso de sacarosa como osmolito extracelular que deshidrata la célula, facilita la permeabilidad del DMSO y es empleada en algunos casos como fuente de carbono.

5.2 Producción de la biomasa de *Chlorella sorokiniana* bajo condiciones mixotróficas.

Una de las características ventajosas de *C. sorokiniana* es su crecimiento en condiciones de mixotrofia. Para la producción de una mayor cantidad de biomasa necesaria para el desarrollo de posteriores ensayos, se creció la cepa empleando como fuente de carbono glucosa a 4 g/L en un ciclo de 24 de horas de luz a una intensidad lumínica de $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. El tiempo de cultivo fue de siete días, aunque se observó que el final de la fase exponencial se alcanzó entre las 100 a 110 horas de incubación. En la figura 8 se muestra el crecimiento de la cepa en las condiciones antes mencionadas.

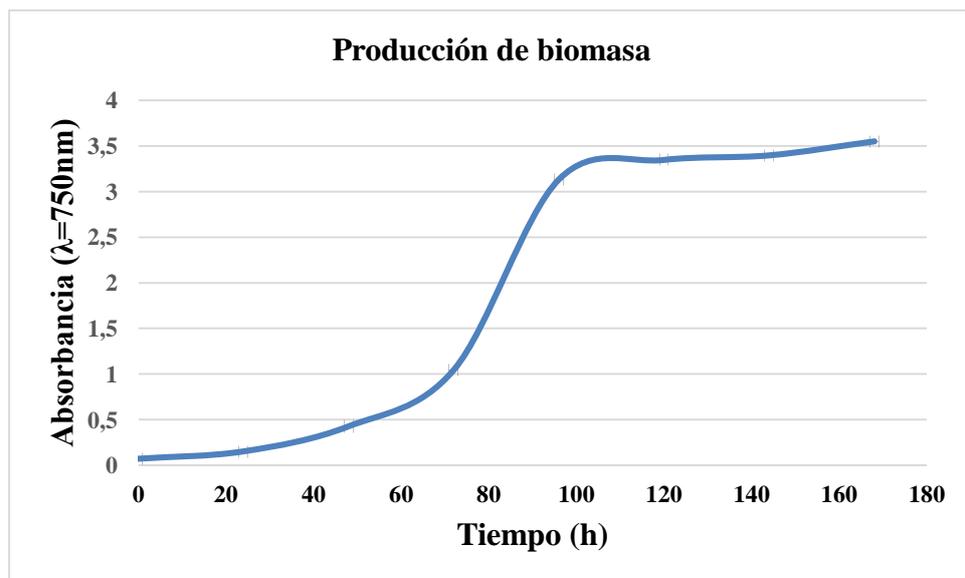


Figura 8. Crecimiento de *C. sorokiniana* en condiciones de mixotrofia.

En este caso no se empleó el método de conteo directo de células en cámara de Neubauer; se evaluó el crecimiento midiendo la absorbancia del cultivo a $\lambda=750\text{ nm}$, longitud de onda a la cual las clorofilas y otros pigmentos accesorios no interfieren. La velocidad máxima específica de crecimiento alcanzada fue de $0,9961\text{ días}^{-1}$, siendo superior a la obtenida en condiciones de autotrofia ($0,3\text{ días}^{-1}$). La velocidad alcanzada es semejante a valores obtenidos en otras investigaciones como la desarrollada por

Ribeiro y colaboradores (2019) siendo de 0.94 días^{-1} para *C. sorokiniana*, e incluso superior a las referidas por Kim et al. (2013; 2013a) siendo 0.44 días^{-1} en cultivo mixotrófico y 0.53 días^{-1} en heterotrofia. Otros estudios donde se establecen condiciones óptimas de cultivo para *C. sorokiniana*, se logran velocidades de crecimiento mayores a las obtenidas en este proyecto, Según Lizzul et al. (2018) la cepa *C. sorokiniana* UTEX 1230 alcanzó una velocidad máxima de 0.12 h^{-1} utilizando como fuente de carbono acetato de sodio a 2 g/L . El crecimiento microalgal se desarrolló en un biorreactor con condiciones controladas de pH, temperatura, intensidad lumínica y contaba con suministro controlado de CO_2 . Resultados similares obtuvo Kumar et al. (2014) en igual ensayo de optimización de la producción de biomasa de la microalga.

En general, la velocidad específica de crecimiento del microorganismo dependerá tanto de las condiciones bióticas como abióticas del ambiente donde se desarrolle. Si se le proporcionan las condiciones óptimas de cultivo se alcanzará una mayor velocidad de crecimiento, se producirá una mayor cantidad de biomasa y los tiempos de producción se reducirán. En cuanto a la producción de biomasa bajo las condiciones de cultivo impuestas se obtuvo 1.88 g/L . Este resultado es semejante al obtenido por Mondal et al. (2017), donde empleando melaza como fuente de carbono obtuvieron 1.55 g/L de biomasa de *Chlorella* sp. En un estudio donde se emplearon diferentes fuentes de carbono (glucosa, fructosa, galactosa y xilosa) a diferentes concentraciones se observó la mayor producción de biomasa para *C. sorokiniana* UTEX 1230 (1.833 g/L) a una concentración de glucosa de 16 g/L . Los autores infieren que no hay diferencia importante entre el crecimiento a 16 g/L y 4 g/L del carbohidrato (Chai et al. 2018).

5.3 Obtención del extracto metanólico.

La colecta de la biomasa se realizó por centrifugación a $5\ 000\text{g}$ durante 15 minutos en tubos corning de 50 mL . Terminado el proceso de centrifugación, se procedió a resuspender con solución salina ($0.85\% \text{ NaCl}$) la biomasa y dispensarla en frascos de cristal a razón de 3 mL por frasco. Los frascos de liofilización se pesaron vacíos y después del proceso de secado para la determinación del peso de la biomasa. Una vez liofilizada la biomasa se pasó para un frasco ámbar donde se resuspendió en metanol

al 100%. Generalmente se hace una dilución 1:3 para la obtención del extracto; en este caso se obtuvo 5.6699 g de biomasa seca los cuales fueron diluidos en 17 mL del solvente. Durante 48 horas se mantuvo en agitación moderada la mezcla y concluido el tiempo de extracción, se dispensó en viales de 2 mL, a 1 mL por vial. Para lograr la evaporación del solvente y lograr la sequedad total del extracto se colocaron los viales en un desecador al vacío por 6 horas. Los viales fueron pesados vacíos y luego del proceso de secado para determinar el peso seco por vial. El total el extracto obtenido fue de 136 mg.

El proceso de obtención del extracto metanólico (EM) se realizó por el método antes mencionado debido al poco volumen a procesar el cual fue suficiente para las pruebas de citotoxicidad en las líneas celulares evaluadas. Para la determinación de los compuestos presentes en el EM, se necesitaba al menos un gramo del extracto, por ende, se triplicó el volumen de trabajo. Debido al aumento del volumen, el paso de evaporación del solvente se realizó por medio de rotaevaporación (Rotaevaporador Büchi R-3000, Postfach, Suiza) y posterior secado al vacío. Los pasos de colecta, concentración y liofilización de la biomasa se realizaron por la vía antes descritas.

Varios han sido los métodos propuestos para la obtención del extracto y los solventes utilizados. Reyna *et al.*, (2018) refieren el uso del método de extracción sólido-líquido Soxhlet empleando como solvente el metanol. La actividad citotóxica observada del EM frente a la línea de linfoma murino L5178Y-R demostró que el método mantiene las propiedades biológicas de los compuestos presentes en el extracto. Otros autores proponen la disrupción celular como parte del proceso. Los métodos de disrupción más empleados son la sonicación, ruptura por microesfera, choque osmótico, tratamiento con tensoactivos y macerado (Safafar *et al.* 2015; Ramola *et al.* 2019). Entre los solventes más usados además del metanol, se encuentra el etanol, el hexano y el cloroformo. Según la naturaleza química del solvente será la composición del extracto.

5.4 Evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* del extracto metanólico contra las líneas celulares MCF-7, HT29, Vero y L5178Y-R

La evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* del extracto metanólico contra las líneas celulares MCF-7, HT29, Vero y L5178Y-R se realizó según lo descrito en la sección 4.5. Como se observa en la figura 9, el EM mostró una citotoxicidad superior al 70% contra la línea celular MCF-7 a una concentración de 500 µg/mL (Figura 9), observándose una concentración media inhibitoria (IC₅₀) de 266.14 ± 7.13. En cambio, en las restantes concentraciones no se observó efecto significativo. MCF-7 es una línea celular de adenocarcinoma de mama muy empleada para evaluar la actividad antitumoral de diferentes fármacos o compuestos extraídos de diversas fuentes como microorganismos, plantas, animales, moluscos o insectos. Esta línea celular ha mostrado ser susceptible a la luteína. Según Li et al. (2019), la luteína ejerce un papel supresor de la viabilidad e induce la apoptosis en las células de cáncer de mama MDA-MB-157 y MCF-7. En este experimento los investigadores observaron, que tanto en condiciones normales como de hipoxia (baja concentración de oxígeno) se lograba una disminución de la viabilidad celular dependiente de la concentración del pigmento. Resultados semejantes obtuvieron Gong *et al.* (2018), quienes determinaron que el efecto citotóxico producido por la luteína en células de cáncer de mama se debe en gran medida al incremento de especies reactivas del oxígeno en el interior celular. Es conocido que la especie *C. sorokiniana* presenta una alta concentración de luteína (Kumar *et al.* 2014; Safafar *et al.* 2015) siendo uno de los pigmentos más representativos de la microalga. Por lo antes mencionado hay indicios que podrían sugerir que el efecto citotóxico observado en contra de la línea MCF-7 se deba a la producción de luteína por la microalga, el cual podría estar presente en el EM.

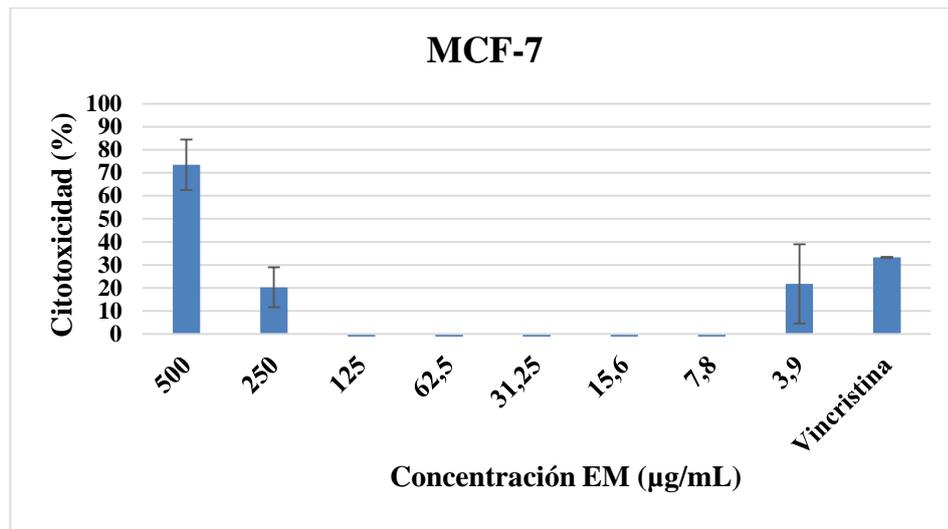


Figura 9. Valores de citotoxicidad obtenidos al enfrentar el EM contra la línea celular MCF-7. Se empleó como control positivo vincristina 0.5 µg/mL, medio RPMI + Metanol 1% como control negativo.

Para HT29 los resultados fueron diferentes como se muestra en la figura 10. Ninguna concentración evaluada superó el 30% de citotoxicidad, alcanzándose el máximo valor de 27.53% a una concentración de 15.625 µg/mL. A diferencia del efecto en MCF-7, en HT29 si se observó un efecto negativo en la viabilidad celular, para todas las concentraciones evaluadas. Sin embargo, no se considera como un resultado relevante. Generalmente esta línea de adenocarcinoma colorrectal presenta resistencia a muchos fármacos. El hecho de que el EM haya presentado un efecto bajo citotoxicidad no significa que la especie *C. sorokiniana* no produzca un compuesto con actividad antitumoral. En efecto, se ha demostrado como un componente activo de la membrana de la pared celular de esta microalga inhibe el crecimiento de HT29 y activa la inmunidad antitumoral del hospedero (Ishiguro *et al*, 2020). En una investigación realizada por Zhang y colaboradores (2019) se observó el efecto citotóxico de exopolisacáridos obtenidos de *Chlorella zofingiensis* y *Chlorella vulgaris* contra la línea de cáncer colorrectal HCT8 (28.3, y 18.0%, respectivamente a una concentración de 0.6 mg/mL). Los compuestos fueron obtenidos del sobrenadante del cultivo celular y estaba conformado por D-Manosa, Ribosa, Ramnosa, Glucosamina, D-Galactosa como componentes principales.

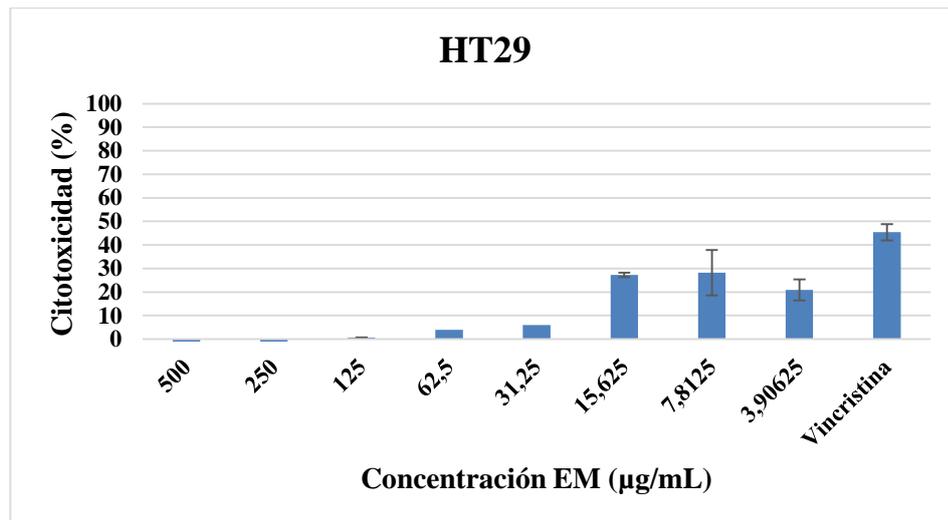


Figura 10. Valores de citotoxicidad obtenidos al enfrentar el EM contra la línea celular HT29. Se empleó como control positivo vincristina 0.5 µg/mL, medio RPMI + Metanol 1% como control negativo.

La línea celular de linfoma murino L5178Y-R había mostrado susceptibilidad ante el extracto metanólico obtenido en condiciones de autotrofia en un trabajo previo (Reyna *et al.* 2018). En este proyecto se evaluó la actividad citotóxica del EM obtenido en condiciones de mixotrofia y se observó la mayor citotoxicidad a las concentraciones 250 µg/mL y 500 µg/mL, siendo de 49.86 y 81.83 respectivamente (Fig. 11). La concentración media inhibitoria fue de 230.12 ± 4.16 . Este resultado sugiere que la actividad biológica que presentan los compuestos que conforman el EM no depende del modo de cultivo de la microalga. El cultivo en condiciones fotoautótrofas a pesar de presentar requerimientos nutricionales simples es muy tardado; en cambio, el crecimiento en heterotrofia garantiza una mayor producción de biomasa en un menor tiempo. Por tanto, que la cepa siga sintetizando los compuestos de interés en condiciones mixótrofas representa una gran ventaja.

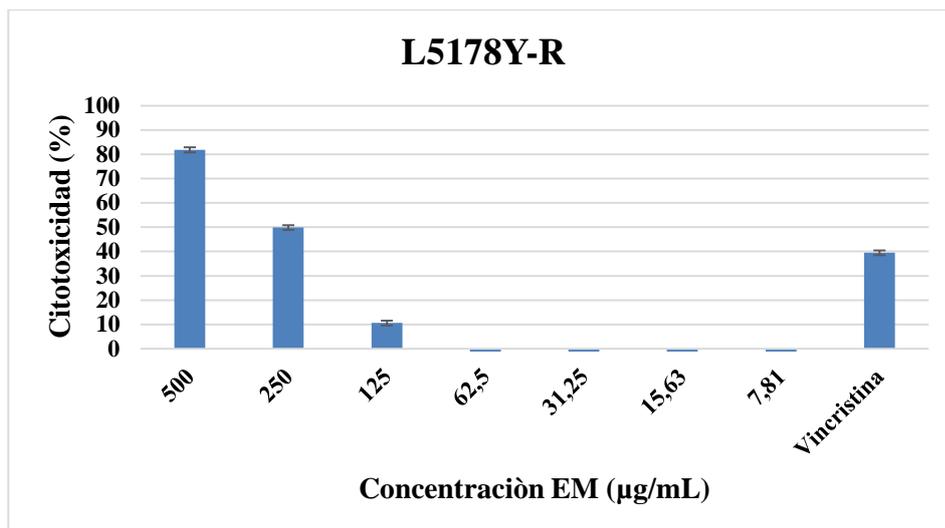


Figura 11. Valores de citotoxicidad obtenidos al enfrentar el EM contra la línea celular L5178-R. Se emple3 como control positivo vincristina 0.5 µg/mL, medio RPMI + Metanol 1% como control negativo.

La viabilidad de las células Vero no se afect3 al enfrentarlas al EM. Los valores de citotoxicidad no fueron superiores al 16% como se observa en la figura 12. Este resultado indica que el EM no presenta una toxicidad importante en contra de una línea celular sana. Debemos señalar que la línea celular Vero proviene de origen animal y a pesar de ser muy empleada para evaluar la citotoxicidad en células no tumorales, sería útil el evaluar la toxicidad de los compuestos contra líneas no tumorales humanas, objetivo que excede los alcances de este proyecto.

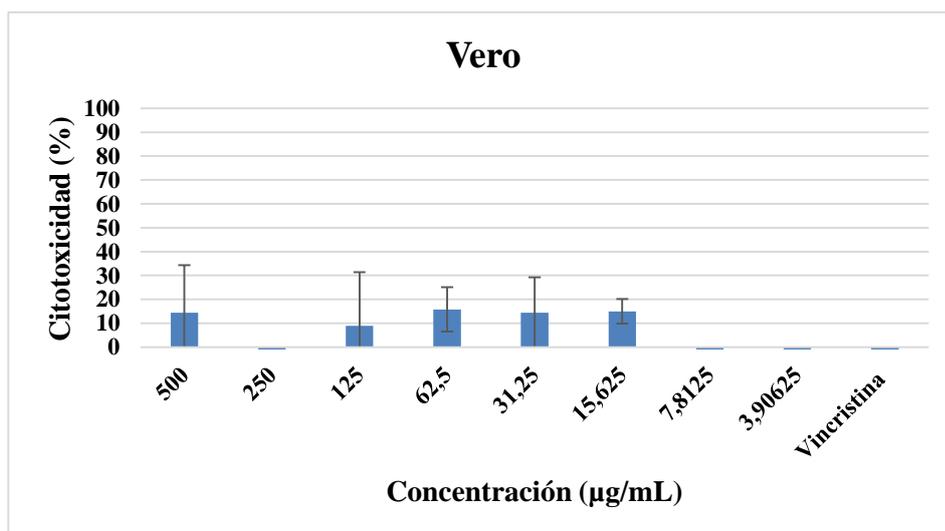


Figura 12. Valores de citotoxicidad obtenidos al enfrentar el EM contra la línea celular Vero. Se emple3 como control positivo vincristina 0.5 µg/mL, medio RPMI + Metanol 1% como control negativo.

5.5 Obtención de las fracciones del Extracto Metanólico

El fraccionamiento del extracto metanólico se llevó a cabo como se indica en la sección 4.6. Se observó una mejor separación de los compuestos cuando se empleaba una mezcla de acetato de etilo y n-hexano en una proporción 1:1. El fraccionamiento se realizó en columna empleando gel de sílice como fase estacionaria y la mezcla antes mencionada como fase móvil. El colectado de cada fracción fue evaporado para eliminar los solventes y concentrar su contenido. Se obtuvieron 7 fracciones con un total aproximado de 12 manchas que se observaron por medio de cromatografía en capa fina. En la Fracción 1 se definen dos manchas hacia la parte superior de la placa cromatográfica. La primera es de color amarillo y la segunda solo es visible a un $\lambda=365$ nm. La Fracción 2 presentó 4 manchas que migraron justo debajo de los compuestos de la Fracción 1 como se muestra en la figura 13. Las Fracciones 3 y 4 presentaron compuestos muy parecidas por lo que se decidió unir ambas en una sola. Las fracciones 3 y 4, así como la 5, 6 y 7 también mostraron compuestos muy parecidos, pero se encontraban más separados por lo que se decidió no unir las fracciones. En la figura 13 se muestran las placas cromatográficas correspondientes a cada fracción. El color verde indica la presencia de pigmentos como la clorofila a y b, componentes de las antenas recolectoras de la energía luminosa. El color amarillo-naranja se debe a compuestos como carotenoides o xantofilas que muestran esa coloración característica. En el caso de las microalgas clorofitas como *C. sorokiniana*, es común la presencia de clorofila a y b, además de pigmentos accesorios como luteína y violaxantina (Morançais *et al.*, 2018).

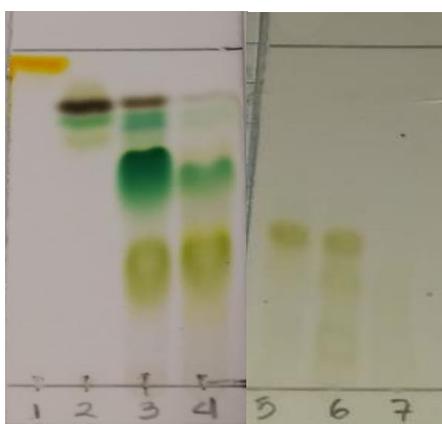


Figura 13. Fracciones obtenidas del EM empleando Acetato de etilo y n-hexano 1:1.

5.6 Evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de las fracciones del extracto metanólico contra la línea celular MCF-7

Una vez obtenidas las fracciones del EM, se procedió a evaluar su actividad biológica únicamente contra la línea MCF-7, la cual fue seleccionada por mostrarse susceptible hacia el extracto. Como se muestra de las figuras 14-19, las fracciones no mostraron citotoxicidad ante la línea celular. El máximo valor de citotoxicidad observado fue de 21,94% y se obtuvo en la fracción 4 a la concentración de 500 µg/mL. Los restantes valores no superaron el 20% de citotoxicidad. Se debe tener en cuenta que el EM es una mezcla compleja de compuestos que desempeñan diferentes funciones en el metabolismo celular y que algunos de estos presentan actividad citotóxica contra células cancerígenas. La pérdida de la actividad biológica observada después del fraccionamiento sugiere principalmente 2 factores: El efecto mostrado contra las células cancerígenas se debe a la acción sinérgica de los compuestos del EM y no a la actividad individual de uno en particular; La columna, los solventes y la metodología propia del fraccionamiento generan pérdida y/o modificación de los compuestos presentes en el EM. Los compuestos con actividad anticancerígena presentan diferentes mecanismos de acción y pueden dañar el genoma celular (Reyna *et al.*, 2018; Shilpa *et al.*, 2020), la membrana citoplasmática (Zhang *et al.*, 2019), producir especies reactivas del oxígeno en el citoplasma (Gong *et al.*, 2018) y activar proteínas mediadoras de la apoptosis celular (Reyna *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). Estos daños por separado en la mayoría de los casos pueden ser solventados por el propio sistema de reparación celular, pero juntos ocasionan inevitablemente la muerte de la célula. Aunque esta sería una premisa que nos acerca a determinar el por qué de la pérdida del efecto, también observamos que durante el proceso de fraccionamiento se perdieron y/o modificaron algunos compuestos, dado que resultados posteriores nos corroboraron que la composición del EM y de las Fracciones no sea la misma.

Si bien la pérdida de la actividad biológica mostrada por el extracto metanólico se infiere que fue resultado del fraccionamiento, hay otro factor que se debe tener en cuenta. El proceso de secado de la biomasa para la obtención del extracto que se utilizó en el fraccionamiento fue diferente al empleado para las primeras pruebas de citotoxicidad. El primer secado de la biomasa se realizó por liofilización al requerirse procesar un volumen de cultivo pequeño; en cambio para el fraccionamiento, dado que el volumen de biomasa con el cual se trabajó era bastante mayor, el secado se realizó

por pulverización. En dicha técnica, el líquido de alimentación se atomiza en pequeñas gotas dentro de una cámara en la que se genera un vacío y se evapora el agua por calor. Durante el proceso de secado la biomasa pasa por un gradiente de temperatura de 50 a 80°C por un corto periodo de tiempo. Es posible que ocurra una degradación de los compuestos que presenten la actividad biológica de interés por la acción del calor al que se somete la biomasa. No obstante, esta premisa no aplica para compuestos como carotenos y xantofilas debido a que a la máxima temperatura alcanzada no se afecta su estabilidad. De hecho, muchas metodologías de extracción de carotenos presentan una etapa donde se le aplica calor a la muestra (Cardoso *et al.*, 2017; Reyna *et al.*, 2018; Cerón *et al.*, 2018; Gheonea *et al.*, 2019). Según Cerón y colaboradores (2018), para el género *Chlorella* sp. la temperatura óptima para la extracción de carotenos a partir de biomasa seca fue de 80°C. La metodología empleada se basó en la extracción de las biomoléculas con solventes como metanol, hexano y agua en baño de agua por 5 minutos. Entre los carotenoides encontrados por los investigadores estaba la luteína, zeaxantina y β -caroteno. En otro estudio realizado por Gheonea y colaboradores (2019), se demostró que la degradación térmica de los carotenoides, licopenos y β -carotenos se producía a temperaturas superiores a los 100°C durante periodos de tiempo superiores a los 5 minutos, a estas temperaturas y durante prolongados periodos de tiempo los investigadores también observaron la disminución de la concentración y la pérdida de actividad antioxidante de los mismos. Reyna y colaboradores (2018) emplearon el método de extracción sólido-líquido Soxhlet para la obtención del extracto metanólico (el cual calienta los solventes durante más de 24 horas) y aun así observaron actividad citotóxica del mismo contra la línea de linfoma murino L5178Y-R. Por lo antes mencionado, se puede desestimar la degradación de compuestos como carotenos y xantofilas durante el proceso de secado por pulverización. Debemos señalar que en el EM se encuentran otros compuestos, ácidos grasos, macrólidos, amidas, polisacáridos sulfatados y flavonoides (Talero *et al.* 2015; Intan *et al.* 2018) los cuales si bien, han sido poco referidos en la literatura como agentes tóxicos para las células cancerígenas, podrían en acción sinérgica provocar la muerte celular. No obstante, para la degradación de los biocompuestos mencionados se necesitaría de altas temperaturas y de tiempos de exposición prolongados. La metodología empleada no sobrepasa los 80°C de temperatura máxima y el secado tarda menos de un minuto desde que entra la biomasa en suspensión hasta que se recolecta deshidratada.

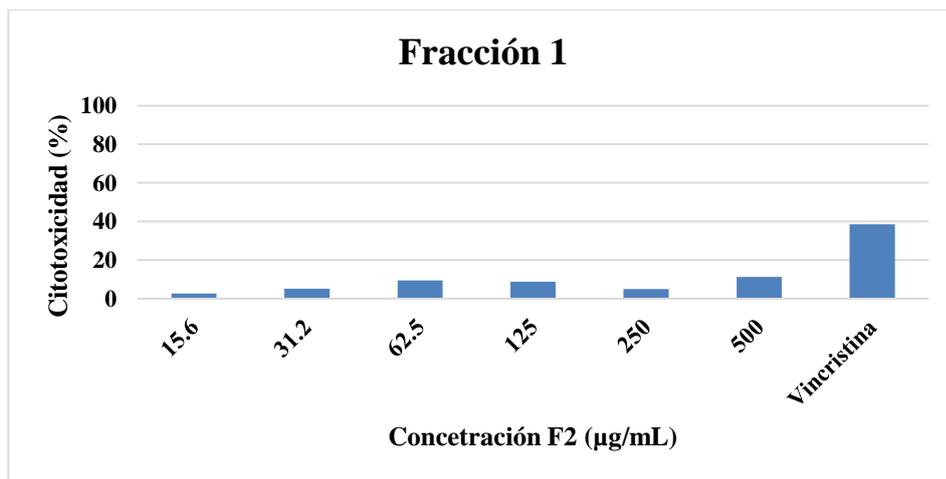


Figura 14. Enfrentamiento de la Fracción 1 del EM contra la línea celular MCF-7. Se empleó como control positivo vincristina 0.5 µg/mL, medio RPMI + Metanol 1% como control negativo.

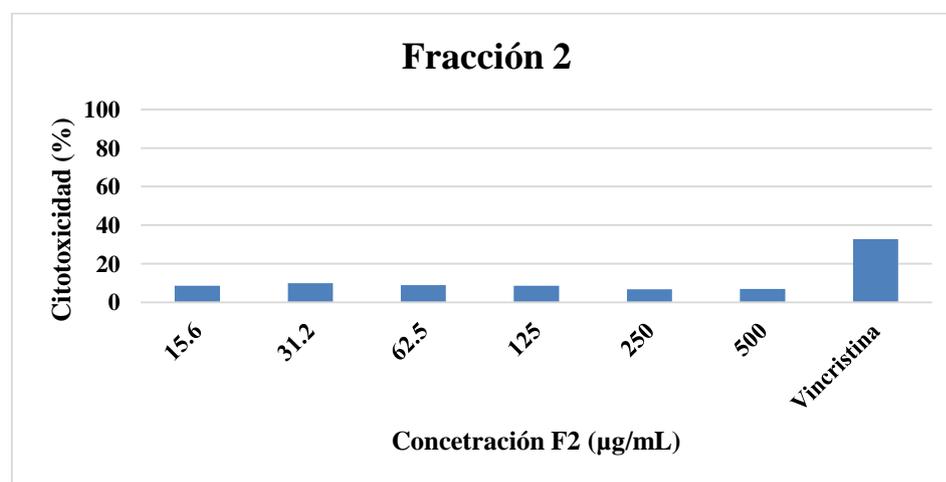


Figura 15. Enfrentamiento de la Fracción 2 del EM contra la línea celular MCF-7. Se empleó como control positivo vincristina 0.5 µg/mL, medio RPMI + Metanol 1% como control negativo.

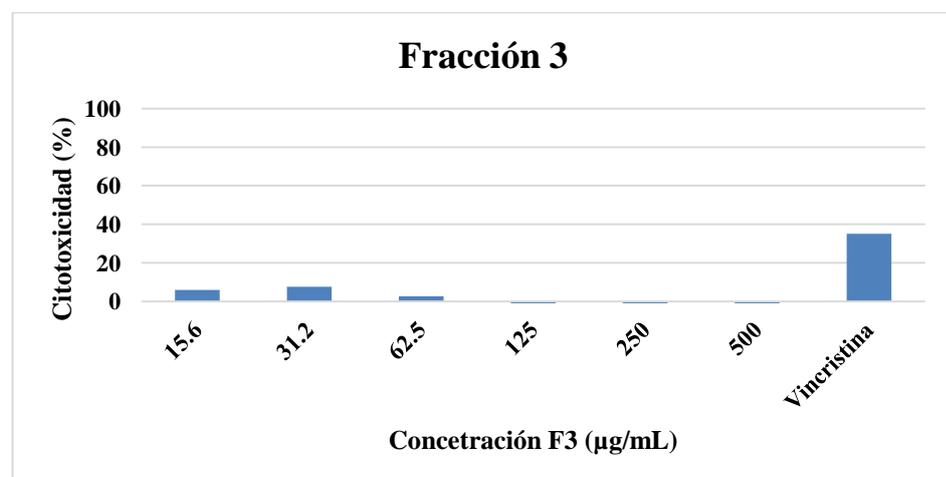


Figura 16. Enfrentamiento de la Fracción 3 del EM contra la línea celular MCF-7. Se empleó como control positivo vincristina 0.5 µg/mL, medio RPMI + Metanol 1% como control negativo.

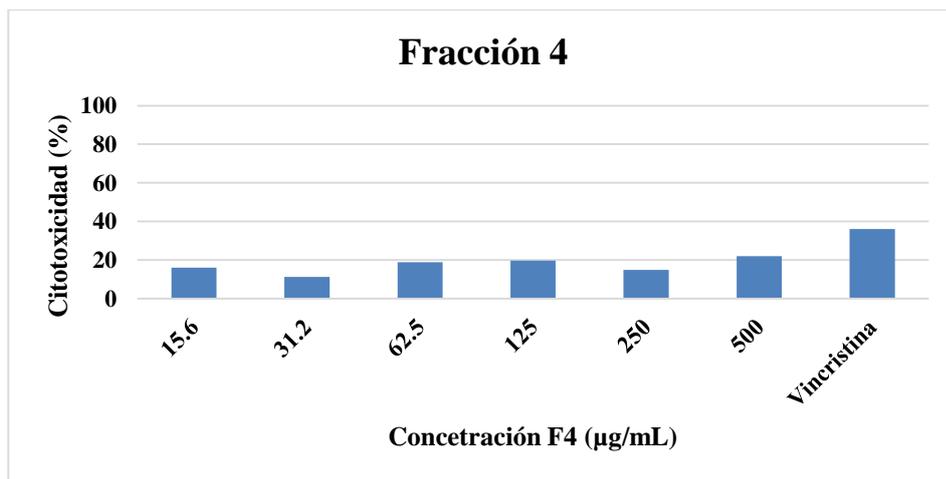


Figura 17. Enfrentamiento de la Fracción 4 del EM contra la línea celular MCF-7. Se empleó como control positivo vincristina 0.5 µg/mL, medio RPMI + Metanol 1% como control negativo.

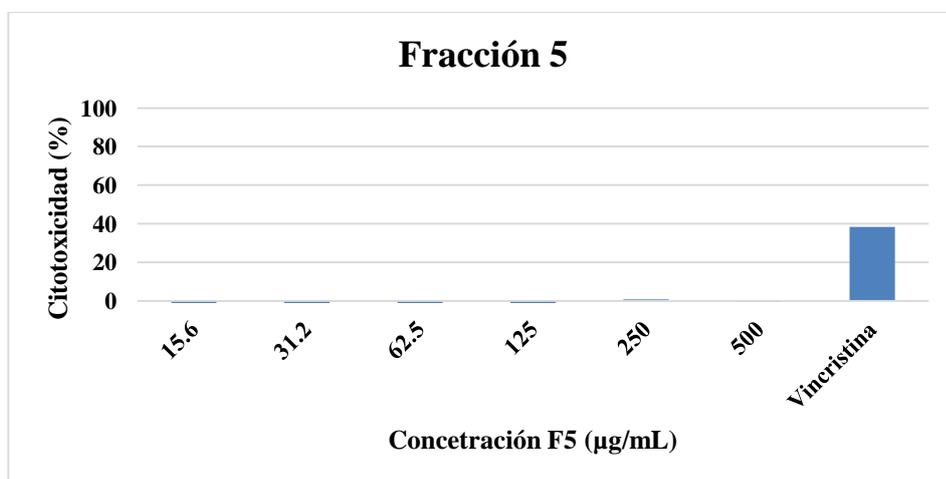


Figura 18. Enfrentamiento de la Fracción 5 del EM contra la línea celular MCF-7. Se empleó como control positivo vincristina 0.5 µg/mL, medio RPMI + Metanol 1% como control negativo.

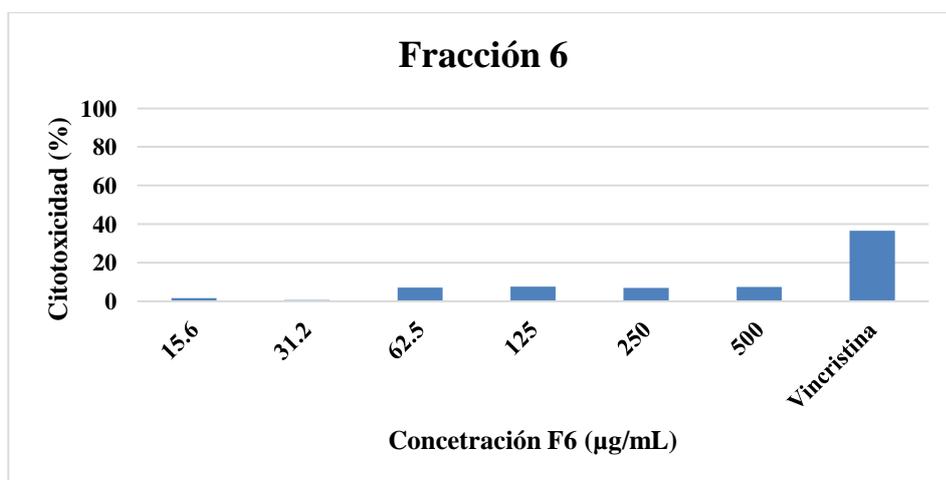


Figura 19. Enfrentamiento de la Fracción 6 del EM contra la línea celular MCF-7. Se empleó como control positivo vincristina 0.5 µg/mL, medio RPMI + Metanol 1% como control negativo.

5.7 Compuestos identificados del extracto metanólico mediante la técnica cromatográfica UPLC MS

La caracterización del extracto metanólico mediante la técnica cromatográfica UPLC MS demostró la diversidad de componentes que conforman el extracto. Como se esperaba, se observó la presencia de compuestos carotenoides, flavonoides y fenólicos como el ácido elaguico acetil xilósido, el hidrato de catequina, la cianidina, el fitoflueno y la isoquercitrina (Tabla 3). A continuación, se describen los componentes presentes en el EM que han sido reportados con la actividad biológica buscada y que no se encontraron en las fracciones.

Tabla 2. Compuestos detectados en el EM de *Chlorella sorokiniana*.

Tr (min)	% Área	MW	Fórmula condensada	Compuesto	Clasificación
0.989	0.20	476.31	C ₂₁ H ₁₆ O ₁₃	Ácido Elaguico Acetil Xilósido	Fenólico
1.168	3.56	103.03	C ₄ H ₉ NO ₂	Ácido Gamma-Aminobutírico	Aminoácido
1.387	4.90	490.26	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Hidrato de catequina	Flavonoide
1.499	2.08	288.23	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	Cianidina	Flavonoide
1.530	5.71	414.23	C ₂₉ H ₅₀ O	Beta-sitosterol	Fitoesterol
1.558	4.64	504.27	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	Maltotriosa	Carbohidrato
1.613	9.49	103.03	C ₄ H ₉ NO ₂	L-alpha-Ácido Aminobutírico, o D-alpha-Ácido Aminobutírico	Aminoácido
1.781	1.50	510.22	C ₂₉ H ₅₁ O ₅ P	alfa-Tocoferol fosfato	Prenolípido
1.871	0.47	542.05	C ₄₀ H ₆₂	Fitoflueno	Carotenoide
1.896	0.47	358.28	C ₂₁ H ₄₀ O ₄	Monooleín	Glicolípido
2.428	0.90	483.34	C ₂₆ H ₄₅ NO ₅ S	Litocolilaurina	-
2.493	1.72	396.35	C ₂₈ H ₄₄ O	Ergosterol	Esterol
2.58	0.70	307.34	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	Glutación	Aminoácido
3.556	0.13	464.55	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Isoquercitrina	Flavonoide

Tabla 2. Compuestos detectados en el EM de *Chlorella sorokiniana*.(Continuación)

Tr (min)	% Área	MW	Fórmula condensada	Compuesto	Clasificación
4.016	0.51	740.73	C ₄₁ H ₇₄ NO ₈ P	PC(15:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	Glicerofosfolípido
4.506	0.036	338.60	C ₁₂ H ₁₈ O ₁₁	Ácido L-Ascórbico 2-glucósido	Vitamina C
5.30	0.21	146.42	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	Glutamina	Aminoácido
5.78	0.16	278.41	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	Gamma Ácido linolénico	Ácido graso
6.730	0.05	252.52	C ₁₆ H ₂₈ O ₂	Ácido hexadecadienóico	Ácido graso
7.054	0.10	398.32	C ₂₈ H ₄₄ O	Ergosterol isomero	Fitoesterol
7.610	0.36	598.0	C ₄₀ H ₅₂ O ₄	Astaxantina	Terpeno
7.698	0.06	290.28	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	(+)-Catequina	Flavonoide
8.897	0.11	78.63	C ₆ H ₆	Benceno	Hidrocarburo aromático
9.016	0.64	168.15	C ₉ H ₁₀ O ₃	Ácido Metoxifenilacético	Fenólico
9.275	4.59	553.09	C ₂₄ H ₄₃ N ₉ O ₆	Gly-Pro-Arg-Pro-Lys	Péptido
9.87	0.06	228.46	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	Ácido mirístico	Ácido graso
10.219	0.14	239.42	C ₁₁ H ₁₃ NO ₅	(3s)-3-(Benziloxi)- Ácido L-Aspártico	Aminoácido
10.735	0.46	767.53	C ₄₃ H ₇₆ NO ₈ P	1-[11Z,14Z-eicosadienoil]-2-[6Z,9Z,12Z-octadecatrienoil]-glicero-3-fosfoetanolamina	Glicerofosfolípido
11.183	0.75	584.19	C ₄₀ H ₅₆ O ₃	Anteraxantina	Carotenoide
11.371	0.12	304.19	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	Ácido araquidónico	Ácido graso
11.92	0.17	884.30	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆	Gliceril trioleato	Glicerofosfolípido
12.205	0.25	430.51	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	alpha-Tocoferol	Caroteno
12.303	10.28	622.25	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	Isoramnetina 3-O-glucósido 7-O-ramnósido	Flavonoide
13.042	0.095	326.04	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	Ácido Heneicosanóico	Ácido graso

5.7.1 Ácido Elaguico Acetil Xilósido

Derivados del ácido elaguico (EA) así como el propio ácido han sido referidos como bioactivos que presentan actividad inhibitoria de proliferación en células cancerosas. Según Saadullah y colaboradores (2020), el ácido 2,3,8-tri-O-metil elaguico y el ácido 3-O-metil elaguico 4-O-β-D-glucopiranososa presentaron efecto citotóxico ante una gran variedad de líneas celulares como la de leucemia linfocítica murina P-388 (IC₅₀ = 3.60 y 2.40 µg/mL, respectivamente), la de cáncer de colon humano Col-2 (IC₅₀ = 0.76 y 0.92 µg/mL, respectivamente) y la de cáncer de mama MCF-7 (IC₅₀ = 0.65 y 0.54 µg/mL, respectivamente). Ambos derivados demostraron también una gran actividad antioxidante. Otro derivado del ácido elaguico, el ácido 4,4'-di-O-metil elaguico, mostró actividad supresora de la proliferación de la línea celular de cáncer de colon HT-29 mediante la modulación de la vía de señalización WNT, lo que le confiere un gran potencial anticancerígeno (Ramírez *et al.*, 2015). La actividad antitumoral del EA se ha atribuido principalmente a los efectos antiproliferativos y apoptóticos directos. Además, el EA puede inhibir la migración de las células tumorales, la invasión de la matriz extracelular y la angiogénesis, todos ellos procesos cruciales para el comportamiento infiltrativo del tumor y el proceso metastásico (Ceci *et al.*, 2018; Cheshomi *et al.*, 2021). El derivado de EA que identificamos en el extracto metanólico (ácido elaguico acetil xilósido) no ha sido reportado en la literatura con actividad biológica contra líneas celulares de cáncer; no obstante, su presencia en el extracto metanólico y ausencia en las fracciones, nos sugiere que al menos aporta a la actividad observada con el extracto.

5.7.2 Hidrato de Catequina

Otro compuesto que encontramos en el EM y no en las fracciones es el hidrato de catequina. La catequina en específico, es un antioxidante polifenólico generalmente producido por las plantas como un metabolito secundario y ha sido referida como un agente antiproliferativo de células cancerosas de mama (Evacuasiyany *et al.*, 2014; Xiang *et al.*, 2016; Burcu y Banu, 2020). Derivados como la epigalocatequina galato (EGCG) y la galatocatequina galato, han demostrado elevada actividad citotóxica contra las líneas celulares MCF-7 y T47D, respectivamente (Evacuasiyany *et al.*, 2014). Además, presentan un gran potencial antioxidante. Una bebida rica en catequinas es el té verde hecho de hojas de *Camellia sinensis*; siendo la epigalocatequina galato la más abundante. Hay estudios que infieren una relación entre la ingesta de esta bebida y la

disminución de la incidencia de cáncer de mama en ciertos grupos poblacionales. Según Xinag y colaboradores (2016), las catequinas actúan mediante diferentes mecanismos de acción como: supresión del aumento de especies reactivas del oxígeno inducidas por carcinógenos y del daño al ADN, regulando la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR por inhibición de las proteínas PI3K y mTOR, induciendo apoptosis en células cancerosas de mama e impidiendo su proliferación y mediante el bloqueo del promotor del factor de crecimiento vascular endotelial generalmente por la EGCG que impide la angiogénesis tumoral. Otro potencial uso de las catequinas es como agente modulador de la resistencia múltiple a fármacos durante la quimioterapia. Przystupski y colaboradores (2020), demostraron como la incubación previa de células humanas de cáncer de ovario SKOV-3 con hidrato de catequina potenciaba la actividad del cisplatino, al promover la apoptosis y cambiar la actividad de las proteínas de membrana implicadas en el metabolismo, la captación y el eflujo del fármaco. Por lo antes mencionado y teniendo en cuenta que el hidrato de catequina representa el 4.9% del extracto, podemos inferir que dicho compuesto es un potencial responsable de la actividad citotóxica observada al enfrentar el EM contra la línea MCF-7

5.7.3 Cianidina

La cianidina representó un 2.08% del EM crudo y no se observó en las fracciones. Es un antioxidante natural con propiedades para captar radicales libres y bloquear los efectos nocivos sobre el organismo que estos tienen. Se ha reportado previamente como un agente tóxico de diferentes líneas celulares cancerosas como MCF-7, HuH-7, HepG2, Caco-2 y U87 (Takeuchi et al., 2011; Tang et al., 2015; Hosseini et al., 2019). Takeuchi y colaboradores (2011), examinaron los efectos de la cianidina y el cianidín-3-glucósido sobre especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares y sobre los efectos proliferativos, utilizando cuatro líneas celulares de cáncer MCF-7, HuH-7, HepG2, Caco2 y una línea celular sana HUVEC. Los investigadores observaron que la cianidina inhibió la proliferación de MCF-7, HuH-7, HepG2 y Caco-2, pero la cianidina-3-glucósido no lo hizo. En el caso de MCF-7 se inhibió la proliferación celular en un 47% a una concentración 200 µg/mL. Investigaciones más recientes han demostrado que la cianidina-3-glucósido (C3G) presenta actividad citotóxica contra MCF-7. Según Mirmalek y colaboradores (2019), este compuesto tiene efectos citotóxicos dosis dependiente y se alcanza una disminución de la viabilidad de la línea celular del 51.1% 24 h después de la exposición a C3G. Además, durante igual tiempo

de exposición, se produjo un incremento de la expresión de genes vinculados a la inducción de la apoptosis celular. Los resultados de este estudio demostraron que el C3G tiene efectos apoptóticos y citotóxico en las células del cáncer de mama. Aunque el mecanismo de acción de la cianidina no ha sido esclarecido, se ha comprobado que al igual que la C3G disminuye la viabilidad celular e induce la apoptosis (Tang *et al.*, 2015).

5.7.4 Fitoflueno

Es un compuesto de tipo carotenoide que estructuralmente es muy parecido al licopeno. Aunque no se ha referido en la literatura como un compuesto que presente actividad biológica sobre MCF-7 no implica que no la tenga. De hecho, los carotenoides del tipo licopeno o fitoflueno son precursores de bioactivos como el β -caroteno, luteína, astaxantina, zeaxantina y violaxantina, los cuales sí han mostrado ser tóxicos a ciertas líneas celulares (Rodríguez, 2017; Talero *et al.* 2015; Intan *et al.* 2018). En el caso del licopeno, se ha referido su habilidad para inducir apoptosis mediante la regulación de proteínas anti-apoptóticas como Bcl2 o BclXL y pro-apoptóticas como Bax, Bad y Bim. Además, inhibe el comienzo de tumores en el hígado por diferentes mecanismos como la supresión de las enzimas del citocromo p450 2E1 (involucrados en la activación de procarcinógenos) y en la disminución de especies reactivas del oxígeno (Mekuria *et al.*, 2020). Un aspecto muy importante de este grupo de compuesto es que actúan de forma sinérgica. Según Linnewiel y colaboradores (2015), las combinaciones de varios carotenoides (por ejemplo, licopeno, fitoeno y fitoflueno), o carotenoides y polifenoles (por ejemplo, ácido carnósico y curcumina), inhiben sinérgicamente la actividad del receptor de andrógenos y activan el sistema electrófilos/antioxidantes EpRE/ARE. Los investigadores utilizaron genes reporteros de la actividad transcripcional del receptor de andrógenos en células de cáncer de próstata hormono dependientes y del sistema de transcripción del elemento de respuesta a EpRE/ARE. Comprobado que La activación de EpRE/ARE fue hasta cuatro veces mayor que la suma de las actividades de cada uno de los compuestos, lo que constituye una estable y fuerte sinergia. Es posible que el efecto observado sobre la línea celular de cáncer de mama no haya sido generado por una sola molécula o grupo químicamente semejante; el accionar sinérgico de los componentes del EM y sus diferentes dianas en la célula, imposibilitan la recuperación celular y por ende la muerte.

5.7.5 Astaxantina y Antheraxantina

Ambos compuestos son carotenoides del grupo de las xantofilas y representan el 1.11% del EM crudo total. Son compuestos que presentan actividad tanto antioxidante, como antitumoral. La astaxantina ha demostrado la inhibición del crecimiento de líneas celulares de cáncer colorrectal humano (CRC), incluyendo las líneas celulares HCT-116, HT-29, LS-174, WiDr y SW-480 (Palozza *et al.* 2009). Además, su actividad antioxidante impide la genotoxicidad y la citotoxicidad de las especies reactivas del oxígeno (El-Hacka *et al.* 2019). Según Sun y colaboradores (2020), el tratamiento de células de cáncer de próstata DU145 con astaxantina disminuyó la capacidad de clonación, aumentó el porcentaje de apoptosis y disminuyó las capacidades de migración e invasión de las células. Además, redujo la expresión de STAT3 a nivel de proteínas y ARNm. Otro mecanismo que se ha descrito para este compuesto es la detención del ciclo celular en la fase G0/G1 asociada a una baja regulación de la ciclina D1 en las células MCF-7. También se ha estudiado el efecto de una combinación de carotenoides (astaxantina, luteína y β -caroteno) sobre la progresión del ciclo celular de MCF-7, lo que sugiere que los carotenoides coadministrados redujeron la expresión de ciclina D1 en la fase G0/G1 más que por separado (Faraonea *et al.*, 2020). Es importante subrayar que no se han observado efectos de la astaxantina sobre la proliferación y la regulación del ciclo celular en las células epiteliales mamarias normales (MCF-10A) (Sowmya *et al.*, 2017). Antheraxantina igual ha sido reportada como un agente tóxico para células cancerosas. Cha y colaboradores (2008), demostraron la presencia en un extracto metanólico de *Chlorella elipsoidea* de esta xantofila junto con zeaxantina y violaxantina. Dicho extracto resultó ser tóxico contra células cancerosas humanas de colon HCT-116 induciendo la apoptosis celular. Cabe destacar que la violaxantina es el precursor inmediato superior de la antheraxantina, la cual se forma por una de-epoxidación de la primera. Al igual que compuestos anteriores, estas xantofilas actúan de forma sinérgica, incluso con carotenos como el β -caroteno. En la tabla 2 se muestran los compuestos identificados en el EM, su tiempo de retención en la columna (Tr), su área porcentual debajo de la curva y su peso molecular.

5.7.6 Isoramnetina 3-glucósido-7-ramnósido

La isoramnetina es un compuesto flavonoide que está presente en las hojas, flores y frutos de plantas como *Hippophae rhamnoides* L. y *Ginkgo biloba* L. El consumo de

los frutos u hojas de dichas plantas ha demostrado ser beneficioso para la salud humana al aliviar la tos y la flema, promover la circulación sanguínea y eliminar la estasis vascular, aliviar el dolor y el asma (Teng *et al.*, 2016). La isoramnetina, tiene un amplio espectro de efectos farmacológicos, como la protección cardiovascular, la antiinflamatoria, la antitumoral, la antioxidante, la antibacteriana y la antiviral (Gong *et al.*, 2020; Ferdous y Balia, 2021). Ha sido ampliamente informada su actividad antitumoral, debido a que inhibe el crecimiento de las células cancerosas de cuello uterino, de pulmón, de colon, de mama, de páncreas, de hígado y de estómago (Hu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2019). Se han descrito diferentes mecanismos de acción para la isoramnetina. Según Hu y Deng (2013), este bioactivo inhibe la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y BT-549, mediante la detención del ciclo celular en la fase G1 promoviendo la apoptosis. Los investigadores sugieren que este efecto es resultado de la inhibición de la fosforilación de AKT y ERK y la expresión del antígeno nuclear proliferante Ki67. Además, la isoramnetina provocó la disminución de la expresión de Bcl-2, causando posteriormente el aumento de la Caspasa-3 y la apoptosis celular. Otro mecanismo reportado es la regulación de las vías de transducción de señales de Ak y MEK. Wang y colaboradores (2018), demostraron que la isoramnetina reducía la fosforilación de MEK y ERK en la vía Ras/MAPK, y regulaba la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis en el cáncer de páncreas avanzado PANC-1. Derivados como la isoramnetina-3-glucurónido produce la detención del ciclo celular principalmente en la fase S, seguida de la disminución del número de células tumorales en las fases G0/G1 y G2/M por entrar en la fase temprana de apoptosis cuando fueron tratadas con 100 μ M durante 48 h. Además, observaron la producción intracelular de ROS (Wu *et al.*, 2018). Otro derivado glicosídico como la isoramnetina-3-O-ramnósido demostró un efecto citotóxico sobre la línea celular MCF-7, disminuyendo su viabilidad en un 51%. No así contra las líneas celulares HepG2 y A549 (Chen *et al.*, 2019). La obtención de isoramnetina 3-glucósido-7-ramnósido a partir de un extracto de la especie *Chlorella sorokiniana* no ha sido referida previamente en la literatura. Además, su demostrada actividad biológica contra diferentes líneas celulares cancerosas nos muestra un gran potencial como compuesto bioactivo. Una propiedad de mayor interés es que se encuentra glicosilado lo que aumenta su biodisponibilidad con respecto a sustancias semejantes como la quercetina.

5.8 Compuestos identificados de las fracciones mediante la técnica cromatográfica UPLC MS

Se realizó la identificación de los compuestos presentes en las fracciones para comprobar si se produjo durante el fraccionamiento, pérdida de bioactivos. Como se observa en la tabla 3, hubo una disminución de la cantidad de compuestos identificados para el EM. Podemos atribuir la principal causa de este fenómeno a la adsorción de cierto grupo de sustancias químicas a la fase estacionaria de la columna, sin embargo, existen muchos pasos en la metodología del fraccionamiento que pudieron influir. No obstante, se identificaron cuatro compuestos que se mantuvieron presentes tanto en el EM como en las fracciones y dos de estos han sido reportados por su actividad citotóxica y antiproliferativa contra varias líneas celulares de cáncer. Los metabolitos que se presentan en ambas partes son el beta-Sitosterol, el ergosterol, glutatión y glutamina.

Tabla 3. Compuestos detectados en las fracciones de *Chlorella sorokiniana*

Tr (min)	PM	%Área	Fórmula	Compuesto	Tipo de compuesto
0.459	124.16	0.59	C ₈ H ₁₂ O	Ciclohexanol, 1-etinil	Alcohol
1.324	170.05	1.05	C ₇ H ₆ O ₅	Ácido gálico	Compuesto fenólico
1.505	208.26	0.49	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	Cafeato de Etilo	Compuesto fenólico
1.538	414.26	16.30	C ₂₉ H ₅₀ O	β-Sitosterol	Esterol
1.914	636.75	1.35	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₆	Kaempferol 3-O-(6"-acetil-galactósido) 7-O-ramnósido	Flavonoide
2.541	396.40	3.73	C ₂₈ H ₄₄ O	Ergosterol	Esterol
2.854	308.30	1.15	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	Glutatión	Tripéptido
3.011	390.32	44.2	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	Ácido 5,5'-Dihidroferúlico	Compuesto fenólico
3.36	280.02	0.25	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Ácido linoléico	Ácido graso
3.57	393.67	0.43	C ₂₈ H ₅₈	Octacosano	Alcano
5.303	178.55	0.59	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	Ferulaldehído	Aldehído aromático
5.865	164.09	0.61	C ₆ H ₁₂ O ₅	Ramnosa	Carbohidrato
6.106	146.98	1.05	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	Glutamina	aminoácido
6.77	340.58	0.37	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	Ácido docosanoico	Ácido graso
7.961	520.25	0.61	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₄	5,3',4'-Trihidroxi-3-methoxy-6:7-metilenedioxiflavona 4'-O-glucuronida	Flavonoide

Tabla 3. Compuestos detectados en las fracciones de *Chlorella sorokiniana*

Tr (min)	PM	%Área	Fórmula	Compuesto	Tipo de compuesto
7.967	198.76	0.48	C ₉ H ₁₀ O ₅	Ácido gálico etil éster	Compuesto fenólico
11.32	592.29	0.21	C ₄₁ H ₈₄ O	1-Hentetracontanol	alcohol
11.416	654.60	0.88	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₈	Hesperetin 5,7-diglucuronida o Hesperetin-3',7-diglucuronida	
12.30	242.37	0.12	C ₁₆ H ₃₄ O	1-Hexadecanol	Alcohol
12.363	540.45	0.80	C ₄₀ H ₅₈	Neurosporeno	Carotenoide
12.95	254.65	0.14	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	Ácido Palmitoleico	Ácido graso
13.225	115.0	0.31	C ₅ H ₉ NO ₂	Prolina	Aminoácido
0.459	124.16	0.59	C ₈ H ₁₂ O	Ciclohexanol, 1-etinil	Alcohol
1.324	170.05	1.05	C ₇ H ₆ O ₅	Ácido gálico	Compuesto fenólico
1.505	208.26	0.49	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	Cafeato de Etilo	Compuesto fenólico
1.538	414.26	16.30	C ₂₉ H ₅₀ O	β-Sitosterol	Esterol
1.914	636.75	1.35	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₆	Kaempferol 3-O-(6"-acetil-galactósido) 7-O-ramnósido	Flavonoide
2.541	396.40	3.73	C ₂₈ H ₄₄ O	Ergosterol	Esterol
2.854	308.30	1.15	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	Glutación	Tripéptido
3.011	390.32	44.2	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	Ácido 5,5'-Dihidroferúlico	Compuesto fenólico
3.36	280.02	0.25	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Ácido linoléico	Ácido graso
3.57	393.67	0.43	C ₂₈ H ₅₈	Octacosano	Alcano
5.303	178.55	0.59	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	Ferulaldehído	Aldehído aromático
5.865	164.09	0.61	C ₆ H ₁₂ O ₅	Ramnosaa	Carbohidrato
6.106	146.98	1.05	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	Glutamina	aminoácido
6.77	340.58	0.37	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	Ácido docosanoico	Ácido graso
7.961	520.25	0.61	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₄	5,3',4'-Trihidroxi-3-methoxi-6:7-metilenedioxiflavona 4'-O-glucuronida	Flavonoide
7.967	198.76	0.48	C ₉ H ₁₀ O ₅	Ácido gálico etil éster	Compuesto fenólico
11.32	592.29	0.21	C ₄₁ H ₈₄ O	1-Hentetracontanol	alcohol
11.416	654.60	0.88	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₈	Hesperetin 5,7-diglucuronida o Hesperetin-3',7-diglucuronida	
12.30	242.37	0.12	C ₁₆ H ₃₄ O	1-Hexadecanol	Alcohol
12.363	540.45	0.80	C ₄₀ H ₅₈	Neurosporeno	Carotenoide
12.95	254.65	0.14	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	Ácido Palmitoleico	Ácido graso
13.225	115.0	0.31	C ₅ H ₉ NO ₂	Prolina	Aminoácido
13.84	270.35	0.09	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Ácido heptadecánico	Ácido graso

5.8.1 Beta-Sitosterol

El β -Sitosterol (BS) es un compuesto químico que pertenece al grupo de los fitoesteroles, que son los esteroides que se encuentran de forma natural en las plantas. Varios estudios han indicado que los BS inhiben el crecimiento de varias líneas celulares de cáncer que se asocian con la activación del ciclo de la esfingomielina, la detención del ciclo celular y la inducción de la muerte celular apoptótica. BS aislado de varias plantas promueve la apoptosis mediante el aumento de los niveles de la primera señal de apoptosis (FAS) y la actividad de la caspasa-8, a fosforilación de la quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK) y de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) p38, inhibición de la proliferación de células cancerosas; incluso a bajas concentraciones sin efecto citotóxico para las células no cancerosas (Rajavel *et al.*, 2017; Ayaz *et al.*, 2019). Por esta gran diversidad de mecanismos de acción este compuesto y sus derivados se han enfrentado a una gran variedad de líneas celulares como HepG2, Caco-2, A549, MCF-7 teniendo resultados prometedores como agente citotóxico y antiproliferativo (Sayeed *et al.*, 2015; Maiyoet *al.*, 2016; Rajavel *et al.*, 2017; Ayaz *et al.*, 2019). Un aspecto importante sobre este compuesto es que durante el fraccionamiento aumentó su concentración; sin embargo, las fracciones no presentaron la actividad evaluada, lo que sugiere que la acción de un compuesto en específico no inhibe el crecimiento celular.

Como se observan en la Tabla 4, hay una pérdida de muchos de los compuestos que han sido reportados con actividad inhibitoria del crecimiento de células cancerosas. No obstante, se puede ver como se mantiene la diversidad de compuestos que conforman las fracciones. Este resultado ha ampliado el panorama con el que se empezó la investigación y nos permite la elección de los compuestos que presenten el efecto deseado concentrando nuestro esfuerzo en la producción y purificación en particular de este.

El presente trabajo ha tenido como objetivo la producción y caracterización de biocompuestos producidos en condiciones mixótrofas por la microalga *C. sorokiniana* que presentaran actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer MCF-7, HT29 y L5178Y-R. Los resultados obtenidos demostraron que el extracto metanólico crudo de la biomasa del microorganismo presenta la actividad deseada contra la línea MCF-7. Además, se confirmó su toxicidad ante la línea L5178Y-R aunque las condiciones de

cultivo de la microalga no fueran las mismas. No obstante, durante el proceso de fraccionamiento se perdió el efecto citotóxico lo que sugiere una acción sinérgica entre los componentes del EM así como una pérdida de compuestos durante la metodología de fraccionamiento. Como se había inferido en el apartado 5.6, el hecho que las fracciones no afecten la viabilidad de las células cancerosas es debido a que muchos compuestos como el ácido elaguico acetil xilósido, el hidrato de catequina, la cianidina, el fitoflueno, la isoquercitrina, la astaxantina, la anteraxantina y la isoramnetina 3-glucósido-7-ramnósido con demostrada actividad antiproliferativa y citotóxica, se pierden durante el fraccionamiento probablemente debido a que quedan adheridos a la fase estacionaria. La concentración al salir de la columna es tan baja que no es detectable ni suficiente para que se genere el efecto observado con el EM. Por tal motivo, podemos inferir que la diversidad de bioactivos y de mecanismos de acción propició la inhibición de las células MCF-7 y no fue el accionar individual de un compuesto.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES.

La cepa *C. sorokiniana* mostró una mayor velocidad de crecimiento específica y producción de biomasa en condiciones de cultivo mixótrofas. Resultado esperado por la presencia de una fuente de carbono orgánica en el medio.

En las condiciones de cultivo determinadas en el proyecto se produjeron 1.89 g/L de biomasa seca. Semejantes valores han sido referidos en la literatura.

El EM presenta actividad citotóxica contra la línea celular MCF-7, en cambio, no muestra actividad significativa contra la línea celular HT-29. Generalmente esta línea de adenocarcinoma colorrectal presenta resistencia a muchos fármacos.

Para las células Vero, el mayor valor de citotoxicidad fue inferior al 25% y se observó para la máxima concentración evaluada. El resto de los valores no sobrepasaron el 20%. Este resultado indica que el EM no presenta una toxicidad significativa en una línea celular sana.

La actividad citotóxica observada para MCF-7 y L5178Y-R se produjo por la diversidad de compuestos presentes en el EM, los cuales presentaban diferentes dianas en la célula, lo que impide la recuperación e induce a la apoptosis.

La actividad del EM crudo se pierde con el fraccionamiento debido a que muchos bioactivos se pierden durante el fraccionamiento probablemente al quedar adheridos a la fase estacionaria de la columna y por tanto, la acción sinérgica que se producía entre los compuestos y al evaluarlos por separado la actividad citotóxica se ve drásticamente atenuada.

Se identificó en el EM isoramnetina 3-glucósido-7-ramnósido, previamente no reportado para el género *Chlorella*, y que representa un bioactivo con un atractivo potencial debido a sus diversos mecanismos de acción contra líneas celulares de cáncer.

PERSPECTIVAS

Como prospectos a futuro dado que exceden los alcances de este proyecto quedan establecer un sistema estacionario que nos permita una mejor separación y menor pérdida de los compuestos, así como la evaluación de la toxicidad de estos en contra de líneas celulares humanas no tumorales *in vitro* y en animales de experimentación *in vivo*.

REFERENCIAS.

1. Alquéaza, B. 2007. Caracterización bioquímica y molecular de la carotenogénesis en frutos cítricos. Trabajo presentado para optar por el grado de Doctor. Departamento de medicina preventiva y salud pública, ciencias de la alimentación, toxicología y medicina legal. Universidad de Valencia, España.
2. Arruabarrena A, Pintos P, Luque E, Moltini Ana, Rivas, F, Lado J. 2019. Characterization of carotenoid accumulation in different hybrids from the Uruguayan Citrus Breeding Program. *Acta Horticulturae*. 1230. 67-72. DOI: 10.17660/ActaHortic.2019.1230.9.
3. ATCC . 2021. HT29 cell line. [Ficha técnica]. ATCC: HT-29 ATCC ® HTB-38™ Homo sapiens colon colorectal adenocar
4. ATCC. 2021^a. Vero cell line [Ficha técnica]. ATCC: Vero ATCC ® CCL-81™ Cercopithecus aethiops kidney normal.
5. Avila J, y Llano JL. 2014. Cryopreservation of *Chlorella* sp. Isolated from municipal wastewater. *The Biologist* 12(2): 275-281.
6. Ayaz M, Sadiq A, Wadood A, Junaid M, Ullah F, Khan N. 2019. Cytotoxicity and molecular docking studies on phytosterols isolated from *Polygonum hydropiper* L. *Steroids*; 141:30-35. DOI: 10.1016/j.steroids.2018.11.005. Epub 2018 Nov 13. PMID: 30444979.
7. Azaman SA, Nagao N, Yusoff F, Tan SW. Yeap SK. 2017. A Comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions. *PeerJ*, 5:5473. DOI: 10.7717/peerj.3473.
8. Baudelet PH, G. Ricochon M, Lindera LM. 2017. A new insight into cell walls of Chlorophyta. *Algal Research*, 25: 333–371.
9. Bui TVL, Ross IL, Jakob G, Hankamer B. 2013. Impact of Procedural Steps and Cryopreservation Agents in the Cryopreservation of Chlorophyte Microalgae. *PloS ONE* 8(11): e78668. DOI:10.1371/journal.pone.0078668.

10. Burcu T, Banu M. 2020. Catechin Loaded Poly (lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles: Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activity Against MCF-7 Breast Cancer Cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 20 (9), 5313-5321.
11. Cañavate J y L. Lubian. 1995. Relationship between cooling rates, cryoprotectant concentrations and salinities in the cryopreservation of marine microalgae. *Marine Biology*, 125: 325-334.
12. Caraballo VM. 2013. Análisis de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides en variantes de *Bixa ore/lana L.* por RT-PCR. Tesis que presenta Víctor Manuel Carballo Uicab En opción al título de MAESTRO EN CIENCIAS. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México
13. Cardoso LA, Karp SG, Vendruscolo F, Kanno KY, Zoz LI, Carvalho JC. 2017. Biotechnological Production of Carotenoids and Their Applications in Food and Pharmaceutical Products. Dragan J. Cvetkovic y Goran S. Nikolic, Carotenoids. IntechOpen. pp125 – 141.
14. Cecchin M, Benfatto S, Griggio F, A. Mori, S. Cazzaniga, N. Vitulo, et al. 2018. Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana*. *Scientific Reports*. 8(6465): 1-13. DOI: 10.1038/s41598-018-24979-8.
15. Ceci C, Lacal PM, Tentori L, De Martino MG, Miano R, Graziani G. 2018. Experimental Evidence of the Antitumor, Antimetastatic and Antiangiogenic Activity of Ellagic Acid. *Nutrients*; 14, 10(11):1756. DOI: 10.3390/nu10111756. PMID: 30441769; PMCID: PMC6266224.
16. Cerón MC, González CV, Camacho J, López L, García F, Molina E. 2018. Maximizing carotenoid extraction from microalgae used as food additives and determined by liquid chromatography (HPLC). *Food Chemistry* 257: 316–324.
17. Cha KH, Koo SY, Lee DU. 2008. Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56(2008): 10521–10526.
18. Cha KH, Koo SY, Lee DU. 2008. Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. *Journal of Agriculture Food Chemistry*; 26;56(22):10521-6. DOI: 10.1021/jf802111x. PMID: 18942838.

19. Chai S, Shi J, Huang T, Guo Y, Wei J, Guo M, *et al.* 2018. Characterization of *Chlorella sorokiniana* growth properties in monosaccharidesupplemented batch culture. *PloS ONE* 13(7): e0199873. DOI: 10.1371/journal. Pone.0199873.
20. Chen A, Gu N, Pei J, Su E, Duan X, Cao F, Zhao L. 2019. Síntesis de isorhamnetina-3-O-ramnosida por una cascada de tres enzimas (ramnosiltransferasa, glicina max sacarosa sintasa, UDP-ramnosa sintasa) utilizando un sistema de regeneración de UDP-ramnosa. *Moléculas*;24(17):3042. DOI:10.3390/moléculas24173042
21. Cheshomi H, Bahrami AR, Matin MM. 2021. Ellagic acid and human cancers: a systems pharmacology and docking study to identify principal hub genes and main mechanisms of action. *Molecular Diversity*;25(1):333-349. DOI: 10.1007/s11030-020-10101-6. Epub 2020. PMID: 32410114.
22. Chowdhury MMH, Kubra K, Hossain MB, Mustafa MG, Jainab T, Karim MR. 2015. Screening of antibacterial and antifungal activity of freshwater and marine algae as a prominent natural antibiotic available in Bangladesh. *International Journal of Pharmacology* 1–6.
23. Chung JG, Pengb HY, Chub YC, Hsiehb YM, Wangc SD, Choub ST. 2012. Anti-invasion and apoptosis induction of chlorella (*Chlorella sorokiniana*) in Hep G2 human hepatocellular carcinoma cells. *Journal of functional foods*. 4: 302 – 310.
24. Cordero BF, Obraztsova I, Couso I, Leon R, Vargas MA y Rodríguez H. 2011. Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis. *Marine Drugs*, 9, 1607–1624.
25. Dissook S, Kuzuyama T, Nishimoto Y. 2021. Stable isotope and chemical inhibition analyses suggested the existence of a non-mevalonate-like pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Scientific Reports* 11, 5598. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85170-0>.
26. El-Hacka ME, Abdelnourb S, Alagawanya M, Abdoc M, Sakrd MA, Khafagae AF. 2019. Microalgae in modern cancer therapy: Current knowledge. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111(2019): 42–50.
27. Encarnacao T, nvi AA, Campos MG y Burrows HD. 2015. Cyanobacteria and microalgae: a renewable source of bioactive compounds and other chemicals. *Science Progress* 98, 145–168.

28. Evacuasianny E, Ratnawati H, Liana LK, Widowati W, Maesaroh M, Mozef T, Risdian Ch. 2014. Cytotoxic and antioxidant activities of nvironme in inhibiting the malignancy of breast cancer. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 3(2): 141-146.
29. Faraonea I, Sinisgallia C, Ostunia A, Armentanoa MF, Carmosinoa M, Milellaa L, Russoa D, Labancaa F, Khanc H. 2020. Astaxanthin anticancer effects are mediated through multiple molecular mechanisms: A systematic review. *Pharmacological Research*; 155 (2020) 104689.
30. Ferdous UT, Balia YZN. 2021. Insight into Potential Anticancer Activity of Algal Flavonoids: Current Status and Challenges. *Molecules*, 26(22), 6844.
31. Galarza VO. 2019. Carbohidratos y proteínas en microalgas: principales alimentos funcionales. *Brazilian Journal of Food Technology*. 22, e2019043.
32. Gheonea I, Aprodu I, Enachi E, Horincar G, Bolea CA, Bahrim GE. 2019. Investigations on thermostability of carotenoids from tomato peels in oils using a kinetic approach. *Journal of Food Process Preservation*. 2019;00:e14303.
33. Gómez, J. (2015). Estudio de elementos esenciales y tóxicos en microalgas: uso de *Chlorella sorokiniana* en la preparación de alimentos funcionales. Memoria presentada para optar por el grado de doctora. Universidad de Huelva, Facultad de Ciencias Experimentales, departamento de nviron y ciencia de los materiales “PROFESOR JOSÉ CARLOS VÍLCHEZ MARTÍN”. Huelva, España.
34. Gong G, Guan YY, Zhang ZL, Rahman K, Wang SJ, Zhou S, Zhang H. 2020. Isorhamnetin: a review of pharmacological effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 128, 110301.
35. Gong X, Smith JR, Swanson HM, Rubin LP. 2018. Carotenoid Lutein Selectively Inhibits Breast Cancer Cell Growth and Potentiates the Effect of Chemotherapeutic Agents through ROS-Mediated Mechanisms. *Molecules*, 23, 905; doi:10.3390/molecules2304090.
36. González-Delgado AD, Barajas-Solano AF, y Ardila-Álvarez AM. 2017. Producción de biomasa y proteínas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Chlorellales: Chlorellaceae) a través del diseño de medios de cultivo selectivos. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(3), 451-461 DOI: doi.org/10.21930/rcta.vol18_num3_art:736.

37. Hosseini MM, Karimi A, Behroozaghdam M, Javidi MA, Ghiasvand S, Bereimipour A, Aryan H, Nassiri F, Jangholi E. 2017. Cytotoxic and Apoptogenic Effects of Cyanidin-3-Glucoside on the Glioblastoma Cell Line. *World Neurosurg*;108:94-100. DOI: 10.1016/j.wneu.2017.08.133.
38. Hu J, Zhang Y, Jiang X, Zhang H, Gao Z, Li Y, Fu R, Li L, Li J, Cui H, Gao N. 2019. ROS-mediated activation and mitochondrial translocation of CaMKII contributes to Drp1-dependent mitochondrial fission and apoptosis in triple-negative breast cancer cells by isorhamnetin and chloroquine. *Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research*; .38(1) 225-240.
39. Hu S, Huang L, Meng L, Sun H, Zhang W and Xu Y: Isorhamnetin inhibits cell proliferation and induces apoptosis in breast cancer via Akt and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Molecular Medicine Reports*; 12: 6745-6751.
40. Hu S, Deng Y. 2013. Mechanism of isorhamnetin on breast cancer cells. *Journal of China Pharmaceutical University*. 44. 563-567. DOI: 10.11665/j.issn.1000-5048.20130615.
41. Hudek KL, Davis LC, Ibbini J y Erickson LE. 2014. Commercial products from algae. En: Bajpai R, Prokop A, Zappi M (eds) *Algal biorefineries, Vol. 1. Cultivation of cells and products*. Springer, New York, pp 275–295.
42. Intan C, Dewi IC, Falaise C, Hellio C, Bourgougnon N y Mouge JL. 2018. Chapter 12: Anticancer, Antiviral, Antibacterial, and Antifungal Properties in Microalgae. En: Ira A. Levine, Joel Fleurence (eds) *Microalgae in Health and Disease Prevention*, Academic Press, 2018. Elsevier Inc, pp 235–261.
43. Ishiguro S, Robben N, Burghart R, Cote P, Greenway S, Thakkar R, et al. 2020. Cell Wall Membrane Fraction of *Chlorella sorokiniana* Enhances Host Antitumor Immunity and Inhibits Colon Carcinoma Growth in Mice Integrative Cancer Therapies. Volume 19: 1–10.
44. Kim S, Lee Y, Hwang SJ. 2013a. Removal of nitrogen and phosphorus by *Chlorella sorokiniana* cultured heterotrophically in ammonia and nitrate, *International Biodeterioration & Biodegradation*. 85, 511-516, ISSN 0964-8305, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.05.025>.
45. Kim S, Park J, Cho YB, Hwang SJ. 2013. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions, *Bioresource Technology*, 144, 8-13, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.068>.

46. Kumar K, Dasgupta ND, Das D. 2014. Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass, *Bioresource Technology*, Volume 167: 358-366, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.118>.
47. Kusumaningrum, HP., A. Supriyadi, A. Budiharjo, M. Zainuri, I. Misbach y A. Maulidiyah. (2019). Isolation and identification of carotenoid-producing microalgae from Demak marine waters. *Journal of Physics: Conference Serie*, 1217 (2019) 012183.
48. Lin PY, Tsai CT, Chuang WL, Chao YH, Pan H, et al. 2017. *Chlorella sorokiniana* induces mitochondrial-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells and inhibits xenograft tumor growth in vivo. *BMC Complementary and Alternative Medicine* (2017) 17:88 DOI 10.1186/s12906-017-1611-9
49. Linnewiel K, Khanin M, Danilenko M, Zango G, Amosi Y, Levy J, Sharoni Y. (2015). The anti-cancer effects of carotenoids and other phytonutrients resides in their combined activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 572, 28–35. DOI:10.1016/j.abb.2015.02.018.
50. Lizzul AM, Amundarain AL, Purton S y Cintra L. 2018. Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230. *Biology*, 7(25):1-12. DOI:10.3390/biology7020025.
51. López- U, Young S y Guzman L. 2010. Evaluating a ‘bioticligand model’ applied to chloride-enhanced Cd uptake by *Brassica juncea* from nutrient solution at constant Cd²⁺ activity. *Environmental Technology*. 31: 307 –318. DOI: 10.1080/09593330903470685.
52. Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. 2014. *BrockBiology of Microorganisms*. Pearson Education. Cap 17: 605-06.
53. Maiyo F, Moodley R, Singh M. 2016. Phytochemistry, cytotoxicity and apoptosis studies of b-sitosterol-3-o-glucoside and β -amyrin from *prunus africana*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*,13(4):105-112. DOI:10.21010/ajtcam.v13i4.15.
54. Maldonado CR. 2011. Inducción lipídica por limitación de nutrientes en las microalgas *Scenedesmusdimorphus* y *Chlorella sorokiniana*. TESIS que como requisito para obtener el grado de Maestra en Ciencia y Tecnología Ambiental. Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S. C. División de estudios de posgrado. Chihuahua, Chihuahua., México.

55. Mekuria AN, Tura AK, Hagos B, Sisay M, Abdela J, Mishore KM, Motbaynor B. 202. Anti-Cancer Effects of Lycopene in Animal Models of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers Pharmacology*; 21(11):1306. DOI: 10.3389/fphar.2020.01306.
56. Mirmalek SA, Faraji S, Ranjbaran S, Aryan H, Arani HZ, Jangholi E, Marzouni HZ, Salimi SA. 2019. Cyanidin 3-glycoside induced apoptosis in MCF-7 breast cancer cell line. *Archives of Medical Science*. DOI: DOI:10.5114/aoms.2020.93789.
57. Mondal M, Ghosh A, Gayen K, Halder G, Tiwari ON. 2017. Carbon dioxide bio-fixation by *Chlorella* sp. BTA 9031 towards biomass and lipid production: Optimization using Central Composite Design approach. *Journal of CO2 Utilization*, 22, 317–329. Doi:10.1016/j.jcou.2017.10.008
58. Morançais M, Mouget JL, Dumay J. 2018. Proteins and Pigments. Cap. 7. *Microalgae in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc.
59. Morschett H, Reich S, Wiechert, W, Oldiges M. 2016. Simplified cryopreservation of the microalga *Chlorella vulgaris* integrating a novel concept for cell viability estimation. *Eng. Life Sci.*, 16: 36-44. <https://doi.org/10.1002/elsc.201500056>
60. Nancuda HE. 2015. Utilización de aguamiel de café y melaza en agua residual sintética en el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. Para la producción de lípidos. Tesis en opción al título de Maestro en Ciencias en Energía Renovable, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Yucatán., México.
61. Organización Mundial de la Salud. 2018. Cáncer – Datos y cifras [Online]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/cancer>.
62. Organización Panamericana de la Salud. 2018. Día mundial del cáncer 2018 [Online]. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14047:world-cancer-day-2018-general-information&Itemid=42322&lang=es.
63. Palacio OA. 2015. Estudio de la interacción microalga-bacteria sobre la producción de tiamina y triptófano POR *Chlorella sorokiniana* y su efecto en la biosíntesis de AIA por *Azospirillum brasilense*. Tesis que para obtener el grado en Doctor en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Programa de estudio de posgrado. La Paz, Baja California Sur., México.

64. Palozza P, Torelli C, Boninsegna A, Simone R, Catalano A, Mele MC, *et al.* 2009. Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcuspluvialis* in human colon cancer cells. *Cancer Letters*, 283, 108–117.
65. Pasquet V, Morisset P, Ihammouine S, Chepied A, Aumailley L, Berard J, *et al.* 2011. Antiproliferative Activity of Violaxanthin Isolated From Bioguided Fractionation of *Dunallielatertiolecta* extracts. *Marine Drugs*, 9: 819 – 831. DOI: 10.3390/md9050819.
66. Pérez O y Bashan Y. 2015. Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. Springer International Publishing Switzerland, 2015: 61-131.
67. Pham DNT, Leclerc D, Levesque N, Deng L y Rozen R. 2013. B,β-Carotene 15,15'-monooxygenase and its substrate β-carotene modulate migration and invasion in colorectal carcinoma cells. *American Journal of Clinical Nutrition*, 98, 413–422.
68. Przystupski D, Michel, Rossowska J. Kwiatkowski S, Saczko J, Kulbacka J. 2019. The modulatory effect of green tea catechin on drug resistance in human ovarian cancer cells. *Medical Chemistry Research* 28, 657–667. DOI:10.1007/s00044-019-02324-6.
69. Rajavel T, Mohankumar R, Archunan G. *et al.* 2017. Beta sitosterol and Daucosterol (phytosterols identified in *Grewia tiliaefolia*) perturbs cell cycle and induces apoptotic cell death in A549 cells. *Scientific Reports* 7, 3418...<https://doi.org/10.1038/s41598-017-03511-4>
70. Ramírez A, Vargas T, Molina S, Sánchez J, Martínez J, González M, Martín R, Sánchez R, Gómez M, Dávalos A, Calani L, Del Rio D, González A, Espín JC, Tomás FA, Reglero G. 2015. The ellagic acid derivative 4,4'-di-O-methylellagic acid efficiently inhibits colon cancer cell growth through a mechanism involving WNT16. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*;353(2):433-44. DOI: 10.1124/jpet.114.221796.
71. Ramola B, Kumar V, Nanda M, Mishra Y, Tyagi T, Gupta A, Sharma N. 2019. Evaluation, comparison of different solvent extraction, cell disruption methods and hydrothermal liquefaction of *Oedogonium* macroalgae for biofuel production, *Biotechnology Reports*, Volume 22, 2019, e00340.

72. Reyna R, Gómez R, López U, Quintanilla R, Caballero D, Rodríguez D, et al. 2018. Antitumor activity of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus* sp. Microalgae native of Nuevo León State, México. PeerJ 6(4358): 1-15. DOI:10.7717/peerj.4358
73. Ribeiro DM, Zanetti TG, Moreno MH, Masetto TE, Lafayette JM, Fonseca GG. 2019. Effect of different culture media on growth of *Chlorella sorokiniana* and the influence of microalgal effluents on the germination of lettuce seeds. Journal of Applied Biology & Biotechnology 7(01), 006-010. DOI: 10.7324/JABB.2019.70102
74. Rodríguez AM. 2017. Estudio de lípidos aislados de microalgas y polifenoles en modelos inflamatorios de piel. . Memoria presentada para optar al grado de Doctora. Universidad de Valencia, España.
75. Roostaei, J, Zhang Y, Gopalakrishnan K y Ochocki AJ. 2018. Mixotrophic Microalgae Biofilm: A Novel Algae Cultivation Strategy for Improved Productivity and Costefficiency of Biofuel Feedstock Production. Scientific Reports, 8(12528): 1-10. DOI:10.1038/s41598-018-31016-1.
76. Rubio, D, Ángel MC, Pimienta W. 2013. Incidencia del nitrógeno en la producción de biomasa y ácidos grasos de la microalga *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de panel plano a escala laboratorio. Revista de Investigación, 6(1): 7-18.
77. Saadullah M, Asif M, Sattar S, Rehman K, Shah S, Saleem M, Shah A, Wajid M, Rasool A, Uzair M, Afzal S, Afzal K. 2020. Cytotoxic and antioxidant potentials of ellagic acid derivatives from *Conocarpus lancifolius* (Combretaceae). Tropical Journal of Pharmaceutical Research; 19 (5): 1073-108.
78. Safafar H, van Wagenen J, Møller P, Jacobsen Ch. 2015. Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. Mar. Drugs 2015, 13, 7339–7356; doi:10.3390/md13127069
79. Safi C, Zebiba B, Meraha O, Pontaliera PY, Vaca P. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 35 (2014): 265–278. DOI: 10.1016/j.rser.2014.04.007.

80. Sayeed MS, Ameen SS. (2015). Beta-sitosterol: a promising but orphan nutraceutical to fight against cancer. *Nutrition and cancer*, 67(8), 1216-1222.
81. Shilpa S, Shwetha HJ, Raju M, Lakshminarayana R. 2020. Factors affecting bioaccessibility and bio-efficacy of carotenoids, Editor(s): Charis M. Galanakis, *Carotenoids: Properties, Processing and Applications*, Academic Press. Pages 41-73, ISBN 9780128170670.
82. Sigma-Aldrich. 2021. L5178Y-R. [Ficha técnica]. Sigma Aldrich: L5178Y-R 90062802 | Sigma-Aldrich (sigmaaldrich.com)
83. Soontornchaiboon W, Joo SS, Kim SM. 2012. Anti-inflammatory effects of violaxanthin isolated from microalga *Chlorella ellipsoidea* in RAW 264.7 macrophages. *Biological and Pharmaceutical. Bulletin*, 35(2012): 1137–1144.
84. Sowmya PRR, Arathi B P, Vijay K, Baskaran V, Lakshminarayana R. (2017). Astaxanthin from shrimp efficiently modulates oxidative stress and allied cell death progression in MCF-7 cells treated synergistically with β -carotene and lutein from greens. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 58–69. DOI:10.1016/j.fct.2017.05.024.
85. Subashchandrabose SR, Ramakrishnan B, Megharaj M, Venkateswarlu K, Naidu R. 2013. Review Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation. *Environment International*, 51 (2013): 59–72. DOI: 10.1016/j.envint.2012.10.007
86. Sun SQ, Zhao YX, Li SY, Qiang JW, Ji YZ. 2020. Anti-Tumor Effects of Astaxanthin by Inhibition of the Expression of STAT3 in Prostate Cancer. *Marine Drugs*; 18, 415. DOI:10.3390/md18080415.
87. Takeuchi M, Ohtani K, Ma Y, Kato S, Semba S, Katoh T, Wakamiya N, Taniguchi N. 2011. Differential Effects of Cyanidin and Cyanidin-3-glucoside on Human Cell Lines. *Food Science. Technology Research*, 17 (6): 515 – 521.
88. Talero E, García S, Ávila J, Rodríguez A, Alcaide A y Motilva V. 2015. Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and cancer. *Marine Drugs*, 13(10): 6152–6209.
89. Tang J, Oroudjev E, Wilson L, Ayoub G. 2015. Delphinidin and cyanidin exhibit antiproliferative and apoptotic effects in MCF7 human breast cancer cells. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*, 2(1):82-86.

90. Teng T, Luan X. 2016. Research progress of isorhamnetin in pharmacodynamics, Chinese Journal of Integrative Medicine.28(04) 593–596.
91. Tessarolli LP, Day JG, Vieira AAH. 2017. Establishment of a cryopreserved biobank for the Culture Collection of Freshwater Microalgae (CCMA-UFSCar), São Paulo, Brazil. *Biota Neotropica*. 17(2): e201602
92. Venugopal K, Ahmad H, Manikandan E, Thanigai Arul K, Kavitha K, Moodley MK, Rajagopal K, Balabhaskar R, Bhaskar M. 2017. The impact of anticancer activity upon Beta vulgaris extract mediated biosynthesized silver nanoparticles (ag-NPs) against human breast (MCF-7), lung (A549) and pharynx (Hep-2) cancer cell lines. *J Photochem Photobiol B*. 24(173):99-107.
93. Villavicencio IL. 2015. Regulación de la biosíntesis de isoprenoides en *Arabidopsis thaliana*: Caracterización del mutante rif35. Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Biotecnología por la Universidad de Barcelona. Universitat de Barcelona, España.
94. Wang J, Quan Q, Ji R, Guo X, Zhang J, Li X, Liu Y. 2018. Isorhamnetin suppresses PANC-1 pancreatic cancer cell proliferation through S phase arrest. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; .108: 925–933.
95. Wang J, Yang H. y Wang F. 2014. Mixotrophic Cultivation of Microalgae for Biodiesel Production: Status and Prospects. *Applied Biochememstry Biotechnology*, 172: 3307–3329 DOI: 10.1007/s12010-014-0729-1.
96. Wei J, Su H, Bi Y, Li J, Feng L, Sheng W. 2018. Anti-proliferative effect of isorhamnetin on HeLa cells through inducing G2/M cell cycle arrest. *Experimental and therapeutic medicine*, 15(4), 3917-3923.
97. Wu Q, Kroon PA, Shao H, Needs PW, Yang X. 2018. Differential effects of quercetin and its two derivatives (isorhamnetin and isorhamnetin-3- glucuronide) in inhibiting proliferation of human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 66(27): 7181-7189. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b02420.
98. Xiang LP, Wang A, Ye JH, Zheng XQ, Polito CA, Lu JL, Li QS, Liang YR. 2016. Suppressive Effects of Tea Catechins on Breast Cancer. *Nutrients*; 8(8):458. DOI:10.3390/nu8080458.

99. Zhang J, Liu L, Chen F. 2019. Production and characterization of exopolysaccharides from *Chlorella zofingiensis* and *Chlorella vulgaris* with anti-colorectal cancer activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 134 (2019) 976–983.

Apéndice A, Lista de símbolos y abreviaturas

CO ₂	Dióxido de Carbono
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
L	Litro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
pH	Potencial de Hidrógeno
Kg	Kilogramos
g	Gramos
mg	Miligramos
h	horas
min	Minutos
rpm	Revoluciones por minuto
EM	Extracto metanólico
Abs	Absorbancia
MeOH	Metanol
DMSO	Dimetilsulfóxido
SFB	Suero Fetal Bovino

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Saúl Orlando Fernández Valenzuela

Candidato para el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en
Microbiología Aplicada
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Tesis

“Producción y caracterización de biocompuestos con actividad antitumoral producidos por la microalga *Chlorella sorokiniana*”

Nacido el 27 de agosto de 1992 en La Habana, Cuba. Hijo de Tomás Daniel Fernández Martí y Ania Valenzuela Rodríguez. Me gradué de Licenciado en Microbiología en la Facultad de Biología en la Universidad de La Habana (UH) y posteriormente pasé a la industria biotecnológica a desempeñar distintas funciones donde permanecí por 2 años. Actualmente soy alumno inscrito en la Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y participo en el grupo de investigación del Dr. Gustavo Raúl Reyna Martínez donde desarrollé el presente Proyecto en el periodo comprendido entre agosto de 2019 y julio de 2021, tiempo en el cual conté con una beca de tiempo completo que me otorgó CONACYT.