

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO BIOLÓGICO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS**  
**DE *Chlorella sorokiniana* CULTIVADA EN NEJAYOTE.**

Por:

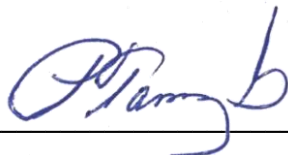
M. C. Maribel Domínguez Gámez

Como requisito para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias con Orientación en Microbiología

2025

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO BIOLÓGICO DE COMPUESTOS  
BIOACTIVOS DE *Chlorella sorokiniana* CULTIVADA EN NEJAYOTE**

**Comité de Tesis**



---

**Dra. Patricia Tamez Guerra**

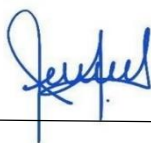
**Presidente**



---

**Dr. Ricardo A. Gómez Flores**

**Secretario**



---

**Dra. María Julissa Ek Ramos**

**Vocal 1**

DIANA  
CASAUTLO

---

**Dra. Diana Elia Caballero Hernandez**

**Vocal 2**



---

**Dr. Alonso Alberto Orozco Flores**

**Vocal 3**



---

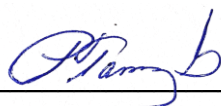
**Dra. Katiushka Arevalo Niño**

**Subdirector de posgrado**



**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO BIOLÓGICO DE COMPUESTOS  
BIOACTIVOS DE *Chlorella sorokiniana* CULTIVADA EN NEJAYOTE**

**Dirección de Tesis**



---

**Dra. Patricia Tamez Guerra**

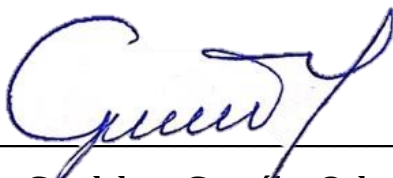
**Director**



---

**Dr. César Iván Romo Sáenz**

**Asesor externo**



---

**Dra. Guadalupe González Ochoa**

**Asesor externo**

## **DERECHOS RESERVADOS©**

## **PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo fue financiado por:

- El Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONHACYT, México), a través de la beca al CVU 445572 que corresponde al Dr. César Iván Romo Sáenz.
- El Programa de Apoyo a la investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Folio PAICYT-UANL CT092-20 y CN1605-21 de la Dra. Patricia Tamez Guerra.

## AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, **Dra. Patricia Tamez Guerra**, por su apoyo constante, sus enseñanzas y por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, la confianza brindada hacia mi persona y proporcionarme espacio para la realización de este proyecto. Al **Dr. César Iván Romo Sáenz** por compartirme sus conocimientos, por su apoyo para poder concluir este proyecto y por la amistad brindada hacia mi persona, muchas gracias por todo.

A mi comité de tesis por su colaboración, apoyo y consejo que me brindaron a lo largo de este proyecto, al **Dr. Ricardo Gómez Flores, Dr. Alonso A. Orozco Flores, Dra. Diana Elia Caballero Hernández y Dra. María Julissa Ek Ramos**. Agradezco muy en especial a la **Dra. Guadalupe González Ochoa** por su apoyo incondicional, por escucharme cuando necesitaba hablar con alguien, la quiero.

A mis amigos y compañeros de Laboratorio, **Servando, Rosita, Jesica, Diana, Ana, Nancy, Ángel, Viri, Diego, Ricardo, Angello**, por su apoyo a lo largo de este proyecto y por su amistad.

A mi novio **Alonso Moreno**, gracias por todo el amor y apoyo incondicional que me has brindado todo este tiempo, por escucharme y estar cuando más te necesitaba, te amo muchísimo.

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT)** por la beca otorgada por el apoyo económico brindado para el desarrollo de mis estudios de Doctorado (**No. CVU: 957310**).

A la **Universidad Autónoma de Nuevo León** por brindarme un espacio para mi desarrollo profesional. A la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla**, por darme la oportunidad de realizar este proyecto en el departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

## DEDICATORIA

A mi ángel en el cielo, mi hermana **Lucero**☽, quiero expresar todo el amor y apoyo que me diste cuando aún estabas con vida, y aunque ahora no te encuentras físicamente con nosotros, tu alma siempre me acompañó en todos los momentos difíciles, gracias por llenar mi vida de momentos inolvidables, siempre estás en mi corazón♡.

A mis padres **María de Jesús** y **Fernando**, a mis hermanos **Fernando**, **Ángel** y mi sobrino **Cristian**, porque aun con los momentos difíciles que atravesamos como familia, siempre estuvieron para apoyarme y seguir siendo mi motor para salir adelante. Gracias por tanto amor y su apoyo incondicional, los amo con todo mi corazón♡.

# ÍNDICE

|                                                     |     |
|-----------------------------------------------------|-----|
| ÍNDICE DE TABLAS .....                              | iv  |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                             | vi  |
| LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....               | vii |
| RESUMEN .....                                       | ix  |
| ABSTRACT.....                                       | x   |
| 1. INTRODUCCIÓN.....                                | 1   |
| 1. ANTECEDENTES .....                               | 3   |
| 2.1 Microalgas .....                                | 3   |
| 2.1.1 Producción de microalgas .....                | 4   |
| 2.1.2 Propiedades benéficas de las microalgas ..... | 4   |
| 2.1.2.1 Actividad antibacteriana .....              | 5   |
| 2.1.2.2 Actividad antiviral .....                   | 5   |
| 2.1.2.3 Actividad antifúngica .....                 | 6   |
| 2.1.2.4 Actividad antiparasitaria .....             | 6   |
| 2.1.2.5 Actividad anticancerígena.....              | 6   |
| 2.2 <i>Chlorella</i> spp.....                       | 7   |
| 2.2.1 <i>Chlorella sorokiniana</i> .....            | 8   |
| 2.3 Nejayote .....                                  | 8   |
| 2.3.1 Aplicaciones del nejayote .....               | 9   |
| 3 JUSTIFICACIÓN.....                                | 11  |
| 4 HIPÓTESIS.....                                    | 12  |
| 5 OBJETIVOS .....                                   | 13  |
| 5.1 Objetivo General.....                           | 13  |
| 5.2 Objetivos Específicos .....                     | 13  |

|           |                                                                                                     |           |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>6</b>  | <b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>                                                                      | <b>14</b> |
| 6.1       | Nejayote .....                                                                                      | 14        |
| 6.2       | <i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 1230 .....                                                        | 14        |
| 6.2       | Producción de <i>Chlorella sorokiniana</i> .....                                                    | 14        |
| 6.3       | Purificación de <i>Chlorella sorokiniana</i> .....                                                  | 15        |
| 6.4       | Obtención de extractos metanólicos crudos .....                                                     | 15        |
| 6.5       | Actividad biológica de extractos metanólicos.....                                                   | 16        |
| 6.5.1     | Cultivo de celulares tumorales y normales.....                                                      | 17        |
| 6.5.2     | Prueba de inhibición del crecimiento de células tumorales y normales .....                          | 18        |
| 6.5.3     | Cálculo de índice de selectividad .....                                                             | 17        |
| 6.5.4     | Actividad antibacteriana .....                                                                      | 16        |
| 6.5.5     | Actividad antifúngica .....                                                                         | 16        |
| 6.6       | Actividad antioxidante .....                                                                        | 17        |
| 6.7       | Actividad hemolítica .....                                                                          | 19        |
| 6.8       | Caracterización de extractos.....                                                                   | 20        |
| 6.8.1     | Pruebas de solubilidad.....                                                                         | 20        |
| 6.8.2     | Fraccionamiento de los extractos .....                                                              | 20        |
| 6.8.3     | Cromatografía en capa fina (CCF) .....                                                              | 22        |
| 6.8.4     | Caracterización de compuestos por cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS <sup>2</sup> )..... | 23        |
| 6.9       | Análisis estadístico .....                                                                          | 24        |
| <b>7.</b> | <b>RESULTADOS .....</b>                                                                             | <b>25</b> |
| 7.1       | Producción de <i>Chlorella sorokiniana</i> .....                                                    | 25        |
| 7.2       | Rendimiento de extractos metanólicos crudos.....                                                    | 29        |
| 7.3       | Actividad antibacteriana.....                                                                       | 30        |



|         |                                                                                                         |    |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.4     | Actividad antifúngica .....                                                                             | 31 |
| 7.5     | Inhibición del crecimiento de células tumorales y normales .....                                        | 33 |
| 7.6     | Actividad antioxidante .....                                                                            | 36 |
| 7.7     | Actividad hemolítica.....                                                                               | 37 |
| 7.8     | Caracterización de extractos con mayor actividad .....                                                  | 37 |
| 7.8.1   | Pruebas de solubilidad .....                                                                            | 38 |
| 7.8.2   | Fraccionamiento por cromatografía en columna .....                                                      | 39 |
| 7.8.3   | Inhibición de crecimiento de celular por las fracciones colectivas (CF) de <i>Ch. sorokiniana</i> ..... | 42 |
| 7.8.4   | Identificación de compuestos mediante LC-MS <sup>2</sup> .....                                          | 45 |
| 8       | DISCUSIÓN.....                                                                                          | 50 |
| 9.      | CONCLUSIONES .....                                                                                      | 55 |
| 10.     | PERSPECTIVAS.....                                                                                       | 56 |
| 11.     | BIBLIOGRAFÍA .....                                                                                      | 57 |
| ANEXO 1 | .....                                                                                                   | 66 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1:</b> Taxonomía de <i>Chlorella</i> .....                                                                                                                                                                                                       | 7  |
| <b>Tabla 2:</b> Gradiente de elución utilizada en la columna.....                                                                                                                                                                                         | 21 |
| <b>Tabla 3:</b> Rendimiento de extractos metanólicos crudos .....                                                                                                                                                                                         | 30 |
| <b>Tabla 4:</b> Porcentaje de viabilidad de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> tratados con el extracto metanólico de <i>Ch. sorokiniana</i> en presencia o ausencia de nejayote.....                                                                      | 31 |
| <b>Tabla 5:</b> Porcentaje de viabilidad de <i>Microsporium canis</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> y <i>T. mentagrophytes</i> tratados con el extracto metanólico de <i>Ch. sorokiniana</i> en presencia o ausencia de nejayote. .... | 32 |
| <b>Tabla 6.</b> Índice de citotoxicidad media (IC <sub>50</sub> ) con el extracto metanólico de <i>Ch. sorokiniana</i> en presencia o ausencia de nejayote contra las líneas celulares L5178Y-R, MCF7 y 4T1 a las 48 h .....                              | 34 |
| <b>Tabla 7.</b> IC <sub>50</sub> (µg/mL) e IS de las líneas L5178Y-R, MCF7 y CMSP al evaluar los diferentes extractos metanólicos de <i>Ch. sorokiniana</i> en presencia o ausencia de nejayote.....                                                      | 35 |
| <b>Tabla 8.</b> Actividad antioxidante del extracto metanólico crudo de <i>Ch. sorokiniana</i> , <i>Ch. sorokiniana</i> UTEX 1230 y <i>Ch. sorokiniana</i> + 100% nejayote mediante el método de eliminación de radicales DPPH. ....                      | 36 |
| <b>Tabla 9.</b> Actividad hemolítica contra eritrocitos humanos por el extracto crudo de <i>Ch. sorokiniana</i> y <i>Ch. sorokiniana</i> UTEX 1230.....                                                                                                   | 37 |
| <b>Tabla 10.</b> Resultados de pruebas de solubilidad para los extractos metanólicos de <i>Ch. sorokiniana</i> y <i>Ch. sorokiniana</i> UTEX 1230.....                                                                                                    | 38 |
| <b>Tabla 11:</b> Porcentaje de rendimiento y Rf calculado de fracciones colectivas de extractos de <i>Ch. sorokiniana</i> UTEX 1230 y <i>Ch. sorokiniana</i> . ....                                                                                       | 40 |
| <b>Tabla 12:</b> IC <sub>50</sub> (µg/ mL) de las CF de <i>Ch. sorokiniana</i> UTEX 1230 contra CMSP humana, L5178Y-R y MCF7 después de 48 h de exposición. ....                                                                                          | 42 |
| <b>Tabla 13:</b> IC <sub>50</sub> (µg/ mL) de las CF de <i>Ch. sorokiniana</i> contra CMSP, L5178Y-R y MCF7 después de 48 h de exposición.....                                                                                                            | 43 |
| <b>Tabla 14:</b> Actividad antioxidante de las fracciones colectivas (CF) de <i>Ch. sorokiniana</i> UTEX 1230. ....                                                                                                                                       | 44 |

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 15:</b> Actividad hemolítica contra eritrocitos humanos por las FCs de <i>Ch. sorokiniana</i> UTEX 1230 ..... | 45 |
| <b>Tabla 16:</b> Metabolitos caracterizados de la FC3 de <i>Ch. sorokiniana</i> UTEX 1230 con actividad biológica..... | 47 |
| <b>Tabla 17:</b> Metabolitos caracterizados de la FC4 de <i>Ch. sorokiniana</i> UTEX 1230 con actividad biológica..... | 48 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Cultivo axénico de <i>Ch. sorokiniana</i> en solución LC observada en microscopio.                                                                                               | 25 |
| <b>Figura 2.</b> Curva de crecimiento de <i>Ch. sorokiniana</i> a temperatura ambiente y agitación constante .....                                                                                | 26 |
| <b>Figura 3.</b> Producción de <i>Ch. sorokiniana</i> a nivel biorreactor en solución LC.. .....                                                                                                  | 27 |
| <b>Figura 4:</b> Curva de crecimiento de <i>Ch. sorokiniana</i> a nivel biorreactor a temperatura ambiente y agitación constante.....                                                             | 27 |
| <b>Figura 5.</b> Crecimiento de <i>Ch. sorokiniana</i> a distintas concentraciones de nejayote (100, 75, 50, 25, 10%) y solución LC como control.....                                             | 28 |
| <b>Figura 6:</b> Obtención de extractos metanólicos por soxhlet continuo de <i>Ch. sorokiniana</i> producida a nivel semi reactor en solución LC y a diferentes concentraciones de nejayote. .... | 29 |
| <b>Figura 7:</b> CCF de las fracciones de <i>Ch. sorokiniana</i> UTEX 1230 y <i>Ch. sorokiniana</i> . .....                                                                                       | 41 |
| <b>Figura 8:</b> Clases químicas asignadas a los metabolitos identificados en las muestras.....                                                                                                   | 46 |

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

|                                     |                                                          |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>%:</b>                           | Porcentaje                                               |
| <b>&lt; :</b>                       | Menor que                                                |
| <b>&gt; :</b>                       | Mayor que                                                |
| <b>µg:</b>                          | Microgramo                                               |
| <b>µL:</b>                          | Microlitro                                               |
| <b>µM:</b>                          | Micromolar                                               |
| <b>AcEt:</b>                        | Acetato de etilo                                         |
| <b>ANOVA:</b>                       | Análisis de varianza                                     |
| <b>C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:</b> | Hexano                                                   |
| <b>CCF:</b>                         | Cromatografía en capa fina                               |
| <b>Cel:</b>                         | Células                                                  |
| <b>CHCl<sub>3</sub>:</b>            | Cloroformo                                               |
| <b>cm:</b>                          | Centímetro                                               |
| <b>cm<sup>3</sup>:</b>              | Centímetro cubico                                        |
| <b>DMSO:</b>                        | Dimetil sulfóxido                                        |
| <b>DO:</b>                          | Densidad óptica                                          |
| <b>DPPH:</b>                        | 1,1-difenil-2-picrilhidracil.                            |
| <b>EDTA:</b>                        | Ácido etilendiaminotetraacético.                         |
| <b>et al.:</b>                      | y colaboradores                                          |
| <b>FC</b>                           | Fracción colectiva                                       |
| <b>g:</b>                           | Gramo                                                    |
| <b>h:</b>                           | Hora                                                     |
| <b>IC<sub>50</sub>:</b>             | Concentración inhibitoria media                          |
| <b>IS:</b>                          | Índice de selectividad                                   |
| <b>L:</b>                           | Litro                                                    |
| <b>LC-MS<sup>2</sup>:</b>           | Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas |
| <b>MeOH:</b>                        | Metanol                                                  |
| <b>mg:</b>                          | Miligramo                                                |
| <b>min:</b>                         | Minuto                                                   |

|                              |                                                               |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <b>mL:</b>                   | Mililitro                                                     |
| <b>MTT:</b>                  | Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-difeniltetrazolio |
| <b>nm:</b>                   | Nanómetros                                                    |
| <b>°C:</b>                   | Grados centígrados                                            |
| <b>CMSP:</b>                 | Células mononucleares de sangre periférica humana             |
| <b>PBS:</b>                  | Buffer de fosfato salino                                      |
| <b>PDB:</b>                  | Caldo papa dextrosa                                           |
| <b>pH:</b>                   | Potencial de hidrogeniones                                    |
| <b><i>R<sub>f</sub></i>:</b> | Factor de retención de la cromatografía de capa fina          |
| <b>rpm:</b>                  | Revoluciones por minuto                                       |
| <b>SD:</b>                   | Desviación estándar                                           |
| <b>SFB:</b>                  | Suero fetal bovino                                            |
| <b>TLC:</b>                  | Cromatografía en capa fina                                    |
| <b>UV:</b>                   | Luz ultravioleta                                              |

## RESUMEN

Las microalgas son una alternativa biotecnológica dada su capacidad de producción de diferentes metabolitos con diversas aplicaciones biológicas. Estos microorganismos tienen la capacidad de desarrollarse en diferentes medios de cultivo, como lo son algunos desechos industriales, lo que ha permitido emplearlas en procesos de biorremediación. El Nejayote, subproducto de la industria del maíz, representa una fuente de cultivo para la producción de *Chlorella sorokiniana*, la cual ha demostrado presentar actividad antitumoral y antiviral cuando se produce en medios convencionales. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto biológico de extractos metanólicos y células de *Ch. sorokiniana* producidas en Nejayote. El crecimiento de *C. sorokiniana* ( $2 \times 10^6$  células/mL) se evaluó durante un mes a cinco concentraciones de Nejayote (100%, 75%, 50%, 25% y 10%) donde el mayor crecimiento fue a las concentraciones más bajas (10% y 25%), comparado con el control (solución LC). Se evaluó la actividad antitumoral del extracto metanólico producido en medio LC contra las líneas tumorales LY5178Y-R, MCF7 y 4T1. Las  $IC_{50}$  obtenidas fueron de 219.6, 291 y  $> 500$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. El extracto metanólico en Nejayote al 100% mostró una  $IC_{50}$  de 92.38  $\mu\text{g/mL}$  contra MCF7. El extracto de *Ch. sorokiniana* se fraccionó mediante columna de sílice (hexano-metanol), y se separaron cinco fracciones colectivas, de las cuales se obtuvo una  $IC_{50}$  de 413.8, 93.22, 76.69, 117.1 y 486.2  $\mu\text{g/mL}$  en LY5178Y-R, y  $> 500$ , 126.4, 76.69, 100.9 y 298.3  $\mu\text{g/mL}$  en MCF7. Todas las fracciones evaluadas mostraron tener una alta actividad antioxidante comparadas con el control. Se seleccionaron las FC3 y FC4 para su caracterización por LC-MS<sup>2</sup> por tener mayor actividad anticancerígena y antioxidante, sin afectar células normales. Se logró caracterizar un total de 9 metabolitos reportados con alguna actividad anticancerígena, antitumoral y antioxidante. Se detectó que la FC3 contiene loliolida, ácido cinámico y dihidrojasmonato de metilo, mientras que la FC4 contiene loliolida, dihidrojasmonato de metilo, sansalvamida A, 1-monolinolenina, criptoficina 29, costunólido, lumicromo de riboflavina y germicidina B.

## ABSTRACT

Microalgae are a biotechnological alternative given their potential to produce metabolites with diverse biological applications. These microorganisms may develop in different culture media, such as some industrial waste, allowing them to be used in bioremediation processes. *Nejayote*, a byproduct of the corn industry, represents a culture source for the *Chlorella sorokiniana* production, which possesses antitumor and antiviral activities when produced in conventional media. This study aimed to evaluate the biological effect of methanol extracts and *Ch. sorokiniana* cells produced in *nejayote*. *C. sorokiniana* ( $2 \times 10^6$  cells/mL) growth was followed for one month in five different *Nejayote* concentrations (100%, 75%, 50%, 25%, and 10%), with the highest growth observed at lower concentrations (10% and 25%), compared with the control (LC solution). The antitumor activity of the methanol extract produced in LC medium against LY5178Y-R, MCF7, and 4T1 tumor cell lines was evaluated. The obtained IC<sub>50</sub> values were 219.6, 291, and > 500 µg/mL, respectively. The 100% methanol extract in *Nejayote* showed an IC<sub>50</sub> of 92.38 µg/mL against MCF7. *Ch. sorokiniana* extract was fractionated by silica column (hexane-methanol) obtaining five collective fractions, from which IC<sub>50</sub> values of 413.8, 93.22, 76.69, 117.1, and 486.2 µg/mL were obtained in LY5178Y-R, and > 500, 126.4, 76.69, 100.9, and 298.3 µg/mL in MCF7. All evaluated fractions showed high antioxidant activity compared with the control. FC3 and FC4 were selected for characterization by LC-MS<sup>2</sup> because they showed anticancer and antioxidant activities, without affecting normal cells. A total of 9 metabolites with reported anticancer, antitumor, and antioxidant activity were characterized. In FC3, loliolide, cinnamic acid, and methyl dihydrojasmonate were detected, whereas in FC4, loliolide, methyl dihydrojasmonate, sansalvamide A, 1-monolinolenin, cryptophycin 29, costunolide, riboflavin lumicrome and germicidin B were detected.



# 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer representa una enfermedad distribuida globalmente, cuyo diagnóstico temprano es fundamental para encontrar un tratamiento para su control o eliminación (Sung et al. 2021). El tratamiento de elección del cáncer se basa en fármacos químicos, radioterapia o extirpación del tumor mediante cirugía. Sin embargo, varios reportes revelan la presencia de otros tipos de cáncer que desarrollan resistencia, metástasis o en algunos casos, el cáncer podría resurgir (Senapati et al. 2018). La búsqueda de nuevos compuestos naturales con actividad antitumoral es una alternativa importante para la terapia de control del cáncer, para evitar la presencia de efectos secundarios o secuelas generadas por los tratamientos de elección.

Las microalgas representan una fuente importante de pigmentos, lípidos, carotenoides, ácidos grasos omega-3, polisacáridos, vitaminas y otros productos químicos, por lo que existe una demanda creciente para su uso como nutracéuticos y complementos alimenticios. Esta gran variedad de compuestos ha llevado a la evaluación de extractos e identificación de compuestos procedentes de estos microorganismos para estudios contra el asma, la diabetes, las infecciones virales, la inflamación y el cáncer (de Morais et al. 2015; Dewi et al. 2018; Oyeronke et al. 2023; Senhorinho et al. 2024).

La producción de microalgas a gran escala representa un costo adicional a la industria farmacéutica debido a las grandes cantidades de biomasa requeridas para la producción de los compuestos bioactivos, por lo tanto, el uso de otras alternativas sustentables para la producción de este microorganismo representa una fuente interesante para la obtención de estos compuestos (Reyna-Martínez et al. 2018).

El Nejayote es un producto de aguas residuales de la cocción alcalina del maíz, el cual, debido a la presencia de contaminantes relacionados con el medio ambiente, que al descargarse puede producir eutrofización, por lo cual requiere una acción de biorremediación (Chalé 2016; Zúñiga-Sánchez 2020).

Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio demostraron la capacidad de *Chlorella sorokiniana* para crecer en Nejayote al 22.5% a pH 7, lo cual representa una fuente importante en la obtención de esta microalga a partir de una fuente sustentable. Sin embargo, en diferentes cepas puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo (intensidad de la

luz, agitación, temperatura, etc.), disponibilidad de nutrientes y fase de crecimiento (Ballesteros-Torres et al. 2019).

Por lo anterior, *Chlorella sorokiniana*, podría ser una fuente de alternativa importante de compuestos bioactivos con actividad anticancerígena contra linfoma murino, cáncer de mama y actividad biocida, que al producirla utilizando como medio de crecimiento diferentes concentraciones de Nejayote, este podría potencializar su actividad citotóxica.

# **1. ANTECEDENTES**

## **2.1 Microalgas**

Se definen así a los organismos unicelulares, simples, primitivos que contienen clorofila y otros pigmentos fotosintéticos capaces de realizar fotosíntesis oxigénica; algunos de estos microorganismos producen compuestos bioactivos para aplicaciones farmacéuticas y biotecnológicas que han mostrado efectos antimicrobianos, antivirales, propiedades antitumorales e inmunomoduladoras (Luna 2007; Lordan et al. 2011; Shanab et al. 2012; Teas y Irhimeh 2012; El Baky et al. 2014).

Estos microorganismos unicelulares son capaces de convertir la energía solar en energía química mediante fotosíntesis; al respecto, se estima que el 40% de la fotosíntesis total de nuestro planeta es realizada por microalgas, ya que se encuentran en la mayoría de los hábitats del planeta, en mayor proporción en medios acuáticos, tanto en océanos como ríos (Mata et al. 2010; De Morais et al. 2015).

Con base en su morfología, existen dos tipos de microalgas: cianobacterias, que tienen estructura celular procariota, y otras microalgas, con estructura celular eucariota. Éstas se caracterizan por su capacidad de desarrollar procesos autotróficos, heterotróficos y/o mixotrófico y tener un metabolismo fotosintético (Mitra et al. 2012). Debido a su estructura multicelular, pueden crecer rápidamente y desarrollarse bajo condiciones ambientales adversas y estresantes, como calor, frío, anaerobiosis, salinidad, fotooxidación, presión osmótica y exposición a la radiación ultravioleta (Christaki et al. 2013).

Las microalgas poseen potencial de fitorremediación, ya que eliminan o biotransforman contaminantes de un medio líquido o gaseoso; además sintetizan una gran cantidad de compuestos bioactivos, como pigmentos, esteroides, polifenoles, ácidos grasos, proteínas, vitaminas, alcaloides y polisacáridos sulfatados (Ballesteros-Torres et al. 2019). Estos microorganismos son extremadamente diversos y representan una importante fuente natural de compuestos bioactivos sin explotar. La asimilación de compuestos contaminantes, pueden ser empleados por las microalgas para su propio cultivo, tales como nitrógeno,

fosforo y azufre en exceso, se considera una ventaja, ya que pueden proliferar malezas acuáticas que asimilan tales elementos (Hernández-Pérez y Labbé 2014; Basheer et al. 2020).

Estos microorganismos pueden ser considerados como una buena alternativa para el tratamiento de efluentes, debido a que pueden formar consorcios con bacterias, quienes realizan la degradación de la materia orgánica, mientras que las microalgas utilizan los compuestos inorgánicos, para llevar a cabo una eficiente bioconversión de la energía, para la eliminación de contaminantes orgánicos, lo cual se traduce finalmente en saneamiento de ambientes acuáticos, donde se mejora e incrementa la concentración de oxígeno (Salazar 2006). De ser posible, la recuperación de la biomasa de la microalga, esta podría emplearse como suplemento alimenticio (Ballesteros-Torres et al. 2019). Se ha demostrado que la alimentación con microalgas a personas mayores o animales protege contra enfermedades relacionadas a la edad, particularmente la hipertensión cardíaca o la hiperlipidemia (Janczyk et al. 2007).

### **2.1.1 Producción de microalgas**

Para su crecimiento, se requiere un balance adecuado de diferentes nutrientes y condiciones ambientales. Los factores que influyen en su crecimiento son: luz, temperatura, pH, salinidad, fuente de carbono, nutrientes del medio de cultivo, características del inóculo, agitación, evaporación y contaminación (Ballesteros-Torres et al. 2019; Sathasivam et al. 2019; Junior et al. 2020). La producción de biomasa de microalgas puede ser aprovechada para diversos fines biotecnológicos, como la producción de biocombustibles, alimentación humana y animal, cosméticos, obtención de sustancias activas con uso en salud, entre otros (Brennan y Owende 2010; Sarkar et al. 2020).

### **2.1.2 Propiedades benéficas de las microalgas**

Se ha demostrado que estas ayudan a promover la salud y reducir el riesgo del desarrollo de enfermedades degenerativas, representan un potencial farmacológico pues sus metabolitos pueden presentar actividad anti-inflamatoria, antimicrobiana, antioxidante y

antitumoral, y su uso para el tratamiento de diferentes patologías como la enfermedad inflamatoria intestinal, aterosclerosis, Parkinson, Alzheimer y cáncer (Román 2014; de Moraes et al. 2015).

Entre las moléculas bioactivas importantes producidas por estas, se encuentran los carotenoides ( $\beta$ -caroteno, xantofilas, luteína, astaxantina), polisacáridos, ficobiliproteínas, vitaminas, compuestos fenólicos y volátiles, ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga, así como otras proteínas, lípidos, almidón, glicerol, enzimas, esteroides, pigmentos naturales o biopolímeros, que pueden ser obtenidos a partir de su producción (Román 2014, Hernández y Labbé 2014; Junior et al. 2020). La actividad antioxidante se asocia con un efecto protector en contra de especies reactivas de oxígeno formadas ya sea por el metabolismo propio o incluso por factores externos como el estrés, la radiación ultravioleta etc. Entre algunas de las sustancias antioxidantes que poseen, están la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) y los carotenoides los cuales son solubles en solventes no polares, mientras que también podemos encontrar polifenoles, ficobiliproteínas y vitamina C como compuestos solubles en soluciones acuosas (Shalaby 2011).

#### **2.1.2.1 Actividad antibacteriana**

Estos microorganismos son productores de metabolitos secundarios, los cuales se acumulan en el medio de cultivo durante el crecimiento exponencial y estacionario. Se han sugerido diversos compuestos por tener actividad antibacteriana, como ácidos grasos, terpenoides, péptidos, carbohidratos, alcaloides y polisacáridos. La producción de estos metabolitos suele ser mayor cuando las condiciones son desfavorables. Algunos estudios mencionan a las microalgas con un efecto antibacteriano favorable contra bacterias patógenas como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, y *V. anguillarum*, entre otras (Kokou et al. 2012; Najdenski et al. 2013; Pradhan et al. 2014).

#### **2.1.2.2 Actividad antiviral**

Estudios recientes han demostrado, que algunas microalgas por sí solas, pueden tener un efecto antiviral significativo contra *Rotavirus Wa*, por otro lado, otros estudios mencionan un efecto contra citomegalovirus murino (M-CMV) y el virus del herpes simple 1 (HSV-1) (Ibusuki y Minamishima 1990; Santoyo et al. 2012; Cantú-Bernal et al. 2020).

#### **2.1.2.3 Actividad antifúngica**

Estudios han demostrado el efecto de extractos de distintas microalgas con actividad antifúngica como es el caso de Volk y Furkert (2006) en el cual *C. pyrenoidosa* y *Scenedesmus quadricauda* mostraron efecto contra *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium herquei*, *Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium sp.*, *Alternaria brassicae*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*.

#### **2.1.2.4 Actividad antiparasitaria**

Las microalgas también han mostrado tener actividad antiparasitaria. En un estudio realizado en el 2014, se utilizaron los extractos de alcaloides y acetato de etilo de *Cladophora crispata*, y estos disminuyeron el número y el peso de los quistes de *Echinococcus granulosus* (Athbi et al. 2014). Además, en un estudio más reciente, el extracto hidrofílico de *C. vulgaris* en concentraciones de 37.5, 75 y 150 mg/mL, resultó ser letal para el nematodo *Steinernema feltiae* (Zielinski et al. 2020).

#### **2.1.2.5 Actividad anticancerígena**

Otra actividad importante de las microalgas es su capacidad antitumoral o anticancerígena; la cual se relaciona con la producción de  $\beta$ -1,3-glucano, el cual se relaciona con la estimulación de la respuesta inmune y elimina radicales libres. Los estudios biológicos se han centrado en el efecto antitumoral relacionado con los polisacáridos que pueden tener actividad inmunoestimulante. Un ejemplo es la fucoxantina, un carotenoide de microalgas que presenta propiedades anticancerígenas mediante la prevención del crecimiento de células

malignas, estimulación de genes supresores de tumor y el arresto del ciclo celular. Varios estudios han demostrado que *Chlorella* spp. ayuda a suprimir varias formas de cáncer, y también se ha observado resistencia a la invasión de patógenos (Suárez et al. 2008; Hudek et al. 2014; Abd El-Hack et al. 2019). Estudios previos, con microalgas del estado de Nuevo León evaluaron su actividad citotóxica contra un tipo de linfoma, los cuales presentaron actividad extractos de *Scenedesmus* spp. y *Chlorella* spp., las cuales se proponían emplearse como un suplemento potencial en la prevención o reducción de la formación de tumores por este tipo de cáncer (Reyna-Martínez et al. 2018).

## 2.2 *Chlorella* spp.

Es un género de algas verdes eucariotas, unicelulares que pertenecen a la división de *Chlorophyta* (Tabla 1), son células esféricas o elipsoidales que no contienen flagelos de 2 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. Están distribuidos en diversos hábitats tales como el agua dulce, de mar y el suelo, son de vida libre o simbiótica con protozoos y como líquenes. Para su metabolismo solo requieren de dióxido de carbono, agua, luz solar y una pequeña cantidad de minerales (Beheshtipour et al. 2013; Liu y Hu 2013; de Morais et al. 2015).

**Tabla 1:** Taxonomía *Chlorella*

|                  |                                |
|------------------|--------------------------------|
| <b>Reino:</b>    | <i>Protista (Primoplantae)</i> |
| <b>División:</b> | <i>Chlorophyta</i>             |
| <b>Clase:</b>    | <i>Trebouxiophyceae</i>        |
| <b>Orden:</b>    | <i>Chlorellales</i>            |
| <b>Familia:</b>  | <i>Chlorellaceae</i>           |
| <b>Género:</b>   | <i>Chlorella</i>               |

El género *Chlorella* contiene  $\alpha$ -clorofila y  $\beta$ -clorofila en sus cloroplastos, su biomasa contiene aproximadamente 53% de proteína, 23% de carbohidratos, 9% lípidos, 5% de minerales y elementos de colesterol, además de, provitamina A, vitaminas B1, B2, B6, B12,

C y E, ácido fólico, niacina y ácido pantoténico, además presenta minerales como sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, manganeso, zinc, cobre, etc. (Liu y Hu, 2013; de Morais et al. 2015; Sarkar et al. 2020).

Diversos estudios mencionan que extractos ingeridos pueden disminuir los niveles de azúcar en sangre, aumentar concentraciones de hemoglobina, actuar como agentes hipocolesterolemicos y hepatoprotectores durante la desnutrición y reducir la intoxicación por etionina. Además, se ha demostrado que *Chlorella* presenta diversos efectos inmunológicos, como acción antibacteriana y antiviral (Blas-Valdivia et al. 2011; Beheshtipour et al. 2013; Cantú-Bernal et al. 2020).

### **2.2.1 *Chlorella sorokiniana***

Esta microalga juega un papel importante tanto en la industria farmacéutica como en la alimentación, debido a que su biomasa es rica en carbohidratos, vitaminas y proteínas. El alto contenido de proteína lo convierte en una materia prima adecuada para la producción de proteína unicelular, mientras que su alto contenidos de vitaminas lo convierten en un alimento adecuado para los sistemas de acuicultura (Chader et al. 2009; Kumar et al. 2012). Esta microalga ha demostrado tener efectos antitumorales, antivirales y antibacteriales (Reyna-Martínez et al. 2018; Tejano et al. 2019; Cantú-Bernal et al. 2020).

*Ch. sorokiniana* ha mostrado tener la capacidad de crecer en aguas residuales con grandes cargas de materia orgánica y adaptarse al estrés fisiológico (Gupta et al. 2016; Ballesteros-Torres et al. 2019).

Además, puede crecer fototróficamente usando aguas residuales y gases de escape, observando que los rendimientos de biomasa de las corrientes de desecho fueron comparables a otros medios comerciales (Lizzul et al. 2014).

## **2.3 Nejayote**



El Nejayote es generado mediante el proceso de nixtamalización, el cual es el método de cocción en el que se hierva el maíz en agua con cal para obtener el nixtamal. Este es un agua residual contaminante que contiene altas concentraciones de cal, materia orgánica, con alta demanda química de oxígeno, nitrógeno y un valor de pH cercano al límite máximo de alcalinidad (pH 11-13) (Valderrama-Bravo et al. 2012; Vacio-Muro et al. 2020).

Este residuo generalmente se desecha en los desagües o ríos cercanos a las plantas de nixtamalización, donde puede inhibir el crecimiento de las plantas, inducir la muerte de organismos acuáticos y causar graves problemas ambientales por un aumento de nutrientes en los ecosistemas. El Nejayote retiene nutrientes y compuestos fenólicos, con baja disponibilidad debido a los enlaces formados entre estos compuestos en la fibra del grano de maíz y liberados en el líquido durante el proceso de nixtamalización; la disponibilidad de estos compuestos se incrementa mediante la aplicación de procesos de hidrólisis alcalina y enzimática. Sin embargo, estos procesos son costosos e incluyen múltiples pasos, los cuales requieren la producción y purificación de enzimas (Ramírez et al. 2020; Vacio-Muro et al. 2020).

### **2.3.1 Aplicaciones del Nejayote**

El Nejayote se ha sugerido para el cultivo de probióticos, para la producción de biogás, y para la formulación de medios de cultivo para otros microorganismos, por su contenido nutrimental, rico en polisacáridos, fibra cruda, almidón, compuestos fotoquímicos, vitaminas y proteínas (Figueroa-González et al. 2011; García-Depraect et al. 2017).

En un estudio realizado por López-Pacheco et al. (2019), trataron el Nejayote y aguas residuales porcinas con las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Arthospira máxima*; sus resultados mostraron que estas microalgas pueden usarse para remediar ese tipo de aguas residuales y al mismo tiempo usarlas como medio de cultivo para microalgas. Además, la biomasa resultante se puede utilizar para obtener otros subproductos de interés comercial. Por otro lado, Salmerón-Alcocer et al. (2003) trataron biológicamente el Nejayote con microorganismos aislados de suelo contaminado por este, implementando un sistema de

biorreactores en cascada triple y emplearon como medio de cultivo el residuo para *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas putida* y *Paenibacillus amyloluticus*.

### 3 JUSTIFICACIÓN

Las microalgas son una alternativa viable para la búsqueda y producción de compuestos con actividad biológica de interés farmacológico, ya que presentan con facilidad de crecimiento en diferentes medios de cultivo. Esta gran variedad de los compuestos ha llevado a la evaluación e identificación de los compuestos presentes en extractos con actividad anticancerígena, biocida y antioxidante procedentes de estos microorganismos. Sin embargo, la producción de compuestos bioactivos a gran escala representa un costo adicional en la industria, por las grandes cantidades de biomasa requeridas. Dada su capacidad de crecimiento en diferentes sustratos, el Nejayote, residuo del proceso de nixtamalización del maíz, considerado un desecho altamente contaminante debido a su demanda bioquímica de oxígeno, por lo que requiere tratamiento. Por lo tanto, en el presente estudio nos propusimos evaluar la capacidad biológica de los compuestos bioactivos de *Ch. sorokiniana* producida en Nejayote sobre un modelo de linfoma murino, cáncer de mama y su actividad biocida contra bacterias y hongos.

## **4 HIPÓTESIS**

Las fracciones colectivas de *Chlorella sorokiniana* cultivada en Nejayote, presentan actividad biológica de importancia médica.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Caracterizar el efecto biológico de los compuestos producidos por *Chlorella sorokiniana* cultivada en Nejayote.

### 5.2 Objetivos Específicos

- 5.2.1 Evaluar el efecto biocida y antitumoral *in vitro* de extractos metanólicos crudos de *Ch. sorokiniana* cultivada en Nejayote a nivel de laboratorio y biorreactor.
- 5.2.2 Determinar el efecto biocida y antitumoral *in vitro* de las fracciones de los extractos metanólicos producidos de *Ch. sorokiniana* cultivada en Nejayote.
- 5.2.3 Identificar los compuestos bioactivos producidos por *Ch. sorokiniana* con actividad biocida y antitumoral *in vitro*.

## 6 MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Nejayote

La muestra de Nejayote se obtuvo de un molino de nixtamal semi industrial en la ciudad de Guadalupe, Nuevo León, utilizando un solo lote para todos los experimentos realizados.

### 6.2 *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230

Se utilizó como cepa de referencia la biomasa de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230, y se obtuvo de *Chlorella* Manna (HealthForce SuperFoods, San Francisco, CA, EE. UU.)

### 6.2 Producción de *Chlorella sorokiniana*

La cepa de *Ch. sorokiniana* fue facilitada por la Unidad de Formulación de Biológicos de la UANL (Reyna-Martínez et al. 2018). La producción de *Ch. sorokiniana* se realizó utilizando una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  células/mL en solución LC, se produjo en un matraz Erlenmeyer en un volumen de 250 mL a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación de 120 rpm y luz blanca de 800 lux constante durante 28 días. Semanalmente se tomó una alícuota de un mililitro en un microtubo de 1.5 mL y se realizó una dilución 1:10 de la muestra en 900  $\mu\text{L}$  de solución salina al 0.85%. Posteriormente se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra y se utilizó la cámara de Neubauer para recuento celular hasta que el cultivo llegó a fase estacionaria.

Una vez obtenido el inóculo de *Ch. sorokiniana*, se realizó la producción de los diferentes tratamientos utilizando concentraciones de 10, 25, 50, 75 y 100% de Nejayote semi industrial en agua de la llave, ajustando el pH a 7.0 e iniciando a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL, como control se utilizó el crecimiento de *Ch. sorokiniana* en Solución LC reportada por Lopez-Chuken et al. (2010) (Anexo 1). Estos se produjeron en un matraz Erlenmeyer en un volumen de 250 mL cada uno, a las condiciones anteriormente mencionadas durante un mes. A partir de su inoculación, semanalmente se tomó una alícuota

de un mililitro en un microtubo de 1.5 mL y se realizó una dilución 1:10 de la muestra en 900 µL de solución salina al 0.85%. Después, se tomaron 10 µL de la muestra y se utilizó la cámara de Neubauer para recuento celular hasta que el cultivo llegó a fase estacionaria.

Posteriormente, se realizó la producción a nivel semi-piloto en un volumen de 5 y 17 L en los medios previamente mencionados y se incubó a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un flujo de 180 L/h con una bomba sumergible y luz blanca de 800 lux constante durante 1 mes. Cada 7 días a partir de su inoculación, se tomó una alícuota de un mililitro en un microtubo de 1.5 mL, y se realizó una dilución 1:10 de la muestra en 900 µL de solución salina al 0.85%. Después, se tomaron 10 µL de la muestra y se utilizó la cámara de Neubauer para recuento celular hasta que el cultivo llegó a fase estacionaria.

### **6.3 Purificación de *Chlorella sorokiniana***

Una vez transcurrido el tiempo de producción en ambos medios, la biomasa se obtuvo mediante centrifugación a 10,000 rpm durante cinco minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , retirando el sobrenadante. Después de obtener la biomasa, se realizaron lavados continuos con PBS estéril en una proporción de 1:3 volúmenes centrifugando a 10,000 rpm durante cinco minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para eliminar residuos del medio presentes en el *pellet* en base a lo establecido por Martínez (2012). Posterior a esto, la biomasa se sometió a liofilización.

### **6.4 Obtención de extractos metanólicos crudos**

Se utilizaron dos gramos de biomasa liofilizada de *Ch. sorokiniana* en Solución LC y *Ch. sorokiniana* crecida en las diferentes concentraciones de Nejayote (10%, 25%, 50%, 75% y 100%), como solvente de extracción se utilizó 500 mL de metanol absoluto y se colocaron en un extractor Soxhlet montado sobre un agitador magnético para obtener agitación constante durante 48 h.

De la biomasa de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 se colocó 50 g en 500 mL de metanol con agitación constante a 120 rpm durante 48 h como lo menciona Uma et al. (2011). Una vez terminado el tiempo de extracción, los extractos se dejaron enfriar a temperatura

ambiente y después se filtraron con un papel filtro Whatman N°1. El producto se sometió a un SpeedVac (Thermo Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, EE. UU.) para la eliminación del solvente. Los extractos finales se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

## **6.5 Actividad biológica de extractos metanólicos**

### **6.5.1 Actividad antibacteriana**

Se evaluó la actividad antibacteriana, en las cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) y *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™), siendo una Gram negativa y otra Gram positiva. Se incubaron 100 µL de una suspensión de  $2 \times 10^6$  células/mL en infusión cerebro corazón (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI) en presencia o ausencia de diluciones en serie de 100 µL de los extractos metanólicos, NaClO y medio de cultivo (control negativo), en placas de 96 pozos de fondo redondo (Corning Incorporated, Corning, New York, EE. UU.) durante 24 h a 37 °C, posteriormente se evaluó el crecimiento microbiano midiendo las densidades ópticas (DO) a 600 nm, utilizando un lector de microplacas (espectrofotómetro de microplacas Multiskan™ Go; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EE. UU.).

El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{DO}_{600} \text{ células tratadas}}{\text{DO}_{600} \text{ células no tratadas}} \times 100$$

### **6.5.2 Actividad antifúngica**

Se evaluó su efecto contra *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton rubrum* y *T. mentagrophytes*. Primeramente, se reactivaron en caldo de papa dextrosa (PDB) hasta obtener una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL, se adicionó un volumen de 100 µL en placas de 96 pozos, posteriormente se colocaron los tratamientos con las distintas concentraciones de extractos metanólicos de *Ch. sorokiniana* y las placas se incubaron a 28 °C por cinco días. Pasado el tiempo de incubación se les adicionaron 15 µL de bromuro de 3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.) a cada uno de los pozos a una concentración final de 0.5 mg/mL y



se incubaron de 3 h a 4 h. Al término de la incubación, la solución se retiró, se le adicionaron 80 µL de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) a cada pozo y se midió la DO a 570 nm en un lector de microplacas (Thermo Fisher Scientific). El porcentaje de citotoxicidad se determinó de acuerdo con el reporte de Quintanilla-Licea et al. (2016).

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \frac{DO_{570} \text{ células tratadas}}{DO_{570} \text{ células no tratadas}} \times 100$$

### 6.5.3 Cultivo de células tumorales y normales

La línea celular de cáncer de mama 4T1 (ATTC® CRL-2539), cáncer de mama humano MCF7 (ATCC HTB-2) y linfoma murino L5178Y-R (ATCC CRL-1722), se obtuvieron del banco de células del Laboratorio de Inmunología y Virología de la FCB de la UANL y células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de humano que se utilizaron como control positivo, se obtuvieron a partir de sangre de donadores voluntarios (obteniendo su consentimiento informado, y aprobado por el comité de investigación de la FCB bajo el número CI-08-2020), mediante un gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, EE. UU.) mediante el procedimiento indicado por el proveedor. Las células 4T1 y MCF7 se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) y solución antibiótica-antifúngica al 1% (Life Technologies) (medio de cultivo completo), mientras que las L5178Y-R y CMSP se mantuvieron en RPMI-1640 (Life Technologies) suplementado con SFB al 10% y solución antibiótica-antifúngica al 1%. Se cultivaron las células a 37 °C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> en frascos de cultivo de 25 cm<sup>3</sup> (Quintanilla-Licea et al. 2016).

### 6.5.4 Cálculo de índice de selectividad

Para la determinación del índice de selectividad (IS), se inició calculando la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) de todos los tratamientos mediante una regresión no

lineal. Se utilizaron los valores de IC<sub>50</sub> de los tratamientos de las líneas tumorales y normales (CMSP) para determinar el IS (Al-Qubaisi et al. 2011). La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$IS = (IC_{50} \text{ células normales}) / (IC_{50} \text{ células tumorales})$$

#### 6.5.5 Prueba de inhibición del crecimiento de células tumorales y normales

Para la evaluación de la actividad en la inhibición de las células tumorales y normales de los extractos y fracciones metanólicas se utilizó el ensayo colorimétrico de reducción del MTT (Affymetrix, Cleveland, OH, EE. UU) como lo menciona Mosmann (1983), las células 4T1, MCF7 y L5178Y-R se cultivaron a una concentración de  $1 \times 10^4$  células/pozo y los CMSP a  $1 \times 10^5$  células/pozo (100  $\mu$ L) en placas de 96 pozos (Corning Incorporated), por 24 h a 37 °C y en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 55% de humedad relativa. Posteriormente, se colocaron 100  $\mu$ L de los extractos en concentraciones que van desde los 7.8125  $\mu$ g/mL a 500  $\mu$ g/mL y se incubaron por 48 h a las condiciones anteriormente mencionadas. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron 15  $\mu$ L de MTT a los pozos (concentración final 0.5 mg/mL) y se incubaron de 3 h a 4 h adicionales. Al término de la incubación, se decantó la solución y los cristales de formazán que se formaron se disolvieron en 150  $\mu$ L de DMSO a cada pozo y se midieron las DO a 570 nm en un lector de microplacas (Thermo Fisher Scientific). El porcentaje de inhibición de crecimiento se calculó mediante la siguiente formula:

$$\text{Inhibición de crecimiento (\%)} = 100 - \frac{\text{DO 570 células tratadas}}{\text{DO 570 células no tratadas}} \times 100$$

#### 6.6 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó mediante el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.). Para esto, se incubaron 100  $\mu$ L de DPPH (88  $\mu$ M) y 100  $\mu$ L de extractos metanólicos de *Ch. sorokiniana* en concentraciones que van de 7.8125  $\mu$ g/mL a 500  $\mu$ g/mL en placas de 96 pozos. Se incubaron las placas durante 30 min a 37 °C en oscuridad. Luego se midieron las DO a 517

nm en un lector de microplacas (Thermo Fisher Scientific), utilizando ácido ascórbico 50 µM como control positivo y DMSO (blanco) como control negativo (Ramírez-Villalobos et al. 2023). El porcentaje de actividad antioxidante se calculó utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ de Actividad antioxidante} = \frac{DO_{517} \text{ blanco} - DO_{517} \text{ muestra}}{DO_{517} \text{ blanco}} \times 100$$

Los valores medios de concentración inhibitoria (IC<sub>50</sub>) se calcularon con los datos obtenidos. El nivel de actividad antioxidante se clasificó como débil (IC<sub>50</sub> > 1000 µg/mL), moderado (IC<sub>50</sub> = 200 µg/mL a 1000 µg/mL) y alto (IC<sub>50</sub> < 200 µg/mL) (Ramírez-Villalobos et al. 2023).

## 6.7 Actividad hemolítica

Para la evaluación de la actividad hemolítica de los extractos y fracciones, se obtuvo la sangre de un voluntario sano (obteniendo su consentimiento informado), y se recolectó en tubos anticoagulantes EDTA (BD Vacutainer K2 EDTA; Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) y se centrifugó a 400 rpm a 17 °C por cinco minutos. Se retiró el sobrenadante y se adicionó PBS 1X (pH 7.2) al tubo y se homogenizó, posteriormente se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones mencionadas anteriormente, este proceso se realizó tres veces para la eliminación del plasma del paquete celular. Concluida la última centrifugación, se descartó el sobrenadante y el paquete celular se diluyó con PBS estéril hasta obtener una solución del 5%.

Para la actividad hemolítica, evaluamos *in vitro* el extracto metanólico crudo y las fracciones de *Ch. sorokiniana* y *Ch. sorokiniana* UTEX 1230. Se tomaron 250 µL de la suspensión de eritrocitos al 5% y se añadieron a microtubos que contenían un mililitro de diferentes concentraciones de las muestras que oscilaban entre 7.8125 µg/mL y 1000 µg/mL diluidas en PBS. Las muestras se incubaron por 30 min a 37 °C en obscuridad. Después se centrifugaron a 13,000 rpm a 4 °C por 5 min. Posteriormente, se tomaron 200 µL del sobrenadante y se colocaron en placas de 96 pozos. Las placas se leyeron a una DO de 540 nm en un lector de microplacas. Se utilizó eritrocitos con PBS como control negativo y eritrocitos con agua destilada para producir hemólisis como control positivo (Elizondo-

Luévano et al. 2022). El porcentaje de hemólisis para cada muestra se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Hemólisis} = \frac{DO_{540} \text{ tratamiento}}{DO_{540} \text{ control positivo}} \times 100$$

## 6.8 Caracterización de extractos

Para la caracterización de los extractos se seleccionaron los que presentaron mayor inhibición de crecimiento en células tumorales y con un IS > 10.

### 6.8.1 Pruebas de solubilidad

Para las pruebas de solubilidad a las muestras de los extractos seleccionados, colocadas en tubos de vidrio, se les adicionó un mililitro de los siguientes solventes con distinta polaridad: hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol. Las mezclas se agitaron vigorosamente y se registró si eran solubles o insolubles en dichos solventes. Con estos resultados, se seleccionaron los solventes que se utilizaron para la elución en el fraccionamiento en columna.

### 6.8.2 Fraccionamiento de los extractos

Los extractos metanólicos crudos de *Ch. sorokiniana* y *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 fueron fraccionados mediante cromatografía en columna. En este ensayo se utilizó una columna de vidrio de 40 cm., la misma fue preparada con 20 g de sílica gel fase normal con tamaños de partícula entre 0.063 a 0.200 nm (Merck, Darmstadt, Alemania) con hexano como solvente de empaquetamiento (Rodríguez-Garza et al. 2024). Se adicionaron 500 mg de la muestra de extractos a la columna previamente disuelta en Hexano (de uno a tres mililitros), la cual fue colocada en la parte superior de la columna. Después de colocada la muestra, se continuó con las eluciones de solventes escalonados como se muestran en la Tabla 2. Las fracciones se colectaron en frascos de vidrio de cinco mililitros, manteniendo un goteo de 8

a 10 gotas por minuto. Se obtuvieron un total de 107 fracciones del extracto de *Ch. sorokiniana* y 120 fracciones de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 que se agruparon según su perfil de cromatografía en capa fina (TLC) (hexano-cloroformo 1:1 y cloroformo-acetato de etilo 1:1) y se obtuvieron cinco fracciones colectivas (FC) (FC1-FC5) para *Ch. sorokiniana* y seis fracciones colectivas (FC1-FC6) para *Ch. sorokiniana* UTEX 1230. Los solventes se dejaron evaporar a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta que las fracciones estuvieron secas.

**Tabla 2:** Gradiente de elución utilizada en la columna.

| Volumen total (mL) | Solvente                                           | Relación (%) | Fracciones |
|--------------------|----------------------------------------------------|--------------|------------|
| 20                 | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>                     | 100          | 1-4        |
| 40                 | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> - CHCl <sub>3</sub> | 90:10        | 5-8        |
| 60                 | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> - CHCl <sub>3</sub> | 80:20        | 9-12       |
| 80                 | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> - CHCl <sub>3</sub> | 70:30        | 13-16      |
| 100                | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> - CHCl <sub>3</sub> | 60:40        | 17-20      |
| 120                | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> - CHCl <sub>3</sub> | 50:50        | 21-24      |
| 140                | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> - CHCl <sub>3</sub> | 60:40        | 25-28      |
| 160                | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> - CHCl <sub>3</sub> | 50:40        | 29-32      |
| 180                | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> - CHCl <sub>3</sub> | 40:60        | 33-36      |
| 200                | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> - CHCl <sub>3</sub> | 30:70        | 37-40      |
| 220                | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> - CHCl <sub>3</sub> | 20:80        | 41-44      |
| 240                | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> - CHCl <sub>3</sub> | 10:90        | 45-48      |
| 260                | CHCl <sub>3</sub>                                  | 100          | 49-52      |
| 280                | CHCl <sub>3</sub> - AcEt                           | 90:10        | 53-56      |
| 300                | CHCl <sub>3</sub> - AcEt                           | 80:20        | 57-60      |
| 320                | CHCl <sub>3</sub> - AcEt                           | 70:30        | 61-64      |
| 340                | CHCl <sub>3</sub> - AcEt                           | 60:40        | 65-68      |
| 360                | CHCl <sub>3</sub> - AcEt                           | 50:50        | 69-72      |
| 380                | CHCl <sub>3</sub> - AcEt                           | 60:40        | 73-76      |
| 400                | CHCl <sub>3</sub> - AcEt                           | 50:40        | 77-80      |
| 420                | CHCl <sub>3</sub> - AcEt                           | 40:60        | 81-84      |
| 440                | CHCl <sub>3</sub> - AcEt                           | 30:70        | 85-88      |
| 460                | CHCl <sub>3</sub> - AcEt                           | 20:80        | 89-92      |

|     |                          |       |         |
|-----|--------------------------|-------|---------|
| 480 | CHCl <sub>3</sub> - AcEt | 10:90 | 93-96   |
| 500 | AcEt                     | 100   | 97-100  |
| 520 | AcEt - MeOH              | 90:10 | 101-104 |
| 540 | AcEt – MeOH              | 80:20 | 105-108 |
| 560 | AcEt – MeOH              | 70:30 | 109-112 |
| 580 | AcEt - MeOH              | 60:40 | 113-116 |
| 600 | AcEt – MeOH              | 50:50 | 117-120 |
| 620 | AcEt - MeOH              | 60:40 | 121-124 |
| 640 | AcEt – MeOH              | 50:40 | 125-128 |
| 660 | AcEt – MeOH              | 40:60 | 129-132 |
| 680 | AcEt – MeOH              | 30:70 | 133-136 |
| 700 | AcEt – MeOH              | 20:80 | 137-140 |
| 720 | AcEt - MeOH              | 10:90 | 141-144 |
| 740 | MeOH                     | 100   | 145-148 |

---

### 6.8.3 Cromatografía en capa fina (CCF)

Se realizó una cromatografía de capa fina (TLC) para la determinación de los metabolitos de las fracciones de cada tercera fracción. Para esta técnica se emplearon cromatoplasmas de sílica gel fase normal de 5 × 10 cm con indicador de fluorescencia sobre aluminio (TLC Sílica Gel 60 F254; Merck). Cada tercera fracción se disolvió en una pequeña cantidad de solvente y se colocaron a un centímetro del borde inferior de la cromatoplasma con la ayuda de un capilar. La placa se colocó en una cámara cromatográfica que contenía 10 mL de la fase móvil (eluyente). Una vez terminado el proceso de separación (0.5 cm del borde superior), las placas se dejaron secar por 24 h, para posteriormente revelar mediante luz visible y radiación de luz ultravioleta de onda corta y larga (UV 254/ UV 365 nm), mediante una lámpara de luz UV portátil. Después se expusieron a vapores de yodo dentro de una cámara. Posteriormente, se determinó la relación entre las distancias recorridas por los compuestos y por el eluyente desde el origen de la placa para determinar el valor *R<sub>f</sub>* utilizando la siguiente formula (Samaniego 2016):

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el eluyente}}$$

Los perfiles cromatográficos parecidos de las fracciones se unieron para formar fracciones colectivas (FC). Se determinó el peso de cada una de las FC y se calculó el porcentaje de rendimiento mediante la siguiente formula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso del extracto seco al inicio}}{\text{Peso de la FC}} \times 100$$

#### **6.8.4 Caracterización de compuestos por cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS<sup>2</sup>)**

Las FC que mostraron una mayor actividad biológica fueron seleccionadas para caracterizar los compuestos presentes en ellas. Para ello, se enviaron cinco miligramos de las muestras para su análisis mediante LCMS<sup>2</sup> al Laboratorio Especializado en Metabolómica y Proteómica (MetPro) del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) ubicado en Baja California, México.

El análisis de las muestras se realizó en un sistema Agilent 1260 Infinity LC (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EE. UU.). Las moléculas se separaron a través de una columna ProtID-Chip-43 II (C18, 43 mm, 300 Å, tamaño de partícula de 5 µm, equipada con una columna de enriquecimiento de 40 nL). Las fases móviles consistieron en H<sub>2</sub>O con un 0.1% de ácido fórmico como solución A y acetonitrilo con un 0.1% de ácido fórmico como solución B. El efluente de la columna se introdujo en un espectrómetro de masas 6530 Accurate-Mass Q-TOF (Agilent Technologies Inc.) para adquirir los datos de las masas de los compuestos a través de una interfaz HPLC-Chip Cube MS, empleando ionización por nanospray en modo positivo.

El procesamiento y análisis de los datos obtenidos se realizó mediante paquetes de software de acceso abierto y plataformas en línea como Natural Products Social Molecular Networking (GNPS, <https://gnps.ucsd.edu> revisado 20 septiembre de 2024) para la anotación estructural y para los metabolitos que no fueron recuperados mediante coincidencia espectral,

se utilizó la herramienta *in silico* Mol Discovery y Dereplicator incorporadas en la plataforma GNPS. Como herramienta complementaria, se utilizó el paquete CSI:FingerID del software SIRIUS. Las clases químicas de los metabolitos identificados se determinaron utilizando la aplicación web Classyfire (<http://classyfire.wishartlab.com> revisado 26 de septiembre de 2024).

## 6.9 Análisis estadístico

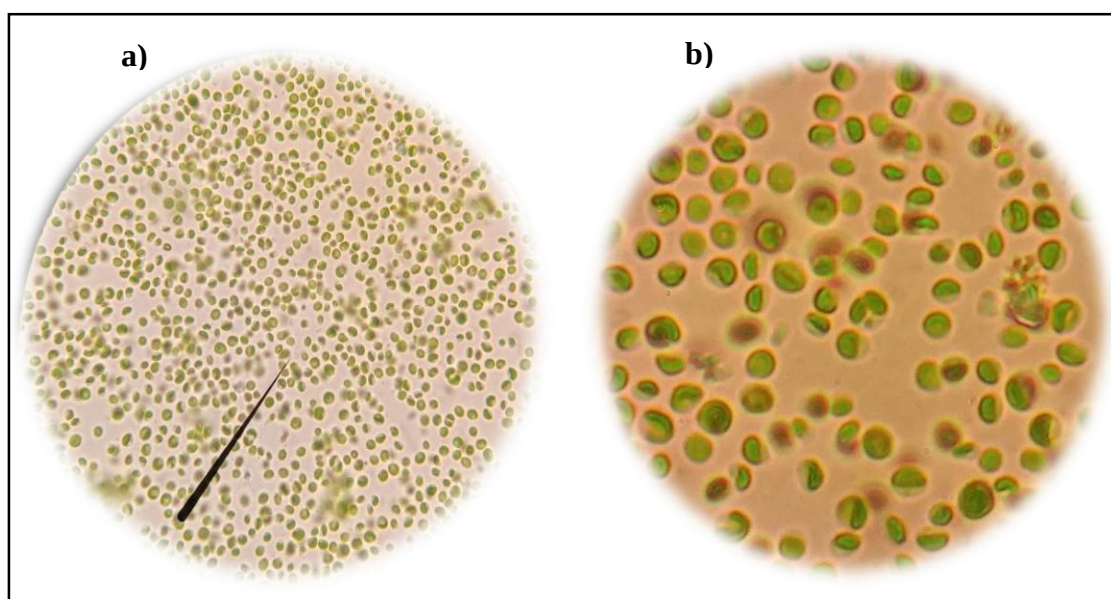
Los resultados se expresaron como media  $\pm$  DE, de los datos obtenidos de tres repeticiones por tratamiento y tres experimentos independientes. La distribución normal de los datos se analizó mediante la prueba de normalidad de D'Agostino-Pearson. Los porcentajes se transformaron con la función arcoseno para las pruebas paramétricas. Se utilizó el ANOVA de dos factores, seguido de la comparación de medias de Tukey y la prueba de ANOVA de una vía, seguida por Tukey. Los valores de IC<sub>50</sub> se informaron con intervalos de confianza del 95%. Los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.)



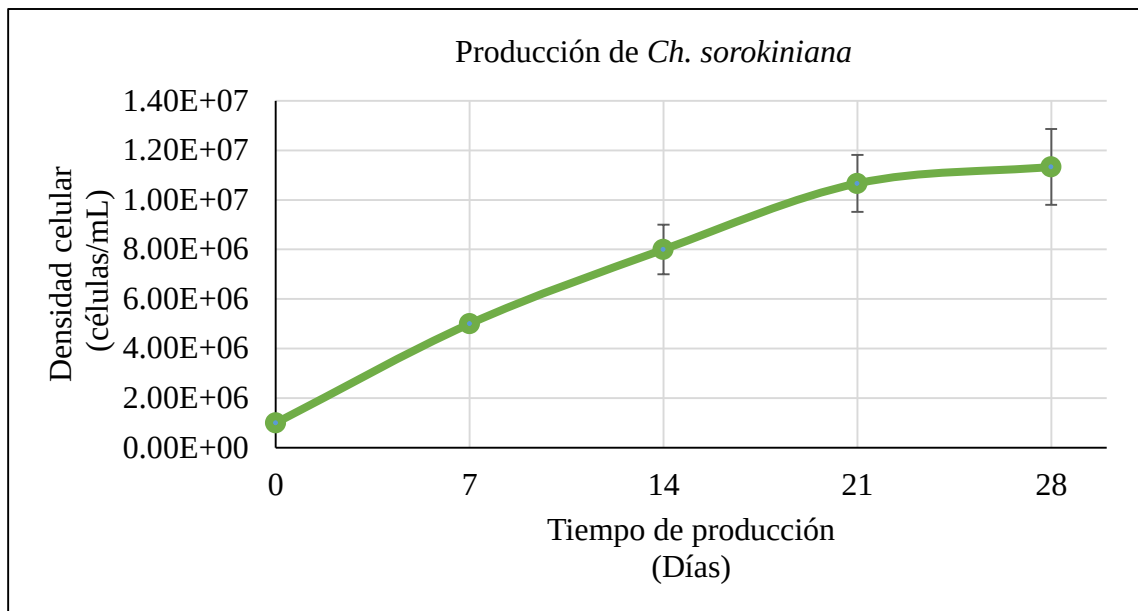
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Producción de *Chlorella sorokiniana*

Primeramente, se obtuvo el cultivo axénico de *Ch. sorokiniana* en solución LC (Figura 1). Para su crecimiento, se realizaron producciones con un volumen de 250 mL en medio LC. El cultivo tuvo una duración de 28 días en los cuales aumentó de  $1 \times 10^6$  hasta  $1.3 \times 10^7$  células/mL, se observó una fase exponencial hasta los 21 días, y posteriormente la fase estacionaria como puede observarse en la Figura 2.

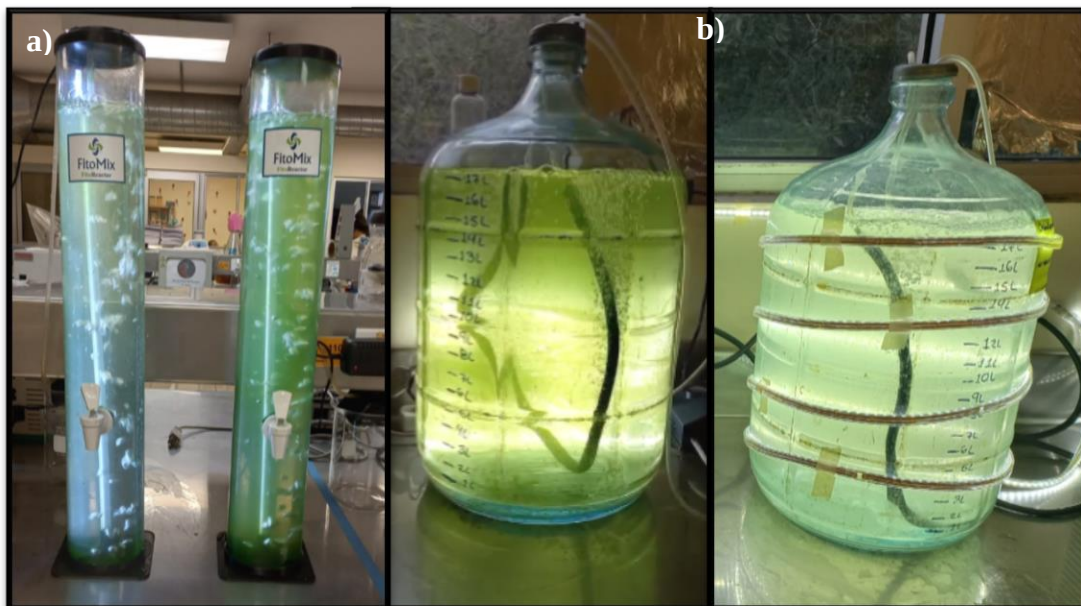


**Figura 1.** Cultivo axénico de *Ch. sorokiniana* en solución LC observada en microscopio a) *Ch. sorokiniana* a 40 X. b) *Ch. sorokiniana* a 100 X.

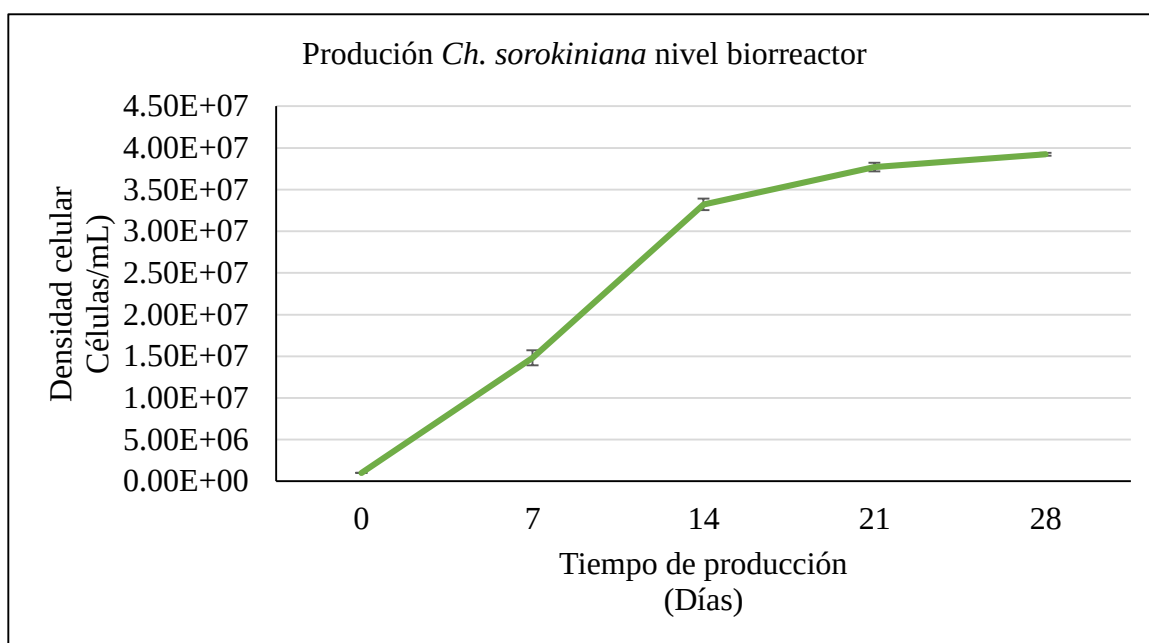


**Figura 2.** Curva de crecimiento de *Ch. sorokiniana* a temperatura ambiente y agitación constante.

Para la producción masiva de biomasa de *Ch. sorokiniana*, se realizó la producción a nivel biorreactor, en volúmenes de 5 L y 17 L durante 28 días (Figura 3), en los cuales aumentó de  $1 \times 10^6$  hasta  $3.9 \times 10^7$  células/mL. Se observó una fase exponencial hasta los 21 días y posteriormente, la fase estacionaria, como puede observarse en la Figura 4. Al término de la producción de microalgas a nivel biorreactor se obtuvo un rendimiento de 51 mg/L en peso seco de biomasa.



**Figura 3.** Producción de *Ch. sorokiniana* a nivel biorreactor en solución LC. a) Producción de biomasa en biorreactor de 5 L. b) Producción de biomasa en biorreactores de 17 L.



**Figura 4:** Curva de crecimiento de *Ch. sorokiniana* a nivel biorreactor a temperatura ambiente y agitación constante.

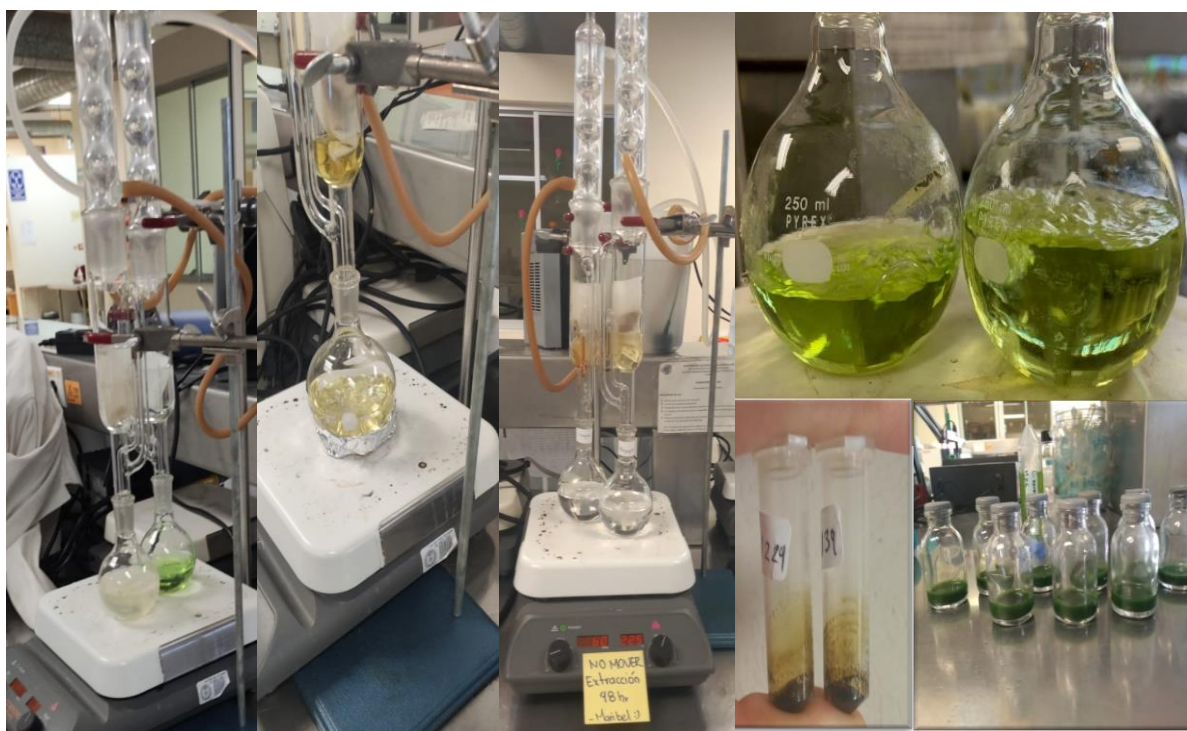
Una vez que obtuvimos la producción masiva de *Ch. sorokiniana*, se realizó la inoculación de los tratamientos a diferentes concentraciones de Nejayote semiindustrial (10, 25, 50, 75 y 100%). No se pudo realizar conteo en una cámara de Neubauer por la presencia de cúmulos celulares de microalga. Después de transcurrido 21 días de producción, se observó que *Ch. sorokiniana* puede crecer bajo condiciones de estrés, a las diferentes concentraciones de Nejayote (Figura 5).



**Figura 5.** Crecimiento de *Ch. sorokiniana* ( $2 \times 10^6$  cel/mL) a distintas concentraciones de nejayote (100, 75, 50, 25 y 10%) y solución LC como control. a) Tiempo cero. b) Tiempo 21 días.

## 7.2 Rendimiento de extractos metanólicos crudos

Los extractos metanólicos se produjeron por extracción Soxhlet por 48 h (Figura 6). Una vez obtenidos los extractos metanólicos crudos, se pesaron y se obtuvieron los porcentajes de rendimiento, el extracto de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230, mostró un mejor rendimiento de 73.08%, seguido por Nejayote 100% + *Ch. sorokiniana* y Nejayote 100%, con rendimientos del 36.76% y 32.6%, respectivamente (Tabla 3).



**Figura 6:** Obtención de extractos metanólicos por soxhlet continuo de *Ch. sorokiniana* producida a nivel semi reactor en solución LC y a diferentes concentraciones de nejayote.



**Tabla 3:** Rendimiento de extractos metanólicos crudos

| Extracto metanólico                    | Método de extracción | Peso (g) | Rendimiento (%) |
|----------------------------------------|----------------------|----------|-----------------|
| <i>Ch. sorokiniana</i>                 | Soxhlet              | 0.01422  | 0.711           |
| <i>Ch. sorokiniana</i> UTEX 1230       | Maceración           | 36.54    | 73.08           |
| 100% Nejayote + <i>Ch. sorokiniana</i> | Soxhlet              | 0.735    | 36.75           |
| 75% Nejayote + <i>Ch. sorokiniana</i>  | Soxhlet              | 0.276    | 13.8            |
| 50% Nejayote + <i>Ch. sorokiniana</i>  | Soxhlet              | 0.174    | 8.7             |
| 25% Nejayote + <i>Ch. sorokiniana</i>  | Soxhlet              | 0.225    | 11.25           |
| 10% Nejayote + <i>Ch. sorokiniana</i>  | Soxhlet              | 0.217    | 10.25           |
| Nejayote 100%                          | Soxhlet              | 0.652    | 32.6            |

### 7.3 Actividad antibacteriana

Se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos crudos con dos especies de bacterias, la especie *S. aureus* (Gram +) y *E. coli* (Gram -). La mayor concentración utilizada de los extractos metanólicos (500 µg/mL) no mostró una disminución del porcentaje de viabilidad en *S. aureus* y *E. coli* (Tabla 4).

**Tabla 4.** Porcentaje de viabilidad de *S. aureus* y *E. coli* tratados con el extracto metanólico de *Ch. sorokiniana* en presencia o ausencia de nejayote

| Tratamiento (500 µg/mL)                | Porcentaje de Viabilidad (%)                    |                                               |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|                                        | <i>S. aureus</i><br>1 × 10 <sup>6</sup> Células | <i>E. coli</i><br>1 × 10 <sup>6</sup> Células |
| <i>Ch. sorokiniana</i>                 | 100                                             | 100                                           |
| <i>Ch. sorokiniana</i> UTEX 1230       | 100                                             | 100                                           |
| 100% Nejayote + <i>Ch. sorokiniana</i> | 100                                             | 100                                           |
| 75% Nejayote + <i>Ch. sorokiniana</i>  | 100                                             | 100                                           |
| 50% Nejayote + <i>Ch. sorokiniana</i>  | 100                                             | 100                                           |
| 25% Nejayote + <i>Ch. sorokiniana</i>  | 100                                             | 100                                           |
| 10% Nejayote + <i>Ch. sorokiniana</i>  | 100                                             | 100                                           |
| Nejayote 100%                          | 100                                             | 100                                           |
| Control                                | 34.93                                           | 14.27                                         |
| Hipoclorito de sodio (5%)              |                                                 |                                               |

Los datos son la media ± SD de ensayos con tres repeticiones.

#### 7.4 Actividad antifúngica

Para evaluación de la actividad antifúngica, se evaluaron los extractos metanólicos crudos con hongos patógenos dermatofitos, los hongos utilizados fueron *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton rubrum* y *T. mentagrophytes*. En este ensayo, se evaluaron diferentes concentraciones de los extractos, y como resultado, no se mostró una disminución del porcentaje de viabilidad de los hongos dermatofitos utilizando la mayor concentración del extracto, la cual fue de 500 µg/mL, comparado con el control, que disminuyó el porcentaje

de viabilidad a 0% en el caso de *M. gypseum*, 2.308% en *T. rubrum*, 2.07% en *T. mentagrophytes*, y 1.348% en *M. canis* como se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Porcentaje de viabilidad de *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Trichophytom rubrum* y *T. mentagrophytes* tratados con el extracto metanólico de *Ch. sorokiniana* en presencia o ausencia de nejayote

| <b>Tratamiento</b><br><b>(500 µg/mL)</b>         | <b>Porcentaje de viabilidad (%)</b> |                   |                  |                          |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|------------------|--------------------------|
|                                                  | <i>M. canis</i>                     | <i>M. gypseum</i> | <i>T. rubrum</i> | <i>T. mentagrophytes</i> |
| <i>Ch. sorokiniana</i>                           | 100                                 | 100               | 100              | 100                      |
| <i>Ch. sorokiniana</i> UTEX<br>1230              | 100                                 | 100               | 100              | 100                      |
| 100% Nejayote + <i>Ch.</i><br><i>sorokiniana</i> | 100                                 | 100               | 100              | 100                      |
| 75% Nejayote + <i>Ch.</i><br><i>sorokiniana</i>  | 100                                 | 100               | 100              | 100                      |
| 50% Nejayote + <i>Ch.</i><br><i>sorokiniana</i>  | 100                                 | 100               | 100              | 100                      |
| 25% Nejayote + <i>Ch.</i><br><i>sorokiniana</i>  | 100                                 | 100               | 100              | 100                      |
| 10% Nejayote + <i>Ch.</i><br><i>sorokiniana</i>  | 100                                 | 100               | 100              | 100                      |
| Control<br>Itraconazol (4 µg/mL)                 | 1.348                               | 0                 | 2.308            | 2.07                     |



---

## 7.5 Inhibición del crecimiento de células tumorales y normales

La evaluación de la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) en las diferentes líneas celulares cancerígenas, se realizó mediante MTT. La mayor actividad contra L5178Y-R fue del extracto de *Ch. sorokiniana* con una  $IC_{50}$  de  $36.18 \mu\text{g/mL} \pm 0.64 \mu\text{g/mL}$ , comparada con la de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 de  $209.9 \mu\text{g/mL} \pm 1.14 \mu\text{g/mL}$ , en el caso de los extractos producidos en Nejayote, no se mostró actividad para esta línea celular. En la línea celular MCF7, *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 mostró un mejor índice de citotoxicidad de  $43.25 \mu\text{g/mL} \pm 1.01 \mu\text{g/mL}$ , seguida por *Ch. sorokiniana* 100%, Nejayote con  $92.38 \mu\text{g/mL} \pm 0.98 \mu\text{g/mL}$  y  $408.5 \mu\text{g/mL} \pm 0.87 \mu\text{g/mL}$  de *Ch. sorokiniana*. Por otro lado, los extractos utilizados, no tuvieron actividad citotóxica contra la línea celular 4T1 (Tabla 6).

**Tabla 6.** Concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) con el extracto metanólico de *Ch. sorokiniana* y *Ch. sorokiniana* en presencia o ausencia de nejayote contra las líneas celulares L5178Y-R, MCF7 y 4T1 a las 48 h

| Extracto metanólico                    | L5178Y-R                   | MCF7                       | 4T1                        |
|----------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                                        | IC <sub>50</sub> (µg/mL) * | IC <sub>50</sub> (µg/mL) * | IC <sub>50</sub> (µg/mL) * |
| <i>Ch. sorokiniana</i>                 | 36.18 ± 0.64               | 408.5 ± 0.87               | > 500                      |
| <i>Ch. sorokiniana</i> UTEX 1230       | 209.9 ± 1.14               | 43.25 ± 1.01               | > 500                      |
| 100% Nejayote + <i>Ch. sorokiniana</i> | > 500                      | 92.38 ± 0.98               | > 500                      |
| 75% Nejayote + <i>Ch. sorokiniana</i>  | > 500                      | 437.9                      | > 500                      |
| 50% Nejayote + <i>Ch. sorokiniana</i>  | > 500                      | >500                       | > 500                      |
| 25% Nejayote + <i>Ch. sorokiniana</i>  | > 500                      | > 500                      | > 500                      |
| 10% Nejayote + <i>Ch. sorokiniana</i>  | > 500                      | > 500                      | > 500                      |
| Nejayote 100%                          | > 500                      | 411.6 ± 1.4                | > 500                      |

\*Índice de citotoxicidad media (IC<sub>50</sub>)

Los datos son la media ± SD de ensayos con tres repeticiones

Para la siguiente etapa, se seleccionaron los extractos que mostraron alguna actividad contra las líneas celulares cancerígenas utilizadas y se evaluaron en CMSP para determinar el IS (Tabla 7). Se observó que el extracto de *Ch. sorokiniana* tuvo una mayor actividad en la línea celular L5178YR con una IC<sub>50</sub> de 92.28 µg/mL ± 1.6 µg/mL y un IS de 5.69, mientras que en la línea celular MCF7, la mejor actividad se mostró en el extracto *Ch. sorokiniana* UTEX 1230, con un IC<sub>50</sub> de 43.25 µg/mL ± 1.01 µg/mL y un IS de 17.72 al compararlo con células normales.

**Tabla 7.** IC<sub>50</sub> (µg/mL) e IS de la línea L5178Y-R, MCF7 y CMSP al evaluar los diferentes extractos metanólicos de *Ch. sorokiniana* y nejayote

| <b>Extracto<br/>Metanólico</b>            | <b>L5178YR</b>              |      | <b>MCF7</b>                 |         | <b>CMSP</b>                 |
|-------------------------------------------|-----------------------------|------|-----------------------------|---------|-----------------------------|
|                                           | IC <sub>50</sub><br>(µg/mL) | IS*  | IC <sub>50</sub><br>(µg/mL) | IS*     | IC <sub>50</sub><br>(µg/mL) |
| <i>Ch. sorokiniana</i>                    | 92.28 ± 1.6                 | 5.69 | 408.5 ± 0.87                | 1.285   | 525.1 ± 1.334               |
| <i>Ch. sorokiniana</i><br>UTEX 1230       | 209.9 ± 1.14                | 3.65 | 43.25 ± 1.01                | 17.72   | 766.4 ± 1.294               |
| <i>Ch. sorokiniana</i> +<br>Nejayote 100% | N/A                         | N/A  | 92.38 ± 0.98                | <0.85   | < 7.8125                    |
| Nejayote 100%                             | N/A                         | N/A  | 411.6±1.4                   | < 0.019 | < 7.8125                    |

\*IS = IC<sub>50</sub> de CMSP/IC<sub>50</sub> de la línea celular (L5178Y-R o MCF7).

## 7.6 Actividad antioxidante

Para la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos crudos, se realizó utilizando la prueba DPPH. Se utilizaron distintas concentraciones de los extractos, para obtener la IC<sub>50</sub> de cada uno de ellos, como resultado obtuvimos que el extracto crudo de *Ch. sorokiniana* obtuvo una IC<sub>50</sub> de 4.852±0.678, *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 de 11.96±1.528 y *Ch. sorokiniana* al 100% de Nejayote de 7.222±0.671, mostrando una alta actividad antioxidante, al igual que el ácido ascórbico, utilizado como control (Tabla 8).

**Tabla 8.** Actividad antioxidante del extracto metanólico crudo de *Ch. sorokiniana*, *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 y *Ch. sorokiniana* 100% Nejayote mediante el método de eliminación de radicales DPPH.

| Extracto crudo                          | DPPH<br>IC <sub>50</sub> | Actividad* |
|-----------------------------------------|--------------------------|------------|
| <i>Ch. sorokiniana</i>                  | 4.852 ± 0.678            | Alto       |
| <i>Ch. sorokiniana</i><br>UTEX 1230     | 11.96 ± 1.528            | Alto       |
| <i>Ch. sorokiniana</i><br>Nejayote 100% | 7.222 ± 0.671            | Alto       |
| Ácido ascórbico                         | 7.21 ± 1.074             | Alto       |

\* Débil = IC<sub>50</sub> > 1000 µg/mL; moderado = IC<sub>50</sub> 200 a 1000 µg/mL; y alto = IC<sub>50</sub> < 200 µg/mL.

Los datos son las medias ± SD de la IC<sub>50</sub> en µg/mL para cada extracto evaluado.

## 7.7 Actividad Hemolítica

Una vez realizados los ensayos de inhibición del crecimiento en células tumorales y de actividad antioxidante de los extractos, se procedió a la determinación de las propiedades hemolíticas de los extractos crudos. En este ensayo, los resultados mostraron que el extracto crudo de *Ch. sorokiniana* y *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 no mostraron actividad hemolítica a concentraciones menores de 500 µg/mL en eritrocitos humanos (Tabla 9).

**Tabla 9.** Actividad hemolítica contra eritrocitos humanos por el extracto crudo de *Ch. sorokiniana* y *Ch. sorokiniana* UTEX 1230

| Extracto crudo                      | Actividad Hemolítica |
|-------------------------------------|----------------------|
|                                     | IC <sub>50</sub>     |
| <i>Ch. sorokiniana</i>              | >500                 |
| <i>Ch. sorokiniana</i><br>UTEX 1230 | >500                 |

## 7.8 Caracterización de extractos con mayor actividad

Se seleccionaron para caracterización el extracto crudo de *Ch. sorokiniana* y *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 por presentar mejor IC<sub>50</sub> en inhibición de crecimiento con un IS <10, mayor actividad antioxidante y que no causaran hemólisis en eritrocitos humanos.

### 7.8.1 Pruebas de solubilidad

Al realizar las pruebas de solubilidad de los extractos se observaron características muy parecidas, fueron solubles en todos los solventes utilizados, por lo que se seleccionaron estos solventes, iniciando con hexano para el fraccionamiento de los extractos por cromatografía en columna (Tabla 10).

**Tabla 10.** Resultados de pruebas de solubilidad para los extractos metanólicos de *Ch. sorokiniana* y *Ch. sorokiniana* UTEX 1230

| Solvente         | <i>Ch. sorokiniana</i> |               | <i>Ch. sorokiniana</i> UTEX 1230 |               |
|------------------|------------------------|---------------|----------------------------------|---------------|
|                  | Solubilidad            | Observaciones | Solubilidad                      | Observaciones |
| Hexano           | Si                     | Ninguna       | Si                               | Ninguna       |
| Cloroformo       | Si                     | Muy soluble   | Si                               | Muy soluble   |
| Acetato de etilo | Si                     | Ninguna       | Si                               | Ninguna       |
| Metanol          | Si                     | Ninguna       | Si                               | Ninguna       |

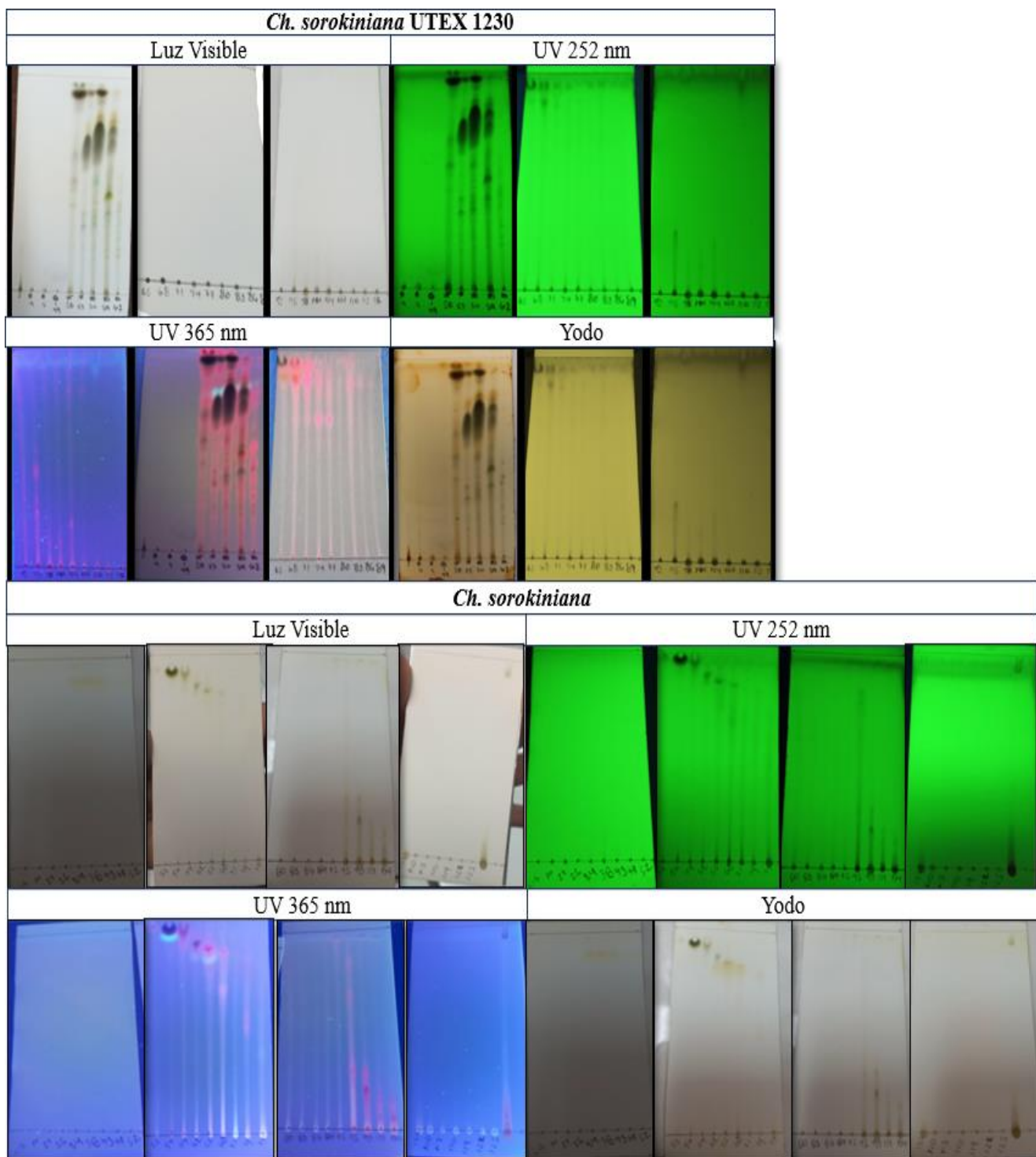
### 7.8.2 Fraccionamiento por cromatografía en columna

Se procesó un gramo de cada muestra realizando dos cromatografías en columna por extracto. De este fraccionamiento se obtuvieron 120 y 125 fracciones por columna y se realizó CCF de 27 y 34 fracciones utilizando diferentes eluentes. Las fracciones se seleccionaron de acuerdo con la distribución de los metabolitos observados en las cromatoplasmas, estos se juntaron para obtener un total de 6 y 7 fracciones colectivas para *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 y *Ch. sorokiniana*, respectivamente. Se determinó el rendimiento (%) de cada FC y se realizaron las CCF para poder registrar los valores de Rf y observar los metabolitos presentes en luz visible, UV 254 y 365 nm, así como en yodo (Tabla 11 y Figura 7). Para las fracciones de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230, se obtuvieron rendimientos de 0.6 % a 47.8%, mientras que de las fracciones de *Ch. sorokiniana* fueron de 0.8% a 23.2% (Tabla 11).

**Tabla 11:** Porcentaje de rendimiento y *Rf* calculado de fracciones colectivas de extractos de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 y *Ch. sorokiniana*.

| Fracciones colectivas                   | Rendimiento (%) | Luz visible <i>Rf</i>                                                          | UV 254 nm <i>Rf</i>                                                            | UV 365 nm <i>Rf</i>                                                            | Yodo <i>Rf</i>                                                                 |
|-----------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>Ch. sorokiniana</i> UTEX 1230</b> |                 |                                                                                |                                                                                |                                                                                |                                                                                |
| FC1 (1-5)                               | 47.8            | -                                                                              | -                                                                              | -                                                                              | -                                                                              |
| FC2 (6-49)                              | 0.6             | -                                                                              | -                                                                              | -                                                                              | -                                                                              |
| FC3 (50-63)                             | 9.2             | 0.4, 0.4706, 0.5059, 0.5112, 0.916, 0.964, 0.2941, 0.3647, 0.8, 0.8941, 0.9294 | 0.4, 0.4706, 0.5059, 0.5112, 0.916, 0.964, 0.2941, 0.3647, 0.8, 0.8941, 0.9294 | 0.4, 0.4706, 0.5059, 0.5112, 0.916, 0.964, 0.2941, 0.3647, 0.8, 0.8941, 0.9294 | 0.4, 0.4706, 0.5059, 0.5112, 0.916, 0.964, 0.2941, 0.3647, 0.8, 0.8941, 0.9294 |
| FC4 (64-92)                             | 4.6             | -                                                                              | 0.9294                                                                         | 0.9294, 0.8941, 0.6824                                                         | 0.9294                                                                         |
| FC5 (93-107)                            | 25.4            | -                                                                              | 0.3294                                                                         | 0.2353, 0.2941, 0.4706                                                         | 0.3294                                                                         |
| FC6 (108-120)                           | 5.2             | -                                                                              | -                                                                              | -                                                                              | -                                                                              |
| <b><i>Ch. sorokiniana</i></b>           |                 |                                                                                |                                                                                |                                                                                |                                                                                |
| FC1 (1-33)                              | 0.8             | -                                                                              | -                                                                              | -                                                                              | 0.8824, 0.9412                                                                 |
| FC2 (34-52)                             | 0.2             | -                                                                              | -                                                                              | -                                                                              | 0.8824, 0.9412                                                                 |
| FC3 (53-60)                             | 12.4            | 0.9411, 0.929                                                                  | 0.9411, 0.9294                                                                 | 0.9411, 0.9294                                                                 | 0.9411, 0.9294                                                                 |
| FC4 (61-76)                             | 15.4            | 0.9176, 0.8235, 0.8118, 0.8                                                    | 0.9176, 0.8235, 0.8118, 0.8                                                    | 0.9176, 0.8235, 0.8118, 0.8, 0.6471                                            | 0.9176, 0.8235, 0.8118, 0.8, 0.6471                                            |
| FC5 (77-86)                             | 1.2             | -                                                                              | 0.7765, 0.8471, 0.9294                                                         | -                                                                              | -                                                                              |
| FC6 (87-107)                            | 23.2            | 0.1765, 0.2706, 0.8236, 0.9294                                                 | 0.1765, 0.2706, 0.8236, 0.9294                                                 | 0.1765, 0.2706, 0.8236, 0.9294                                                 | 0.1765, 0.2706, 0.8236, 0.9294                                                 |
| FC7 (108-125)                           | 7.6             | -                                                                              | -                                                                              | -                                                                              | -                                                                              |





**Figura 7:** CCF de las fracciones de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 y *Ch. sorokiniana*. Los cromatogramas se revelaron con luz visible, UV 254 nm, UV 365 nm y yodo.

### 7.8.3 Inhibición de crecimiento celular por las FC de *Ch. sorokiniana* y *Ch. sorokiniana* UTEX 1230.

Se evaluó la inhibición de crecimiento de las FC de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 y *Ch. sorokiniana* en células tumorales y normales. En el caso de la cepa UTEX 1230, se obtuvieron seis fracciones colectivas, las cuales se evaluaron contra la línea celular L5178Y-R y la fracción con la mayor concentración inhibitoria fue la FC3, con una IC<sub>50</sub> de 3.22 µg/mL ± 1.69 µg/mL, y FC4, con una IC<sub>50</sub> de 76.69 µg/mL ± 1.63 µg/mL. Sus respectivas IS fueron 5.12 y 4.55 (Tabla 12). El control 0.05 µg/mL VC causó 77.4% de citotoxicidad contra células L5178Y-R, sin afectar significativamente a CMSP con una concentración de 14.7%. Las FC también fueron evaluadas contra la línea celular MCF7. Las FC que mostraron mayor concentración inhibitoria fueron FC3, con una IC<sub>50</sub> de 126.4 µg/mL ± 1.12 µg/mL, FC4, con 76.8 µg/mL ± 1.09 µg/mL, y FC5, con 100.9 µg/mL ± 1.16 µg/mL, y con IS de 3.1, 4.54 y 2.1, respectivamente (Tabla 12).

**Tabla 12:** IC<sub>50</sub> (µg/mL) de las FC de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 contra células CMSP, L5178Y-R y MCF7 después de 48 h de exposición.

| Fracción colectiva | CMSP<br>IC <sub>50</sub> (µg/mL) | L5178Y-R<br>IC <sub>50</sub> (µg/mL) | IS <sup>a</sup> | MCF7<br>IC <sub>50</sub> (µg/mL) | IS <sup>a</sup> |
|--------------------|----------------------------------|--------------------------------------|-----------------|----------------------------------|-----------------|
| FC1                | 14,053 ± 0.1233                  | 413.8 ± 1.69                         | 33.96           | > 500                            | > 28.1          |
| FC2                | N/A                              | N/A                                  | N/A             | N/A                              | N/A             |
| FC3                | 392.8 ± 0.1598                   | 93.22 ± 1.69                         | 5.12            | 126.4 ± 1.12                     | 3.1             |
| FC4                | 349.1 ± 0.8389                   | 76.69 ± 1.63                         | 4.55            | 76.8 ± 1.09                      | 4.54            |
| FC5                | 211.9 ± 1.5967                   | 127.1 ± 1.51                         | 1.67            | 100.9 ± 1.16                     | 2.1             |
| FC6                | 0                                | 486.2 ± 2.29                         | ---             | 298.3 ± 1.18                     | ---             |

<sup>a</sup> Los valores de IS representan la IC<sub>50</sub> de las CMSP/IC<sub>50</sub> de las células L5178Y y MCF7, respectivamente.

Del fraccionamiento del extracto de *Ch. sorokiniana*, se obtuvieron 7 fracciones colectivas, las cuales se evaluaron con las líneas celulares anteriormente mencionadas. La FC con mayor concentración inhibitoria contra L5178Y-R fue la FC4, con una IC<sub>50</sub> de 53.87 µg/mL ± 1.296 µg/mL, seguida por la FC6 con una IC<sub>50</sub> de 98.62 µg/mL ± 1.436 µg/mL. Al evaluarlas contra la línea celular MCF7 las FC que mostraron mayor actividad fue la FC6 con una IC<sub>50</sub> de 271.1 µg/mL ± 1.396 µg/mL, seguido por la FC5 con una IC<sub>50</sub> de 287.3 µg/mL ± 1.5 µg/mL. Sin embargo, todas las FC mostraron un IS < 1, por lo que se descartaron para los ensayos de actividad antioxidante y hemólisis (Tabla 13).

**Tabla 13:** IC<sub>50</sub> (µg/ mL) de las FC de *Ch. sorokiniana* contra células CMSP, L5178Y-R y MCF7 después de 48 h de exposición.

| <b>Fracción colectiva</b> | <b>CMSP<br/>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b> | <b>L5178Y-R<br/>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b> | <b>IS <sup>a</sup></b> | <b>MCF7<br/>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b> | <b>IS <sup>a</sup></b> |
|---------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| <b>FC1</b>                | 269.6 ± 1.198                           | > 500                                       | > 0.539                | > 500                                   | >0.539                 |
| <b>FC2</b>                | N/A                                     | N/A                                         | N/A                    | N/A                                     | N/A                    |
| <b>FC3</b>                | 17.3 ± 1.682                            | 136.6 ± 1.362                               | 0.127                  | > 500                                   | >0.034                 |
| <b>FC4</b>                | < 7.8125                                | 53.87 ± 1.296                               | < 0.208                | 345.8 ± 1.137                           | > 0.022                |
| <b>FC5</b>                | 184.7 ± 1.196                           | 285.9 ± 1.343                               | 0.646                  | 287.3 ± 1.5                             | 0.642                  |
| <b>FC6</b>                | 66.64 ± 1.381                           | 98.62 ± 1.436                               | 0.675                  | 271.1 ± 1.396                           | 0.245                  |
| <b>FC7</b>                | 815.8 ± 1.622                           | > 500                                       | > 1.631                | > 500                                   | > 1.631                |

<sup>a</sup> Los valores de IS representan la IC<sub>50</sub> de las CMSP/IC<sub>50</sub> de las células L5178Y y MCF7, respectivamente.

Se evaluó la actividad antioxidante de las FC de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230, las FC evaluadas mostraron una mayor actividad antioxidante en comparación con el control positivo (ácido ascórbico), donde FC3 y FC4 demostraron la mayor actividad IC<sub>50</sub>, con valores de 3.52 µg/mL ± 1.257 µg/mL y 4.452 µg/mL ± 0.592 µg/mL, respectivamente (Tabla 14).

**Tabla 14:** Actividad antioxidante de las FC de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230.

| Fracción colectiva         | DPPH (IC <sub>50</sub> ) | Actividad <sup>a</sup> |
|----------------------------|--------------------------|------------------------|
| FC1                        | 4.852 ± 0.678            | Alto                   |
| FC3                        | 3.52 ± 1.257             | Alto                   |
| FC4                        | 4.452 ± 0.592            | Alto                   |
| FC5                        | 7.222 ± 0.671            | Alto                   |
| FC6                        | 5.835 ± 1.036            | Alto                   |
| Ácido ascórbico (50 µg/mL) | 7.21 ± 1.074             | Alto                   |

<sup>a</sup> Débil = IC<sub>50</sub> > 1000 µg/mL; moderada = IC<sub>50</sub> que oscila entre 200 y 1,000 µg/mL; y alta = IC<sub>50</sub> < 200 µg/mL. Los datos representan las medias ± SD de la IC<sub>50</sub> (µg/mL) para cada FC evaluado.

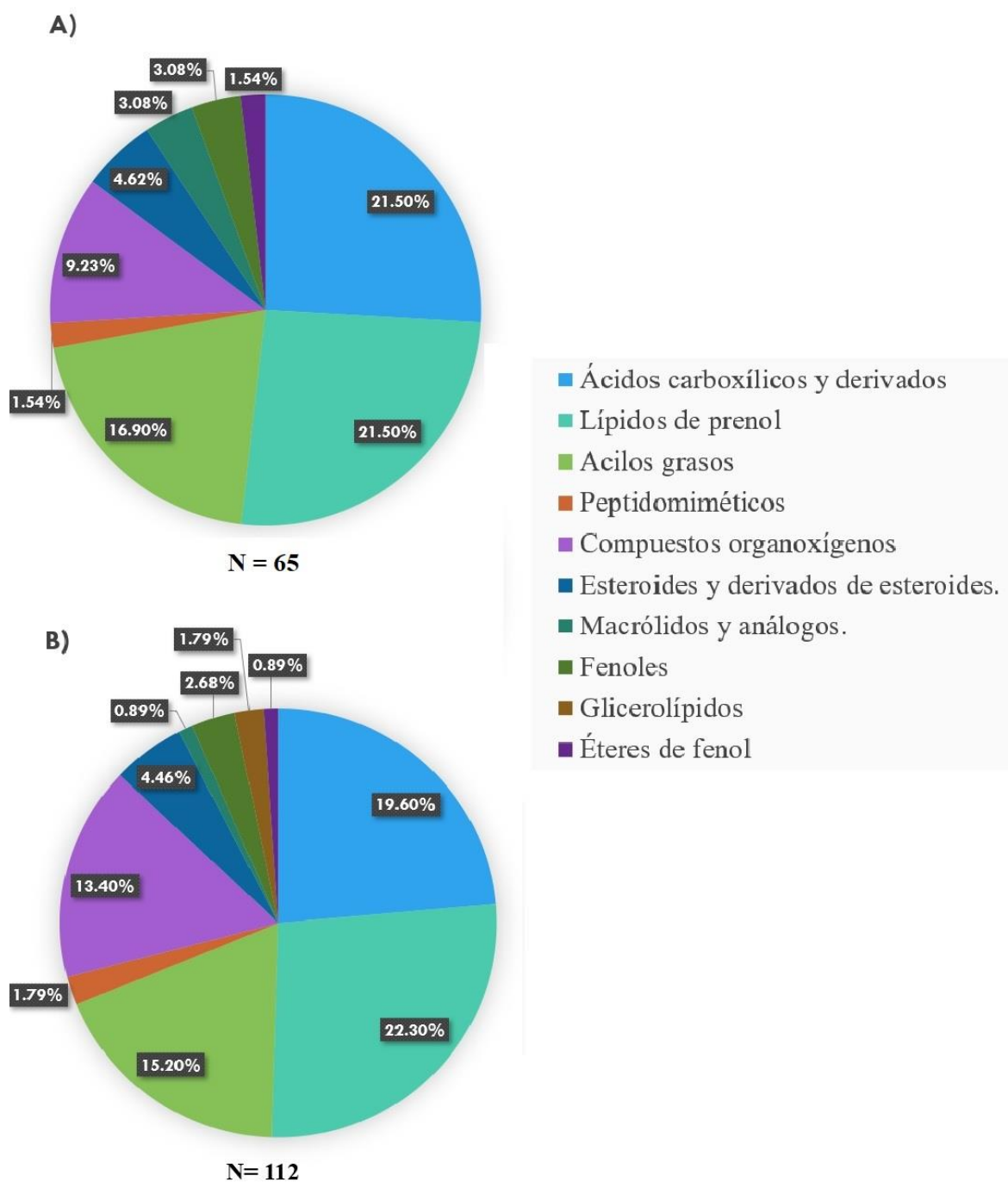
Se evaluaron las actividades hemolíticas de las FC de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 y *Ch. sorokiniana*, luego de sus ensayos antitumorales y antioxidantes. Los resultados mostraron que la fracción con mayor actividad hemolítica de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230, fue la FC4, con una IC<sub>50</sub> de 290.4 µg/mL ± 1.248 µg/mL, mientras que la FC5 y la FC3 tuvieron actividades hemolíticas de CI<sub>50</sub> = 336.5 µg/mL ± 1.963 µg/mL y 790.8 µg/mL ± 1.33 µg/mL, respectivamente, en comparación con todos los demás tratamientos (Tabla 15).

**Tabla 15:** Actividad hemolítica contra eritrocitos humanos por las FCs de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230

| Fracción colectiva | Actividad hemolítica<br>(IC <sub>50</sub> ) |
|--------------------|---------------------------------------------|
| FC1                | >1000                                       |
| FC3                | >1000                                       |
| FC4                | 790.8 ± 1.33                                |
| FC5                | 290.4 ± 1.248                               |
| FC6                | 336.5 ± 1.963                               |

#### 7.8.4 Identificación de compuestos mediante LC-MS<sup>2</sup>

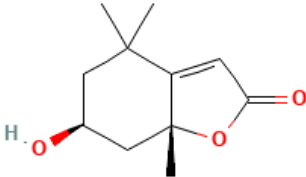
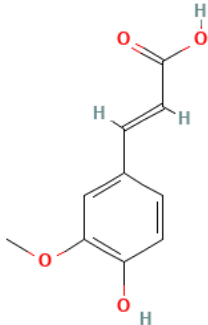
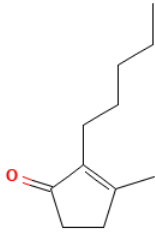
Para caracterizar mediante LC-MS<sup>2</sup>, se seleccionaron las fracciones que mostraron la mayor actividad antitumoral, antioxidante, IS y sin inducir hemólisis (FC3 y FC4). En la FC3 se detectaron un total de 65 picos en MS2 de los cuales 10 se clasificaron utilizando la herramienta ClassyFire de acuerdo con sus categorías químicas. Por otro lado, en la FC4 se detectaron un total de 112 picos de los cuales se clasificaron 24 (Figura 8). Se encontró que para la FC3 los lípidos de prenol y los ácidos carboxílicos y derivados, fueron la clase química mayoritaria con un 21.5%, mientras que en la FC4 la mayor clase química fue los lípidos de prenol con 22.3%. En cuanto a diversidad química la FC3 obtuvo un total de 9, mientras que la FC4 de 10.



**Figura 8:** Clases químicas asignadas a los metabolitos identificados en las muestras. La gráfica de pastel muestra el porcentaje de las clases químicas a las que pertenecen los picos encontrados en LC-MS<sup>2</sup>. A) FC3 de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230. B) FC4 de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230.

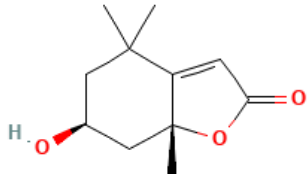
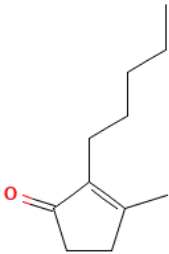
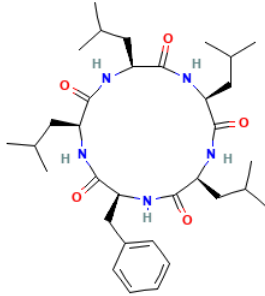
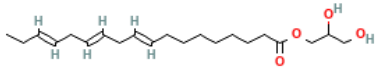
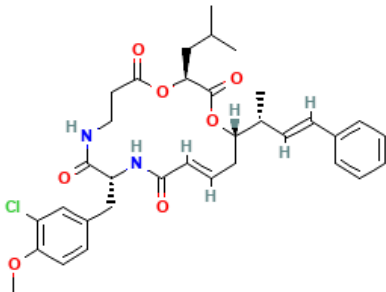
Se realizó una búsqueda en la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> revisado el 22 de junio de 2024) para la determinación de la actividad biológica de los compuestos encontrados. Identificamos como compuestos mayoritarios loliolida, ácido cinámico, metil dihidrojasmonato y criptoficina 29, que previamente se habían reportado como anticancerígenos, antibacterianos o antioxidantes (Tabla 16).

**Tabla 16:** Metabolitos caracterizados de la FC3 de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230, con actividad biológica.

| Nombre del compuesto       | Masa Teórica | Clase química                 | Actividad biológica*                     | Estructura Putativa                                                                   |
|----------------------------|--------------|-------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Loliolida                  | 197.117      | Benzofuranos                  | Anticáncer, antibacteriana, antioxidante |   |
| Ácido cinámico             | 149.059      | Ácidos cinámicos y derivados. | Anticáncer, antioxidante                 |  |
| Dihidrojasmonato de metilo | 227.164      | Acilos grasos                 | Anticáncer                               |  |

\* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> revisado 22 de febrero de 2025

**Tabla 17:** Metabolitos caracterizados de la FC4 de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230, con actividad biológica.

| Nombre del compuesto       | Masa Teórica | Clase química                    | Actividad biológica*                     | Estructura Putativa                                                                   |
|----------------------------|--------------|----------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Loliolida                  | 197.117      | Benzofuranos                     | Anticáncer, antibacteriana, antioxidante |    |
| Dihidrojasmonato de metilo | 227.164      | Acilos grasos                    | Anticáncer                               |   |
| Sansalvamida A             | 600.411      | Ácidos carboxílicos y derivados. | Anticáncer                               |  |
| 1-monolinolenina           | 353.268      | Acilos grasos                    | Anticáncer                               |  |
| Criptoficina 29            | 625.267      | Peptidomiméticos                 | Antitumoral                              |  |

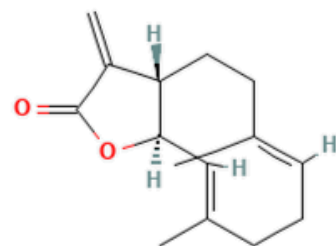


Costunólido

233.153

Lípidos prenoles

Anticáncer

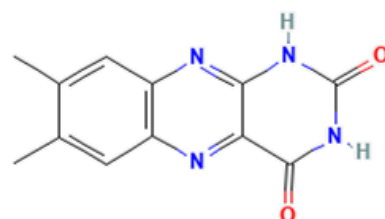


Lumicromo de  
riboflavina

243.087

Pteridinas y  
derivados

Anticáncer

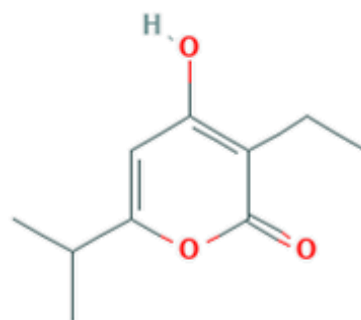


Germicidina B

183.101

Piranos

Anticáncer,  
antibacteriana



---

\* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> revisado 22 de febrero de 2024

## 8 DISCUSIÓN

Las microalgas del género *Chlorella* son cosmopolitas, lo cual les permite adaptarse o tener la capacidad de utilizar como sustrato nutricional compuestos orgánicos e inorgánicos para su crecimiento. *Ch. sorokiniana* es la especie de microalgas con un mayor potencial biotecnológico, ya que se ha sido empleada para la producción de suplementos nutricionales, fármacos, la producción de biodiesel y desde algunos años, ha ganado importancia en el tratamiento de aguas residuales (Ortiz-Moreno et al. 2012; López 2015; Melo et al. 2022). Numerosos estudios han demostrado que posee grandes beneficios para la salud, incluida su actividad antioxidante, antiinflamatorio y potencial antiproliferativo contra algunos tipos de cáncer (Wang et al. 2010; Lin et al. 2017; Adzahar et al. 2021).

En la producción industrial de biomasa de *Ch. sorokiniana* se requiere utilizar un medio de cultivo que ofrezca los nutrientes necesarios para el adecuado crecimiento de la microalga y que sea de bajo costo, además de que potencialice la producción de mayor cantidad de metabolitos con actividades antioxidantes y anticancerígenos, por lo tanto, en el presente estudio nos proponemos evaluar la capacidad biológica de los compuestos bioactivos de *Ch. sorokiniana* producida en el agua residual resultante del proceso de la nixtamalización (Nejayote) y en un medio de crecimiento óptimo de microalgas (solución LC), y evaluar su actividad contra distintas líneas de cáncer, actividad antioxidante y su actividad biocida contra bacterias y hongos (López-Pacheco et al. 2019; Lopez-Chuken 2010).

Se obtuvo un cultivo axénico de *Ch. sorokiniana*, mostrando un crecimiento exponencial durante 28 días en los cuales aumentó de  $1 \times 10^6$  células/mL hasta  $1.3 \times 10^7$  células/mL, mientras que a nivel biorreactor, hubo un crecimiento exponencial de hasta  $3.9 \times 10^7$  células/mL. Según Ortiz-Moreno et al. (2012) en medios especiales y en condiciones autotróficas y mixotróficas, las densidades de esta especie de microalgas van desde los  $1 \times 10^6$  células/mL hasta los  $1 \times 10^8$  células/mL en 14 días.

Al utilizar como medio de crecimiento para *Ch. sorokiniana* diferentes concentraciones de Nejayote (100%, 75%, 50%, 25% y 10%) se observó que *Ch. sorokiniana* tiene la capacidad de crecer bajo condiciones de estrés, siendo las concentraciones de 25% y 10% en las cuales se vio un crecimiento similar de biomasa comparada con el control en solución

LC, esto concuerda con el estudio de López-Pacheco et al. (2019), en el cual utilizaban el Nejayote como medio de crecimiento para *Ch. vulgaris* y ellos observaron que las cantidades de biomasa obtenidas eran similares a las que se obtenían en los medios comerciales para microalgas.

Se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos crudos con dos géneros de bacterias, el género *S. aureus* (Gram +) y *E. coli* (Gram -). No se observó disminución del porcentaje de viabilidad en las bacterias evaluadas en concentraciones de 500 µg/mL de extracto, lo cual concuerda con un estudio realizado por Shaima et al. (2022), donde al evaluar un extracto metanólico de *Ch. sorokiniana* contra diferentes bacterias incluidas *S. aureus* y *E. coli*, no disminuyó la viabilidad celular. Además, los extractos también fueron evaluados contra los hongos dermatofitos *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton rubrum* y *T. mentagrophytes*, pero no mostró actividad antifúngica contra ellos, aun no existen reportes en los cuales se habló de la actividad de *Chorella* contra hongos dermatofitos, pero en un estudio realizado por Perveen et al. (2022) se demostró que el extracto metanólico de *Ch. vulgaris* (5 mg/Kg) es eficaz contra los hongos *F. oxysporum* (66.7%), *Fusarium* sp. (60.0%), *A. flavus* (53.3%) y *A. niger* (54.3%).

Los componentes bioactivos aislados de microalgas han sido estudiados contra el asma, la diabetes, las infecciones virales, la inflamación y el cáncer (Oyeronke et al. 2023; Senhorinho et al. 2024). El cáncer representa una enfermedad distribuida globalmente, cuyo diagnóstico temprano es fundamental para identificar un tratamiento para su control o eliminación (Sung et al. 2021). El tratamiento de elección del cáncer se basa en fármacos químicos, radioterapia o extirpación del tumor mediante cirugía. Sin embargo; varios reportes revelan la presencia de otros tipos de cáncer que desarrollan resistencia, metástasis o en algunos casos, el cáncer podría resurgir (Senapati et al. 2018). La búsqueda de nuevos compuestos naturales con actividad antitumoral es una alternativa importante para la terapia de control del cáncer, para evitar la presencia de efectos secundarios o secuelas generadas por los tratamientos de elección.

El efecto anticancerígeno de *Ch. sorokiniana* se ha reportado únicamente en extractos crudos y contra células de linfoma murino L5178Y-R. En el presente estudio, se utilizaron las líneas celulares humanas MCF-7, 4T1 y L5178Y-R, se evaluaron las actividades citotóxicas, antioxidantes y hemolíticas de los extractos crudos de *Ch. sorokiniana* producida en laboratorio a diferentes concentraciones de Nejayote y *Ch. sorokiniana* UTEX 1230, una microalga que se obtuvo de un proceso industrializado y sus propiedades anticancerígenas no se habían evaluado previamente. Se demostró que los extractos crudos de metanol de *Ch. sorokiniana* y la cepa UTEX 1230, poseían un efecto antitumoral significativamente mayor ( $IC_{50} = 36.18 \mu\text{g/mL} \pm 0.64 \mu\text{g/mL}$  y  $209.9 \mu\text{g/mL} \pm 1.14 \mu\text{g/mL}$ ) contra células L5178Y-R que el ( $IC_{50} = 460 \mu\text{g/mL}$ ) de *Ch. sorokiniana* aislada en Nuevo León, México (Reyna-Martínez et al. 2018); mientras que, en los extractos producidos en Nejayote no se encontró actividad contra esta línea celular.

Al evaluar la línea celular MCF-7, también se observó un efecto antitumoral, siendo esta significativamente mayor en la cepa UTEX 1230, con una  $IC_{50} = 43.25 \mu\text{g/mL} \pm 1.01 \mu\text{g/mL}$ , comparada con la de  $IC_{50} = 408.5 \mu\text{g/mL} \pm 0.87 \mu\text{g/mL}$  de *Ch. sorokiniana*. En el caso de la producida en Nejayote al 100%, se obtuvo una  $IC_{50} = 92.38 \mu\text{g/mL} \pm 0.98 \mu\text{g/mL}$ , pero con un índice de selectividad muy bajo ( $< 0.85$ ) por lo cual se descartó para los siguientes estudios. En la línea celular 4T1, no se observó actividad en concentraciones de  $500 \mu\text{g/mL}$  con los extractos utilizados. Otros estudios han demostrado que esta especie de microalga inhibió el crecimiento de líneas celulares cancerosas, diferentes a las utilizadas en nuestro trabajo (Leong et al. 2024; Dinh et al. 2022). En este sentido, se informó que la luteína de la cepa *Ch. sorokiniana* TH01 cultivada mixotróficamente en glucosa posee propiedades antitumorales contra KB humano, HepG2, MCF-7 y SK-LU-1, mostrando valores de  $IC_{50}$  de 58.07, 61.37, 71.52 y  $81.69 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Adzahar et al. 2021). Por otro lado, se evaluó el extracto etanólico de *Ch. sorokiniana* contra el melanoma humano A375 y el cáncer de cuello uterino HeLa, otro estudio demostró una disminución en su viabilidad, utilizando concentraciones superiores a  $100 \mu\text{g/mL}$ , y en el caso de A375, se observó una  $IC_{50}$  de  $41.49 \mu\text{g/mL}$  (Parimalachelvam et al. 2023). Estos estudios evidenciaron el potencial del uso de extractos de *Ch. sorokiniana* contra el cáncer.

En el presente estudio, se evaluaron la actividad antioxidante y hemolítica de los extractos crudos. Mediante el método de DPPH, se observó una alta actividad antioxidante en los extractos de *Ch. sorokiniana* ( $IC_{50} = 4.852 \mu\text{g/mL} \pm 0.678 \mu\text{g/mL}$ ) y la cepa UTEX 1230 ( $IC_{50} = 11.96 \mu\text{g/mL} \pm 1.528 \mu\text{g/mL}$ ), al igual que el ácido ascórbico utilizado como control. Además, los extractos no mostraron actividad hemolítica a concentraciones menor de 500  $\mu\text{g/mL}$ . En un estudio realizado por Abdel-Karim et al. (2019), se evaluó la actividad antioxidante de diferentes extractos de *Ch. vulgaris*, y observaron una alta actividad antioxidante en su extracto metanólico, lo que concuerda con nuestros resultados.

Para caracterizar las fracciones, se seleccionaron las FC3 y FC4 del extracto metanólico de *Ch. sorokiniana* cepa UTEX 1230, por presentar mejor  $IC_{50}$  en inhibición de crecimiento con un  $IS < 10$  y mayor efecto antioxidante. Detectamos metabolitos que previamente se habían reportado con actividades anticancerígenas o antioxidantes, como loliolida (Park et al. 2019). Este compuesto, extraído de algas de agua dulce, redujo la expresión de las caspasas 3, 8 y 9 en los queratinocitos humanos, las cuales están relacionadas con la apoptosis inducida por especies reactivas de oxígeno (ROS). De manera similar, un loliolida aislado de *Sargassum horneri* estimuló los queratinocitos HaCat y mejoró la viabilidad celular de los queratinocitos al reducir la producción de ROS (Han et al. 2021).

El ácido cinámico, otro metabolito aislado en nuestro estudio, también tiene propiedades anticancerígenas. Se ha observado un aumento de la toxicidad y del efecto antiproliferativo contra diferentes células de cáncer de mama tras combinar diferentes fármacos, incluidos cisplatino, paclitaxel, doxorubicina, veliparib, tamoxifeno y dactolisib, con derivados del ácido cinámico (Meirelles et al. 2023; Bouyahya et al. 2024). Además, se ha demostrado que los híbridos de ácido cinámico y pregenolona inhiben las líneas celulares de cáncer humano A549, MCF-7, HepG2 y HL-60 (Ge et al. 2019). El dihidrojasmonato de metilo, encontrado en este estudio, también tiene efectos antitumorales (Bouyahya et al. 2024).

Se ha informado de la producción de vitaminas entre las especies de *Chlorella*, mientras que la producción de riboflavina, encontrada en este estudio, ha sido reportada por cianobacterias (Bouyahya et al. 2024). Otro metabolito encontrado en este estudio es la criptoficina, que es producida por la cianobacteria *Nostoc*. Este metabolito actúa como un inhibidor de microtúbulos y muestra un mecanismo de acción similar al de los alcaloides de

la vinca, mostrando un efecto antitumoral contra las células de leucemia murina L1210. Su modo de acción implica la unión a la tubulina y la alteración de su ensamblaje. También es citotóxico para las células LoVo y KB al promover la apoptosis y tiene propiedades antiproliferativas en las líneas celulares de carcinoma de ovario SKOV3 y de mama MDA-MB-435. Además, este metabolito fue tóxico contra las células de cáncer colorrectal y nasofaríngeo, mostrando una potencia de 100 a 1,000 veces mayor en comparación con los fármacos actualmente disponibles (Bouyahya et al. 2024).

El costunolido encontrado en nuestra fracción de metanol es un metabolito que ha sido aislado de diferentes plantas medicinales, lo que ha mejorado el interés de los investigadores ya que existen estudios que demuestran sus potenciales actividades anticancerígenas contra el cáncer de mama, leucemia, cáncer de ovario, cáncer de hígado y cáncer de vejiga (Lin et al. 2015).

Los ensayos de hemólisis de eritrocitos son importantes en la caracterización de extractos antes de su uso en sistemas biológicos *in vivo*. Es una prueba simple y económica para la evaluación de citotoxicidad (Sæbø et al. 2024). Según Antolovich et al. (2022), los extractos que muestran  $IC_{50} > 90 \mu\text{g/mL}$  no se consideran tóxicos. Por lo tanto, el extracto crudo y las fracciones colectivas de la cepa UTEX 1230 pueden considerarse de baja toxicidad hacia los eritrocitos humanos, ya que presentaron  $IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ .

La relación entre los ensayos de actividad antitumoral, antioxidante y hemolítica se utiliza para evaluar la biocompatibilidad o el daño potencial que un extracto puede causar a las células normales (Sæbø et al. 2023). Nuestros resultados demuestran el potencial antitumoral, antioxidante y no hemolítico de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 y su participación en los mecanismos metabólicos que conducen a dichas actividades. En este estudio, también se identificaron nueve metabolitos en los FC que mostraron las mayores actividades antioxidantes y citotóxicas. Además, las propiedades antitumorales de la cepa probada (UTEX 1239), obtenida a partir de un proceso industrializado, no se evaluaron previamente. Es necesario entonces continuar investigando los mecanismos en los que los compuestos bioactivos pueden estar involucrados, así como su potencial uso clínico.

## 9. CONCLUSIONES

- *Ch. sorokiniana* creció de manera exponencial durante 21 días en solución LC.
- La microalga mostró capacidad de crecer bajo condiciones de estrés y a diferentes concentraciones de Nejayote.
- Los extractos de *Ch. sorokiniana* y *Ch. sorokiniana* producidos a diferentes concentraciones de Nejayote como medio de cultivo, no mostraron actividad antibacteriana y antifúngica.
- El extracto metanólico de *Ch. sorokiniana* presentó actividad anticancerígena contra la línea celular L5178Y-R y MCF7, mientras que el extracto producido en 100% de Nejayote aumentó su efectividad disminuyendo la  $IC_{50}$  de 408.5  $\mu\text{g/mL}$  a 92.38  $\mu\text{g/mL}$ .
- El extracto de metanólico crudo de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 y las fracciones colectivas poseen potencial anticancerígeno contra las células de linfoma LY5178Y-R y cáncer de mama MCF7, y actividad antioxidante, sin afectar las células normales.
- La FC3 y FC4 de *Ch. sorokiniana* UTEX 1230 se seleccionaron para su caracterización por presentar actividad anticancerígena contra el L5178Y-R ( $IC_{50} = 93.22 \pm 1.69$ , IS = 4.5 y  $76.69 \pm 1.63$ ), IS = 1.67) y MCF7 ( $IC_{50} = 76.8 \pm 1.09$ , IS = 4.54 y  $100.9 \pm 1.16$ , IS = 2.1), además de ausencia de hemólisis ( $IC_{50} = 3.52 \pm 1.257$  y  $4.452 \pm 0.592$ ) en eritrocitos humanos.
- El análisis por LC-MS2 de las FC3 y FC4 reveló la presencia de compuestos reportados con actividad anticancerígena y antioxidante que podrían ser responsables de la actividad biológica observada.
- La FC3 contiene loliolida, ácido cinámico y dihidrojasmonato de metilo.
- La FC4 contiene loliolida, dihidrojasmonato de metilo, sansalvamida A, 1-monolinolenina, criptoficina 29, costunólido, lumicromo de riboflavina y germicidina B.

## 10.PERSPECTIVAS

- Evaluar otros medios de crecimiento de *Ch. sorokiniana* y evaluar su actividad creciendo en esos medios.
- Evaluar la actividad antihemolítica de las fracciones colectivas (FC).
- Evaluar la actividad de las FCs en un modelo *in vivo*.
- Realizar la purificación de los compuestos bioactivos y evaluar su actividad *in vitro* e *in vivo*.
- Determinar el mecanismo de acción del extracto metanólico, de las FC y de los compuestos bioactivos.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Hack, M. E., Abdelnour, S., Alagawany, M., Abdo, M., Sakr, M. A., Khafaga, A. F., y Gebriel, M. G. (2019). Microalgae in modern cancer therapy: Current knowledge. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 42-50.
- Abdel-Karim, O. H., Gheda, S. F., Ismail, G. A., & Abo-Shady, A. M. (2019). Phytochemical Screening and antioxidant activity of *Chlorella vulgaris*. *Delta Journal of Science*, 41(1), 79-91.
- Adzahar, N. S., Basri, D. F., Latif, E. S., & Sallehudin, N. J. (2021). In vitro and in vivo cytotoxic effects of *Chlorella* against various types of cancer. *IIUM Medical Journal Malaysia*, 20(1).
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198.
- Athbi, A. M., Al-Mayah, S. H., y Khalaf, A. K. (2014). Antiparasitic activity of the microalgae *Cladophora crispata* against the Protoscolices of hydatid cysts compared with albendazole drug. *African Journal of Biotechnology*, 13(30).
- Ballesteros-Torres, J. M., Samaniego-Moreno, L., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, R. S., Rodríguez-Padilla, C., y Tamez-Guerra, P. (2019). Amino acids and acylcarnitine production by *Chlorella vulgaris* and *Chlorella sorokiniana* microalgae from wastewater culture. *PeerJ*, 7, e7977.
- Basheer, S., Huo, S., Zhu, F., Qian, J., Xu, L., Cui, F., y Zou, B. (2020). Microalgae in human health and medicine. En: *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products* (pp. 149-174). Springer, Singapore.
- Beheshtipour, H., Mortazavian, A. M., Mohammadi, R., Sohrabvandi, S., y Khosravi-Darani, K. (2013). Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* algae into probiotic fermented milks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(2), 144-154.
- Blas-Valdivia, V., Ortiz-Butrón, R., Pineda-Reynoso, M., Hernández-García, A., y Cano-Europa, E. (2011). *Chlorella vulgaris* administration prevents HgCl<sub>2</sub>-caused oxidative stress and cellular damage in the kidney. *Journal of Applied Phycology*, 23(1), 53-58.

- Bouyahya, A., Bakrim, S., Chamkhi, I., Taha, D., El Omari, N., El Mneyiy, N., ... & Aanniz, T. (2024). Bioactive substances of cyanobacteria and microalgae: sources, metabolism, and anticancer mechanism insights. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 170, 115989.
- Brennan, L., y Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2), 557-577.
- Cantú-Bernal, S., Domínguez-Gámez, M., Medina-Peraza, I., Aros-Uzarraga, E., Ontiveros, N., Flores-Mendoza, L., y González-Ochoa, G. (2020). Enhanced viability and anti-rotavirus effect of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus plantarum* in combination with *Chlorella sorokiniana* in a dairy product. *Frontiers in Microbiology*, 11, 875.
- Chader, S., Hacene, H., y Agathos, S. N. (2009). Study of hydrogen production by three strains of *Chlorella* isolated from the soil in the Algerian Sahara. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(11), 4941-4946.
- Chalé, J. (2016). Obtención de metano a partir de aguas residuales de maíz (Nejayote) mediante dos reactores en serie. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Posgrado en Ciencias en Energía Renovable. Yucatán, Mérida, México, 01/04/2016
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., y Florou-Paneri, P. (2013). Functional properties of carotenoids originating from algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(1), 5–11.
- De Moraes, M. G., Vaz, B. D. S., de Moraes, E. G., y Costa, J. A. V. (2015). Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *BioMed research international*, 2015.
- Dewi, I. C., Falaise, C., Hellio, C., Bourgougnon, N., y Mouget, J. L. (2018). Anticancer, antiviral, antibacterial, and antifungal properties in microalgae. In *Microalgae in Health and Disease Prevention* (pp. 235-261). Academic Press.
- Dinh, C. T., Do, C. V. T., Nguyen, T. P. T., Nguyen, N. H., Le, T. G., & Tran, T. D. (2022). Isolation, purification and cytotoxic evaluation of lutein from mixotrophically grown *Chlorella sorokiniana* TH01. *Algal Research*, 62, 102632.
- El Baky, A., El-Baroty, G. S., e Ibrahim, E. A. (2014). Antiproliferation and antioxidant properties of lipid extracts of the microalgae *Scenedesmus obliquus* grown under stress conditions. *Der Pharma Chemica* 2014; 6,24-34

- Elizondo-Luévano, J. H., Gomez-Flores, R., Verde-Star, M. J., Tamez-Guerra, P., Romo-Sáenz, C. I., Chávez-Montes, A., y Quintanilla-Licea, R. (2022). In vitro cytotoxic activity of methanol extracts of selected medicinal plants traditionally used in Mexico against human hepatocellular carcinoma. *Plants*, 11(21), 2862.
- Figuroa-González, I., Quijano, G., Ramirez, G., y Cruz-Guerrero, A. (2011). Probiotics and prebiotics—perspectives and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(8), 1341-1348.
- García-Depraect, O., Gómez-Romero, J., León-Becerril, E., y López-López, A. (2017). A novel biohydrogen production process: Co-digestion of vinasse and *Nejayote* as complex raw substrates using a robust inoculum. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(9), 5820-5831.
- Ge, Y. X., Wang, Y. H., Zhang, J., Yu, Z. P., Mu, X., Song, J. L., ... & Zhang, H. (2019). New cinnamic acid-pregnenolone hybrids as potential antiproliferative agents: Design, synthesis and biological evaluation. *Steroids*, 152, 108499.
- Gupta, S. K., Ansari, F. A., Shriwastav, A., Sahoo, N. K., Rawat, I., y Bux, F. (2016). Dual role of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus* for comprehensive wastewater treatment and biomass production for bio-fuels. *Journal of cleaner production*, 115, 255-264.
- Han, E. J., Fernando, I. P. S., Kim, H. S., Lee, D. S., Kim, A., Je, J. G., ... y Ahn, G. (2021). (–)-Loliolide isolated from *Sargassum horneri* suppressed oxidative stress and inflammation by activating Nrf2/HO-1 signaling in IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ -stimulated HaCaT keratinocytes. *Antioxidants*, 10(6), 856.
- Hernández-Pérez, A., y Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173.
- Hudek, K., Davis, L. C., Ibbini, J., y Erickson, L. (2014). Commercial products from algae. En *Algal biorefineries* (pp. 275-295). Springer, Dordrecht.
- Ibusuki, K., y Minamishima, Y. (1990). Effect of *Chlorella vulgaris* extracts on murine cytomegalovirus infections. *Natural immunity and cell growth regulation*, 9(2), 121-128.
- Janczyk, P., H. Franke, and W. B. Souffrant. "Nutritional value of *Chlorella vulgaris*: effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats." *Animal feed science and technology* 132.1-2 (2007): 163-169.

- Junior, W. G. M., Gorgich, M., Corrêa, P. S., Martins, A. A., Mata, T. M., y Caetano, N. S. (2020). Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing. *Aquaculture*, 735562.
- Kokou, F., Makridis, P., Kentouri, M., y Divanach, P. (2012). Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquaculture Research*, 43(10), 1520-1527.
- Kumar, K., y Das, D. (2012). Growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* in airlift and bubble column photobioreactors. *Bioresource Technology*, 116, 307-313.
- Leong, Y. K., & Chang, J. S. (2024). Proteins and bioactive peptides from algae: Insights into antioxidant, anti-hypertensive, anti-diabetic and anti-cancer activities. *Trends in Food Science & Technology*, 104352.
- Lin, P. Y., Tsai, C. T., Chuang, W. L., Chao, Y. H., Pan, I. H., Chen, Y. K., ... & Wang, B. Y. (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*, 17, 1-8.
- Lin, X., Peng, Z., & Su, C. (2015). Potential anti-cancer activities and mechanisms of costunolide and dehydrocostuslactone. *International journal of molecular sciences*, 16(5), 10888-10906.
- Liu, J., y Hu, Q. (2013). *Chlorella*: industrial production of cell mass and chemicals. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology, 329-338.
- Lizzul, A. M., Hellier, P., Purton, S., Baganz, F., Ladommatos, N., y Campos, L. (2014). Combined remediation and lipid production using *Chlorella sorokiniana* grown on wastewater and exhaust gases. *Bioresource technology*, 151, 12-18.
- López, O. A. P. (2015). Estudio de la interacción microalgabacteria sobre la producción de tiamina y triptófano por *Chlorella sorokiniana* y su efecto en la biosíntesis de AIA por *Azospirillum brasilense*. Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Instituto Politécnico Nacional, México.  
<http://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1001/657>
- Lopez-Chuken U y Young S. (2010). The use of chloro-complexation to enhance cadmium uptake by *Zea mays* and *Brassica juncea*: testing a “free ion activity model” and implications for phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* 12:7.  
<http://dx.doi.org/10.1080/15226510903353161>

- López-Pacheco, I. Y., Carrillo-Nieves, D., Salinas-Salazar, C., Silva-Núñez, A., Arévalo-Gallegos, A., Barceló, D., y Parra-Saldívar, R. (2019). Combination of Nejayote and swine wastewater as a medium for *Arthrospira maxima* and *Chlorella vulgaris* production and wastewater treatment. *Science of the total environment*, 676, 356-367.
- Lordan, S., Ross, R. P., y Stanton, C. (2011). Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Marine drugs*, 9(6), 1056-1100.
- Luna, L. M. G. (2007). Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista cubana de química*, 19(2), 3-20.
- Martínez, R. (2012). Producción de lípidos por cepas de *Chlorella pyrenoidosa* y *Rhodotorula mucilaginosa* y generación de un consorcio microbiano (Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, 111).
- Mata TM, Martins AA, y Caetano NS. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:217– 232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.
- Meirelles, L. E. D. F., Souza, M. V. F. D., Carobeli, L. R., Morelli, F., Mari, N. L., Damke, E., ... y Silva, V. R. S. D. (2023). Combination of conventional drugs with biocompounds derived from cinnamic acid: a promising option for breast cancer therapy. *Biomedicines*, 11(2), 275.
- Melo, J. M., Telles, T. S., Ribeiro, M. R., de Carvalho Junior, O., y Andrade, D. S. (2022). *Chlorella sorokiniana* as bioremediator of wastewater: Nutrient removal, biomass production, and potential profit. *Bioresource Technology Reports*, 17, 100933.
- Mitra, D., van Leeuwen, J. H., y Lamsal, B. (2012). Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research*, 1(1), 40-48.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Najdenski, H. M., Gigova, L. G., Iliev, I. I., Pilarski, P. S., Lukavský, J., Tsvetkova, I. V., y Kussovski, V. K. (2013). Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *International journal of food science & technology*, 48(7), 1533-1540.
- Ortiz-Moreno, M. L., Cortés-Castillo, C. E., Sánchez-Villarraga, J., Padilla, J., & Otero-Paternina, A. M. (2012). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Orinoquia*, 16(1), 11-20.

- Oyeronke, A. O., Mojisola, A. A. A., Funmilola, A. S., & Bunmi, A. J. (2023). Natural compounds of algae origin with potential anticarcinogenic benefits. *Next-Generation Algae*, 2, 153-175.
- Parimalachelvam, G.; Nagendran, N.; Balakrishnan, S. (2023). Assessment of anti-cancer properties of *Chlorella sorokiniana* against A375, A549 and HeLa cell lines using GC-MS analysis and MTT assay. *Science Academique*. 4, 55–71.
- Park, S. H., Kim, D. S., Kim, S., Lorz, L. R., Choi, E., Lim, H. Y., ... & Cho, J. Y. (2019). Loliolide presents antiapoptosis and antiscratching effects in human keratinocytes. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 651.
- Perveen, K., Bukhari, N. A., Al Masoudi, L. M., Alqahtani, A. N., Alruways, M. W., y Alkhattaf, F. S. (2022). Antifungal potential, chemical composition of *Chlorella vulgaris* and SEM analysis of morphological changes in *Fusarium oxysporum*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 2501-2505.
- Pradhan, J., Das, S., y Das, B. K. (2014). Antibacterial activity of freshwater microalgae: A review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 8(32), 809-818.
- Quintanilla-Licea, R., Gomez-Flores, R., Samaniego-Escamilla, M. Á., Hernández-Martínez, H. C., Tamez-Guerra, P., y Morado-Castillo, R. (2016). Cytotoxic effect of methanol extracts and partitions of two Mexican desert plants against the murine lymphoma L5178Y-R. *American Journal of Plant Sciences*, 7(11), 1521.
- Ramírez, K., Quintero-Soto, M. F., y Rochín-Medina, J. J. (2020). Enhancement of the antioxidant and antimicrobial activities of maize wastewater by an eco-friendly process. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(3), 1682-1689.
- Ramírez-Villalobos, J. M., Gomez-Flores, R., Velázquez-Flores, P. V., Morán-Santibáñez, K. S., Tamez-Guerra, P., Pérez-González, O., y Romo-Sáenz, C. I. (2023). Effect of Culture conditions of *Lophocereus Marginatus* Endophytic Fungi on yield and anticancer and antioxidant activities. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(5), 3948.
- Reyna-Martinez, R., Gomez-Flores, R., López-Chuken, U., Quintanilla-Licea, R., Caballero-Hernandez, D., Rodríguez-Padilla, C., y Tamez-Guerra, P. (2018). Antitumor activity of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus* sp. microalgae native of Nuevo León State, México. *PeerJ*, 6, e4358.

- Rodríguez-Garza, N. E., Quintanilla-Licea, R., Gomez-Flores, R., Galaviz-Silva, L., y Molina-Garza, Z. J. (2024). In vitro antiprotozoal activity of *Schinus molle* extract, partitions, and fractions against *Trypanosoma cruzi*. *Plants*, 13(16), 2177.
- Román, F. J. Á. (2014). Estudios de actividad anticáncer y anti-inflamatoria de compuestos bioactivos aislados de medios acuosos terrestres y marinos. Tesis de doctorado, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.
- Sæbø, I. P., Bjørås, M., Franzyk, H., Helgesen, E., & Booth, J. A. (2023). Optimization of the hemolysis assay for the assessment of cytotoxicity. *International journal of molecular sciences*, 24(3), 2914.
- Salazar, M. (2006). Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Contactos*, 59, 64-70.
- Salmerón-Alcocer A, Rodríguez-Mendoza N, Pineda-Santiago V, Cristiani-Urbina E, Juárez-Ramírez C, Ruiz-Ordaz N, y Galíndez-Mayer J. (2003). Aerobic treatment of maize-processing wastewater (Nejayote) in a single-stream multi-stage bioreactor. *Journal of Environmental Engineering and Science* 2: 401-406.
- Samaniego EMÁ. (2016). Identificación de compuestos de *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton y Rose e *Ibervillea sonora* (Watson) con actividad citotóxica contra el linfoma murino L5178Y-R. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L., México.
- Santoyo, S., Jaime, L., Plaza, M., Herrero, M., Rodriguez-Meizoso, I., Ibañez, E., y Reglero, G. (2012). Antiviral compounds obtained from microalgae commonly used as carotenoid sources. *Journal of Applied Phycology*, 24(4), 731-741.
- Sarkar, S., Manna, M. S., Bhowmick, T. K., y Gayen, K. (2020). Priority-based multiple products from microalgae: Review on techniques and strategies. *Critical reviews in biotechnology*, 40(5), 590-607.
- Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., y Abd\_Allah, E. F. (2019). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi journal of biological sciences*, 26(4), 709-722.
- Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S., & Maiti, P. (2018). Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal transduction and targeted therapy*, 3(1), 7.

- Senhorinho, G. N., Lannér, C., Laamanen, C. A., Lima, S. T. C., y Scott, J. A. (2024). Freshwater eukaryotic and prokaryotic microalgae as a source of compounds with anticancer activities. Pt 1: Background and Assessment. *International Journal on Algae*, 26(3).
- Shaima, A. F., Yasin, N. H. M., Ibrahim, N., Takriff, M. S., Gunasekaran, D., & Ismaeel, M. Y. (2022). Unveiling antimicrobial activity of microalgae *Chlorella sorokiniana* (UKM2), *Chlorella* sp. (UKM8) and *Scenedesmus* sp. (UKM9). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(2), 1043-1052.
- Shalaby, E. (2011). Algae as promising organisms for environment and health. *Plant signaling y behavior*, 6(9), 1338-1350.
- Shanab, S. M., Mostafa, S. S., Shalaby, E. A., y Mahmoud, G. I. (2012). Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(8), 608-615.
- Suárez, E. R., Bugden, S. M., Kai, F. B., Kralovec, J. A., Nosedá, M. D., Barrow, C. J., y Grindley, T. B. (2008). First isolation and structural determination of cyclic  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)-glucans from an alga, *Chlorella pyrenoidosa*. *Carbohydrate research*, 343(15), 2623-2633.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., y Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Teas, J., y Irhimeh, M. R. (2012). Dietary algae and HIV/AIDS: proof of concept clinical data. *Journal of applied phycology*, 24(3), 575-582.
- Tejano, L. A., Peralta, J. P., Yap, E. E. S., y Chang, Y. W. (2019). Bioactivities of enzymatic protein hydrolysates derived from *Chlorella sorokiniana*. *Food science & nutrition*, 7(7), 2381-2390.
- Uma, R., Sivasubramanian, V., y Niranjali Devaraj, S. (2011). Preliminary phytochemical analysis and in vitro antibacterial screening of green micro algae, *Desmococcus olivaceus*, *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*. *Journal of Algal Biomass Utiln*, 2(3), 74-81.
- Vacio-Muro, K. J., Lozano-Álvarez, J. A., Sánchez-González, M. N., Vela, N. A. C., Torres-Ramírez, E., y Jáuregui-Rincón, J. (2020). Remoción de contaminantes del Nejayote con alginato y quitosano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 36(3), 497-515.
- Valderrama-Bravo, C., Gutiérrez-Cortez, E., Contreras-Padilla, M., Rojas-Molina, I., Mosquera, J. C., Rojas-Molina, A., y Rodríguez-García, M. E. (2012). Constant pressure filtration of lime



- water (Nejayote) used to cook kernels in maize processing. *Journal of Food Engineering*, 110(3), 478-486.
- Volk, R. B., y Furkert, F. H. (2006). Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbiological Research*, 161(2), 180-186.
- Wang, H. M., Pan, J. L., Chen, C. Y., Chiu, C. C., Yang, M. H., Chang, H. W., y Chang, J. S. (2010). Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* CC by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. *Process Biochemistry*, 45(12), 1865-1872.
- Zielinski, D., Fraczyk, J., Debowski, M., Zielinski, M., Kaminski, Z. J., Kregiel, D., y Kolesinska, B. (2020). Biological activity of hydrophilic extract of *Chlorella vulgaris* grown on post-fermentation leachate from a biogas plant supplied with stillage and maize silage. *Molecules*, 25(8), 1790.
- Zúñiga-Sánchez, J. O. (2020). Evaluación del uso del Nejayote para la producción de goma xantano por *Xanthomonas campestris* y su escalamiento a nivel semi-piloto. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L., México.

## ANEXO 1

| Solución LC (Lopez-Chuken et al. 2010)                                              |          |                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------|--------------------|
| Stock A                                                                             |          |                    |
| Composición Química                                                                 | g/L dH2O | mL L <sup>-1</sup> |
| KNO <sub>3</sub>                                                                    | 101.11   | 5                  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                                     | 27.22    |                    |
| MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O                                               | 98.6     |                    |
| Stock B                                                                             |          |                    |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4 H <sub>2</sub> O                               | 295.18   | 5                  |
| Stock C                                                                             |          |                    |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                                                      | 2.86     | 1                  |
| MnCl <sub>2</sub> .4 H <sub>2</sub> O                                               | 1.81     |                    |
| ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O                                               | 0.22     |                    |
| CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O                                               | 0.08     |                    |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4 H <sub>2</sub> O | 0.019    |                    |
| Stock D                                                                             |          |                    |
| FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O                                               | 1.388    | 4                  |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                                                | 1.833    |                    |

## ANEXO 2

San Nicolas de los Garza, Nuevo León, México a 16 de abril de 2022

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título de la Investigación:** Caracterización del efecto biológico de compuestos bioactivos de *chlorella sorokiniana* cultivada en nejayote.

**Nombre del Investigador Principal:** Dra. Patricia Tamez Guerra

**Nombre de la persona que participará en la Investigación:** Dr. César Iván Romo Sáenz

A través de este documento que forma parte del proceso para la obtención del consentimiento informado, me gustaría invitarlo a participar en la investigación titulada: **Actividad antitumoral de extractos metanólicos de microorganismos endófitos en células tumorales**. Antes de decidir, necesita entender por qué se está realizando esta investigación y en qué consistirá su participación. Por favor tómese el tiempo que usted necesite, para leer la siguiente información cuidadosamente y pregunte cualquier cosa que no comprenda. Si usted lo desea puede consultar con personas de su confianza (Familiar y/o Médico tratante) sobre la presente investigación.

**¿Dónde se llevará a cabo esta investigación?**

Esta investigación se llevará a cabo en las instalaciones de la facultad de ciencias biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, específicamente en la unidad de inmunobiología y acarreadores de drogas ubicado en el Laboratorio de inmunología y virología.

## FIRMA DE CONSENTIMIENTO

Yo, CÉSAR IVÁN ROMO SÁENZ manifiesto que fui informado (a) del propósito, procedimientos y tiempo de participación y en pleno uso de mis facultades, es mi voluntad participar en esta investigación titulada. Caracterización del efecto biológico de compuestos bioactivos de *chlorella sorokiniana* cultivada en nejayote.

No omito manifestar que he sido informado(a) clara, precisa y ampliamente, respecto de los procedimientos que implica esta investigación, así como de los riesgos a los que estaré expuesto ya que dicho procedimiento es considerado de bajo o nulo riesgo para mi salud.

He leído y comprendido la información anterior, y todas mis preguntas han sido respondidas de manera clara y a mi entera satisfacción, por parte de los miembros de esta investigación



CÉSAR IVÁN ROMO SÁENZ

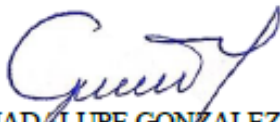
NOMBRE Y FIRMA DEL PARTICIPANTE  
PADRE/TUTOR O REPRESENTANTE LEGAL  
(según aplique, se requiere identificación)



DRA. PATRICIA TAMEZ GUERRA

NOMBRE Y FIRMA  
DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

## TESTIGOS



DRA. GUADALUPE GONZALEZ OCHOA  
NOMBRE Y FIRMA



MARIBEL DOMÍNGUEZ GÁMEZ  
NOMBRE Y FIRMA

Nota: Los datos personales contenidos en la presente Carta de Consentimiento Informado, serán protegidos conforme a lo dispuesto en las Leyes Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública, General de Transparencia y Acceso a la Información Pública y General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados y demás normatividad aplicable en la materia.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Maribel Domínguez Gámez

Candidato para el Grado en

**Doctor en Ciencias con Orientación en Microbiología**

**Tesis:**

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO BIOLÓGICO DE COMPUESTOS  
BIOACTIVOS DE *Chlorella sorokiniana* CULTIVADA EN NEJAYOTE**

**Campo de estudio:** Microbiología

**Datos Personales:** Nacida en Navojoa, Sonora el 19 de Julio de 1995, hija de Fernando Domínguez Rodríguez y María de Jesús Gámez Esquer.

### **Educación:**

- Egresada de la Universidad de Sonora, grado obtenido: Lic. Químico Biólogo Clínico en el año 2018.
- Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido: Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología en el año 2021.