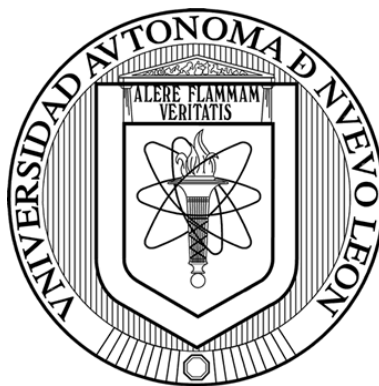


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



PRODUCCIÓN DE FLAVONOIDES POR LA MICROALGA *Chlorella sorokiniana*
AISLADA EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN Y EVALUACIÓN DE SU
ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Por

QFB ILSE ELIZABETH VÁZQUEZ MEZA

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN en Microbiología Aplicada

Mayo, 2026

PRODUCCIÓN DE FLAVONOIDES POR LA MICROALGA *Chlorella sorokiniana*
AISLADA EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN Y EVALUACIÓN DE SU
ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Aprobación de la Tesis:



Dr. Gustavo Raúl Reyna Martínez, Asesor de la Tesis



Dr. Alonso Alberto Orozco Flores, Co-Asesor de la Tesis

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu

Dr. Julio Silva Mendoza

Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredó

DEDICATORIA

Para la persona que me hizo interesarme en la investigación.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera iniciar agradeciendo enormemente a mis padres por todo su apoyo, cariño y paciencia que me han dado a lo largo de toda mi vida, gracias a su constante motivación he podido lograr terminar esta tesis. También a mi hermana, por escucharme y ayudarme cuando la necesitaba, por ser mi roomie y compañera de estudio y desvelos. A todos los quiero ch y ch más ch.

A mi familia, por siempre preocuparse por mis microalgas y ayudarme a juntar las botellas cuando las ocupaba. Además, sin sus ocurrencias y bromas no habría podido mantenerme tranquila a lo largo de los últimos 3 años.

A mis amigos, Mariana, Gerardo, Andrés, Aurora, Alex, Lalo, Daniela, Angelo, Alf, Karla y Ana; mil gracias por su apoyo, bromas y salidas, me ayudaban a distraerme y olvidarme un momento de mis tragedias en el laboratorio.

Quisiera agradecer enormemente al doctor Gustavo Raúl Reyna Martínez y al doctor Alonso Alberto Orozco Flores, quienes fueron mis asesores de tesis y siempre me brindaron de su tiempo, apoyo y conocimientos para poder realizar este proyecto y resolver los imprevistos que se fueron presentando; así como a los doctores Julio Silva Mendoza, Alma Elizabeth Gómez Loredó, Juan Francisco Villarreal Chiu por haber formado parte del comité de tesis y haber aportado siempre valiosas sugerencias y revisiones del presente trabajo.

A la doctora María del Rayo Camacho Corona, quien nos apoyó a la obtención de fracciones de los extractos y análisis de estas. Al doctor Jesús Alberto Gómez Treviño por el uso de su por permitir el uso de equipo en el Laboratorio de Biología Molecular. Al doctor Julio César Beltrán Rocha por su ayuda con la fabricación y montaje de los reactores utilizados.

Por otro lado, quisiera agradecer a las instituciones que me dieron la oportunidad y el apoyo de poder realizar este proyecto, a la Universidad Autónoma de Nuevo León, en especial al Laboratorio de Biotecnología y al Laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Químicas y al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme utilizar sus instalaciones y equipos. Al CONAHCYT/SECIHTI, por la beca otorgada que me permitió continuar mis estudios.

A mis compañeros y amigos que hice en estos lugares, tanto en el laboratorio como en las clases, el convivir con ustedes hizo más ameno los últimos 3 años.

Y por último, pero no menos importante, a Alfredo Rivera por su apoyo, consejos, tiempo, comprensión y aventuras, sin ti no habría sido igual este trayecto.

RESUMEN

La presente tesis evaluó la producción de flavonoides por la microalga *Chlorella sorokiniana* aislada en el estado de Nuevo León y la actividad citotóxica de sus extractos. Para ello, la microalga fue cultivada bajo condiciones de estrés utilizando ZnCl_2 y *L*-fenilalanina, buscando favorecer la biosíntesis de flavonoides. Posteriormente, el cultivo fue escalado en biorreactores de bajo costo, logrando un aumento en la producción de biomasa y flavonoides.

Los extractos obtenidos fueron fraccionados y evaluados contra la línea murina L5178Y-R mediante ensayos de citotoxicidad. La fracción hexánica del cultivo sin estrés presentó la mayor actividad citotóxica, con un IC_{50} de 22.56 $\mu\text{g/mL}$. El análisis químico permitió identificar brassicasterol y ergosterol, compuestos reportados previamente con potencial anticancerígeno. Los resultados mostraron que el aumento de flavonoides no se relacionó directamente con una mayor actividad citotóxica, sugiriendo que el perfil metabólico global de la microalga es el principal responsable de la actividad biológica observada.

FIRMA DE LOS ASESORES:

Dr. Gustavo Raúl Reyna Martínez, Asesor de la Tesis

Dr. Alonso Alberto Orozco Flores, Co-Asesor de la Tesis

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción.....	10
1.1 Microalgas.....	11
1.1.1 <i>Chlorella sorokiniana</i>	13
1.2 Flavonoides	14
1.2.1 Ruta de biosíntesis	16
1.2.2 Cuantificación por método Dowd	18
1.3 Cáncer	19
1.3.1 Estrés oxidativo.....	21
1.3.2 Actividad anticancerígena.....	22
1.3.3 Línea celular.....	23
Capítulo 2. Antecedentes	24
2.1 Producción de flavonoides por <i>Chlorella sorokiniana</i>	24
2.2 Evaluación de actividad citotóxica de extractos microalgales.	25
Capítulo 3.....	27
3.1 Análisis Crítico	27
3.2 Aportación científica.....	28
3.3 Hipótesis.....	28
3.4 Objetivos	29
3.4.1 Objetivo general	29
3.4.2 Objetivos específicos	29
Capítulo 4. Metodología	30
4.1 Reactivación y mantenimiento de la cepa	30
4.2 Establecimiento de condiciones de cultivo	31
4.2.1 Crecimiento de la biomasa bajo condiciones de estrés	31
4.2.2 Extracción de flavonoides	31
4.3 Escalamiento de la producción de biomasa	32
4.3.1 Biorreactores de columna de burbujeo.....	32
4.3.2 Desinfección de los biorreactores	33
4.3.3 Preparación de inóculo	34
4.3.4 Monitoreo de biorreactores	34

4.3.5 Recolección y liofilización de biomasa.....	34
4.4 Obtención de fracciones.....	35
4.3.1 Separación líquido-líquido.....	35
4.5 Evaluación de actividad biológica <i>in vitro</i>	35
4.4.1 Mantenimiento de la línea celular.....	35
4.4.3 Evaluación de la actividad citotóxica de las fracciones del extracto.....	35
4.5 Identificación de la composición química de las fracciones activas.....	37
4.6 Disposición de residuos.....	38
Capítulo 5. Resultados y discusión.....	39
5.1 Reactivación y mantenimiento de la cepa.....	39
5.2 Establecimiento de condiciones de cultivo.....	39
5.3 Escalamiento de la producción de biomasa.....	42
5.4 Obtención del extracto y las fracciones.....	45
5.5 Evaluación de actividad biológica <i>in vitro</i>	47
5.6 Identificación de la composición química.....	49
Capítulo 6. Conclusiones.....	53
Capítulo 7. Perspectivas.....	55
Capítulo 8. Referencias.....	56
Anexos.....	64
Anexo 1. Tablas de análisis estadísticos.....	64
Anexo 2.....	65
Anexo 3. Cromatograma y espectros de masas.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras principales de los flavonoides.....	15
Figura 2. Ruta de biosíntesis en plantas de los flavonoides. <i>Reimpreso</i> de Shen (24). ...	18
Figura 3. Formación del complejo entre la quercetina y el AlCl_3	19
Figura 4. Incidencias de cáncer 20220. a) en el mundo, b) en México. <i>Adaptado</i> del Observatorio Global del Cáncer, IARC (32,33).....	19
Figura 5. Hallmarks of Cancer. <i>Adaptado</i> de Hanahan (37).....	21
Figura 6. Modelo de biorreactor utilizado. a) Válvula de escape de aire, b) tapón de goma para toma de muestra, c) válvula de flujo de aire.	33
Figura 7. Curva de crecimiento de <i>Chlorella sorokiniana</i>	39
Figura 8. Curvas de crecimiento de los reactores.	43
Figura 9. Cromatografía en capa fina de las fracciones C0, fase móvil diclorometano:metanol (9:1). a) sin revelar b) 254 nm, c) 365 nm, d) $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$	45
Figura 10. Cromatografía en capa fina de las fracciones C1, fase móvil diclorometano:metanol (9:1). a) sin revelar b) 254 nm, c) 365 nm, d) $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$	46
Figura 11. Resultados de ensayos de citotoxicidad. Controles utilizados: vincristina ($50 \mu\text{g/mL}$) = $78.7 \pm 4.7 \%$ y quercetina ($333.3 \mu\text{g/mL}$) = $94.4 \pm 1.1\%$	48
Figura 12. Cromatograma de la fracción H0.....	65
Figura 13. Espectro de masas del compuesto 1 de la fracción H0.	66
Figura 14. Espectro de masas del compuesto 2 de la fracción H0.	66
Figura 15. Espectro de masas del compuesto 3 de la fracción H0.	67
Figura 16. Espectro de masas del compuesto 4 de la fracción H0.	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de especies reactivas de oxígeno.....	21
Tabla 2. Condiciones cultivos	31
Tabla 3. Disposición de residuos	38
Tabla 4. Resultados de cultivos.....	40
Tabla 5. Fracciones obtenidas a partir del extracto crudo.....	45
Tabla 6. Moléculas identificadas de la fracción H0.....	49
Tabla 7. Análisis de varianza	64
Tabla 8. Prueba de diferencia mínima significativa.....	64
Tabla 9. Pruebas F y t contra control	64
Tabla 10. Resultados de ensayos de citotoxicidad	65

Capítulo 1. Introducción

Las microalgas son microorganismos unicelulares y fotosintéticos que crecen generalmente en agua dulce y salada. El metabolismo de las microalgas permite sintetizar diversos compuestos bioactivos, generar un rápido crecimiento de la biomasa y también adecuar su composición bioquímica al entorno en el que se encuentra (1,2).

Las microalgas son abundantes en nutrientes y sustancias bioactivas como proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos grasos, carotenoides, flavonoides, alcaloides, entre otros; dichas sustancias bioactivas tienen propiedades antioxidantes, antibacterianas, antivirales, antitumorales, regenerativas, antihipertensivos, neuroprotectores e inmunoestimulantes (2,3). Estas propiedades hacen que estos microorganismos representen un gran potencial de aplicación para diversas áreas en ciencias, en especial en investigaciones médicas y bioquímicas (1).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos sintetizados por las plantas como metabolitos secundarios que tienen actividad biológica, son los responsables del color, sabor y de algunas de sus actividades farmacológicas. Los flavonoides tienen una fuerte actividad antioxidante que ayuda a proteger a las plantas de condiciones desfavorables, lo que ha causado gran interés para diversos estudios que evalúen sus posibles efectos beneficiosos en enfermedades humanas. Estudios *in vitro* e *in vivo* que han demostrado que los flavonoides presentan actividad antiinflamatoria, inmunomoduladora y anticancerígena (4).

El utilizar microalgas para el descubrimiento de nuevos fármacos tiene varias ventajas a comparación de la obtención de bioactivos a partir de plantas. Entre las que

destacan el corto tiempo de generación, plasticidad metabólica, ausencia de competencia por la tierra cultivable, capacidad de crecimiento sin importar la estación y menor cantidad de requerimientos nutricionales para crecer. Además de esto, las microalgas son más ricas en términos de bioactividad y presencia de fitoquímicos que las plantas terrestres ya que producen metabolitos con una amplia diversidad química debido a las condiciones extremas a las que pueden crecer (p. e. alta salinidad y temperatura) (3).

La microalga *Chlorella sorokiniana* se reconoce por su potencial industrial y su potencial de escalamiento; además de esto, su facilidad y velocidad de crecimiento en diferentes condiciones hacen de esta microalga atractiva para la producción y obtención de biocompuestos mediante diversos procesos biotecnológicos (5).

En el presente trabajo se realizó el escalamiento del cultivo de la microalga *Chlorella sorokiniana* (cepa aislada en el estado de Nuevo León) que permitió aumentar la producción de flavonoides, para su posterior extracción y evaluación de su actividad citotóxica *in vitro*.

1.1 Microalgas

Las algas son un grupo diverso de organismos fotosintéticos. Estos organismos se subdividen con base a su tamaño como macroalgas y microalgas (6). Las macroalgas son organismos pluricelulares cuya estructura es similar a la de las plantas; cuentan con raíces, tallos y hojas (p. e. algas marinas). Las microalgas son organismos unicelulares encontrados en diversos ecosistemas del planeta, tanto acuáticos como terrestres, por lo que hay una gran variedad de especies que pueden vivir en diferentes condiciones ambientales (6,7). Estas se organizan celularmente en colonias o de forma unicelular. Las

células de las algas también contienen cloroplastos y pirenoides; los cloroplastos son orgánulos presentes en las células de las plantas y de las algas que permiten realizar el proceso de la fotosíntesis, y también participan en procesos metabólicos de las células; mientras que los pirenoides ayudan a fijar el CO₂ concentrado la enzima RuBisCo (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa) (6,8,9). Las algas se clasifican en divisiones de acuerdo con sus características morfológicas, pigmentación, naturaleza química de productos de almacenamiento fotosintéticos y organización de membranas fotosintéticas. Los cuatro grupos más importantes con base en su abundancia son las algas verdes (*Chlorophyceae*), diatomeas (*Bacillariophyceae*), algas verdeazules (*Cyanophyceae*) y algas doradas (*Chrysophyceae*) (6).

Las microalgas desempeñan un papel importante en el ciclo del carbono, ellas utilizan la energía luminosa para producir materia orgánica (10). Las microalgas fijan en promedio 1.83 kg de CO₂ atmosférico por cada 1 kg de biomasa, para convertirlo en productos a base de carbono. Alrededor de la mitad del oxígeno de la Tierra es producido por las microalgas y pueden fijar aproximadamente 100 millones de toneladas de CO₂ por día (11).

Las microalgas cuentan con un metabolismo variable. Si bien la mayoría utilizan energía de la luz, CO₂ y agua para producir compuestos mediante fotosíntesis oxigénica (fotoautótrofas) (7,10). Algunas otras también requieren de moléculas orgánicas para crecer (auxótrofas), mientras que otras pueden crecer en la oscuridad utilizando moléculas orgánicas simples como fuente de carbono y energía (heterótrofas). Hay algas que pueden utilizar energía de la luz y del carbono orgánico para el crecimiento (mixotrofia). Además

de lo ya mencionado, las microalgas necesitan nitrógeno, fósforo y azufre como elementos esenciales (10).

El metabolismo variable de las microalgas permite sintetizar diversos compuestos bioactivos, generar un rápido crecimiento de la biomasa y también adecuar su composición bioquímica al entorno en el que se encuentran (1,2). Además de esto, la producción de biomasa de microalgas es menos agresiva con el medio ambiente en comparación con otros organismos, ya que utiliza CO₂ para producir oxígeno y consume cantidades pequeñas de agua (2). Las microalgas son abundantes en nutrientes y compuestos de interés como proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos grasos, carotenoides, flavonoides, alcaloides, entre otros; algunos de estos compuestos tienen propiedades antioxidantes, antibacterianas, antivirales, antitumorales, regenerativas, antihipertensivas, neuroprotectores, inmunoestimulantes, entre otras (2,3). Estas propiedades hacen que estos microorganismos representen un gran potencial de aplicación para diversas áreas en ciencias, en especial en investigaciones médicas y bioquímicas (1).

1.1.1 *Chlorella sorokiniana*

El género *Chlorella* es el género de microalgas más explotado comercialmente, el cual pertenece a la división de Chlorophyta (*Chlorophyceae*), conocidas como algas verdes. Las algas suelen ser de color verde gracias a la presencia de clorofila a y b (6). El género contiene muchas subespecies distribuidas en agua dulce y salada, particularmente en aguas con abundantes nutrientes. Son microalgas unicelulares o coloniales pequeñas (2-10 µm de diámetro) esféricas u ovoides, no flageladas e inmóviles, de pared celular lisa con un solo cloroplasto con un pirenoide (5,10). Este género es mencionado como la “fabrica unicelular impulsada por luz solar” ya que es posible obtener proteínas, lípidos,

carbohidratos, pigmentos, vitaminas y minerales a partir de la biomasa(12). Una de las especies más utilizadas debido a su uso múltiple e innovador en biotecnología es la especie *Chlorella sorokiniana* (13).

La especie *C. sorokiniana* mide alrededor de 2 a 4.5 μm de diámetro, es un alga unicelular robusta que puede crecer mixotróficamente en diversas fuentes de carbono y nitrógeno. Dicha característica le permite crecer en aguas residuales y material de desecho. *C. sorokiniana* se reconoce por su potencial industrial y su potencial de escalamiento, además de esto, su facilidad y velocidad de crecimiento en diferentes condiciones hacen de esta microalga atractiva para la producción y obtención de biocompuestos mediante diversos procesos biotecnológicos (5).

1.2 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios polifenólicos que se encuentran ampliamente en diversas especies de plantas y algas (3,14). Los flavonoides tienen una estructura común que consiste en una cadena fenilpropanoide de 15 carbonos (C6-C3-C6), formando dos anillos aromáticos unidos por un anillo heterocíclico de pirano de 3 carbonos (3,4,15). Esta estructura principal varía según el nivel de oxidación, modificando los sustituyentes en los anillos y dando lugar a las diferentes clases de flavonoides, que son principalmente seis (figura 1): isoflavonoides, flavanonas, flavanoles, flavonoles, flavonas y antocianidinas (4,15–17). Dependiendo de los sustituyentes que presenten y la estructura que formen sus propiedades químicas cambian, de esta forma es posible estudiar las actividades biológicas que presentan los flavonoides.

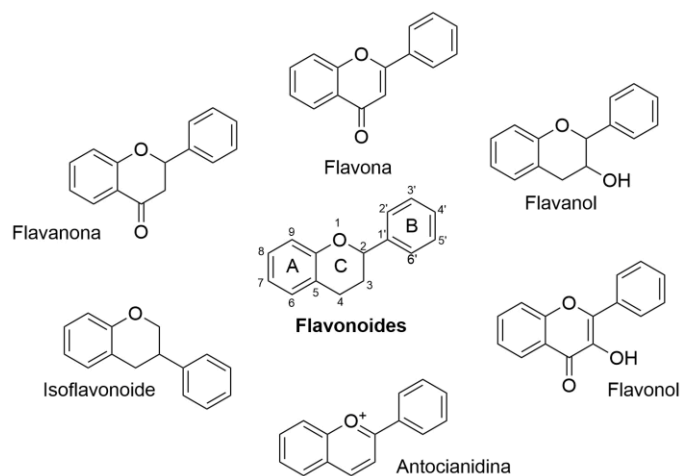


Figura 1. Estructuras principales de los flavonoides.

Los flavonoides están presentes en concentraciones variables en las microalgas, junto con diferentes tipos de flavonoides. Durante el cultivo de microalgas, sus condiciones de crecimiento pueden manipularse para mejorar la producción de flavonoides. El estrés inducido por metales puede promover la acumulación y producción de flavonoides. Se ha investigado el comportamiento de *Scenedesmus acuminatus* y *Chlorella sorokiniana* bajo diferentes concentraciones de ZnCl_2 , observando un aumento en la producción de flavonoides y otros polifenoles (18). También se ha estudiado la respuesta de *Dunaliella tertiolecta* a la adición de Cu^{2+} y Fe^{3+} , reportando una mayor acumulación de flavonoides como catequina y epicatequina en respuesta al aumento de las concentraciones de iones Cu^{2+} (19). En ambos casos, se cree que los flavonoides desempeñan un papel protector al proteger a las células de la toxicidad por metales (18–20). La adición de *L*-fenilalanina al medio y la inducción de estrés mediante la concentración de nitrato también condujeron a un aumento en la producción de flavonoides, en base a esto se ha informado sobre la acumulación de flavonoides en *Chlorella vulgaris* y *Auxenochlorella pyrenoidosa* (anteriormente *Chlorella pyrenoidosa*) en condiciones de estrés por nitrato y con la adición de *L*-fenilalanina al medio. La *L*-

fenilalanina actúa como una molécula precursora que activa la síntesis de flavonoides, mientras que la disminución de nitrato en el medio regula la producción de flavonoides (21).

Los flavonoides se han utilizado en diversas industrias, incluyendo la de colorantes naturales y productos cosméticos. Recientemente, la industria farmacéutica ha mostrado un creciente interés en estos compuestos, principalmente debido a su actividad antioxidante. Además, se ha demostrado que poseen otras aplicaciones en el campo médico, tales como actividades anticancerígena, antimicrobiana, antiviral, antiangiogénica, antimalárica, antioxidante, neuroprotectora, antitumoral y antiproliferativa (14,22,23).

1.2.1 Ruta de biosíntesis

En las plantas, la biosíntesis de los flavonoides es responsable de la vía del shikimato y la vía del acetato, ver figura 2 (24). A partir de la vía del shikimato se obtienen los aminoácidos *L*-fenilalanina y *L*-tirosina para iniciar la vía de los fenilpropanoides, y a partir de la vía del acetato se obtiene el malonil-CoA (24–26).

Primero, se transforma la *L*-fenilalanina a ácido cinámico por medio de la acción de la fenilalanina amonio liasa (PAL); posteriormente la posición C4 del ácido cinámico es hidroxilada por la cinnamato-4-hidroxilasa (C4H) para obtener ácido 4-cumárico, el cual permite la síntesis del 4-cumaril-CoA mediante la cumarato-CoA-ligasa (4CL) (24,26,27).

La 4-cumaril-CoA y la malonil-CoA sufren una condensación e isomerización catalizadas por la chalcona sintasa (CHS), dando lugar a la chalcola narigenina; la cual

sufre dos reacciones mediadas por la chalcona isomerasa (CHI), una isomerización para producir flavanonas y una ciclación para formar naringenina (24,26,27).

La naringenina es el precursor común de los intermediarios y productos finales de la síntesis de flavonoides, y es la responsable de la similitud estructural; esta molécula reacciona con la flavona sintasa I (FNS I) o la flavona sintasa II (FNS II) para formar flavonas, mientras que con la isoflavona sintasa (IFS) forma isoflavonas (24,26).

Además, la naringenina también puede convertirse en dihidroflavonoles gracias a la acción de la flavanona-3-hidroxilasa (F3H), la flavonol-3'-hidroxilasa (F3'H) y la flavonol-3',5'-hidroxilasa (F3'5'H); y estos dihidroflavonoles pueden transformarse en flavonoles gracias a la flavonol sintasa (FLS) o reducirse a leucoantocianidinas por la dihidroflavonol-4-reductasa (DFR), y a partir de esta sintetizarse las antocianidinas a partir de la leucoantocinidina dioxigenasa (LDOX), las cuales pueden modificarse a antocianinas mediante la uridina difosfato (UDP)-glucosa flavonoide-3-O-glicosiltransferasa (UFGT) (24,26).

Asimismo, las leucoantocianidinas también pueden producir flavanoles a través de la leucoantocianidina reductasa (LAR) (24,26). Finalmente, los sustituyentes en los anillos se generan mediante procesos de hidroxilación, metilación, acilación y glicosilación, dando lugar a la diversidad estructural de los flavonoides (24,25).

En el caso de las microalgas, se cree que sigue una ruta de biosíntesis similar al de las plantas, aunque las variaciones enzimáticas dependen de la especie del alga y es un área poco estudiada. Se ha observado que algunas microalgas carecen de la fenilalanina amonio liasa (PAL), lo que sugiere la existencia de rutas alternas para la síntesis de los

precursores; también la presencia de la chalcona sintasa (CHS) se encuentra ausente en algunas microalgas, sugiriendo así que podrían existir enzimas oxidorreductasas alternativas con funciones similares a la CHS (27).

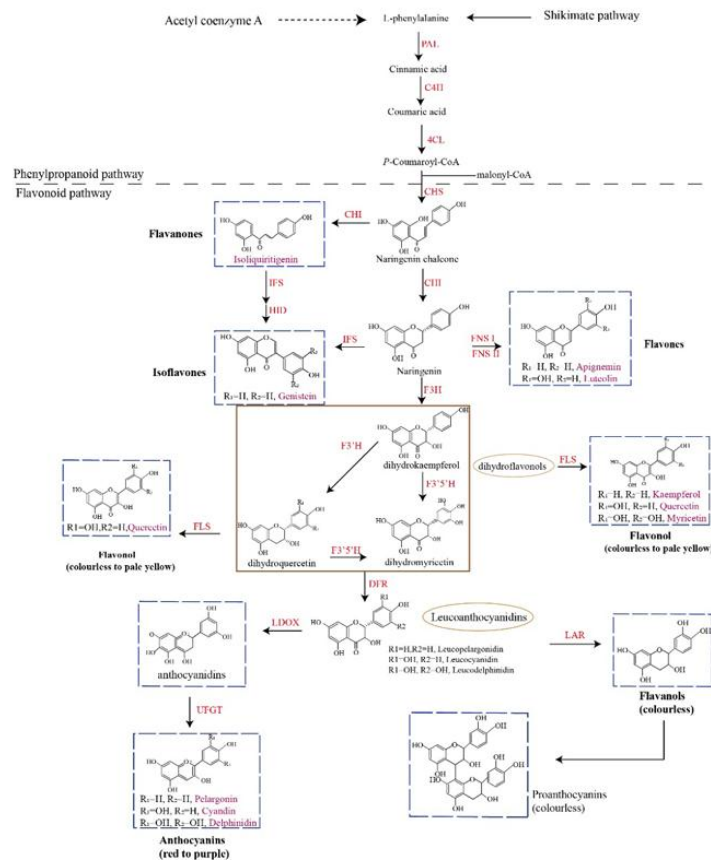


Figura 2. Ruta de biosíntesis en plantas de los flavonoides. *Reimpreso de Shen (24).*

1.2.2 Cuantificación por método Dowd

El método Dowd es una técnica colorimétrica utilizada para la cuantificación de flavonoides totales. Este método se basa en la formación de un complejo de color amarillo entre el ion Al^{+3} del $AlCl_3$ y el flavonoide (figura 3); la intensidad de este color es proporcional a la concentración de flavonoides presentes en la muestra y puede medirse a una longitud de onda de 415 nm utilizando un espectrofotómetro (28–30).

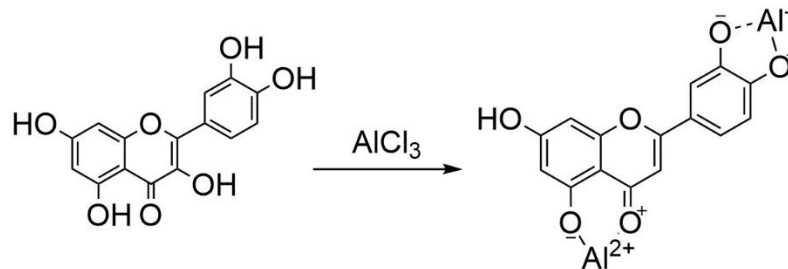


Figura 3. Formación del complejo entre la quercetina y el AlCl_3 .

1.3 Cáncer

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial; es una enfermedad heterogénea caracterizada por una proliferación descontrolada y un ciclo celular alterado que conduce a un crecimiento anormal de las células que invaden y metastatizan a otras partes del cuerpo (4,14,31). De acuerdo con la Agencia Internacional por la Investigación del Cáncer (IARC por sus siglas en inglés), agencia especializada en el cáncer de la Organización Mundial de la Salud (OMS), muestra en el Observatorio Global del Cáncer un valor estimado de incidencias en el 2022 de 19 976 499 (figura 4), de los cuales alrededor de 207 154 fueron en México, donde los principales tipos de cáncer son el de mama (31 043 casos), de próstata (26 565 casos) y el colorrectal (16 082) (32,33).

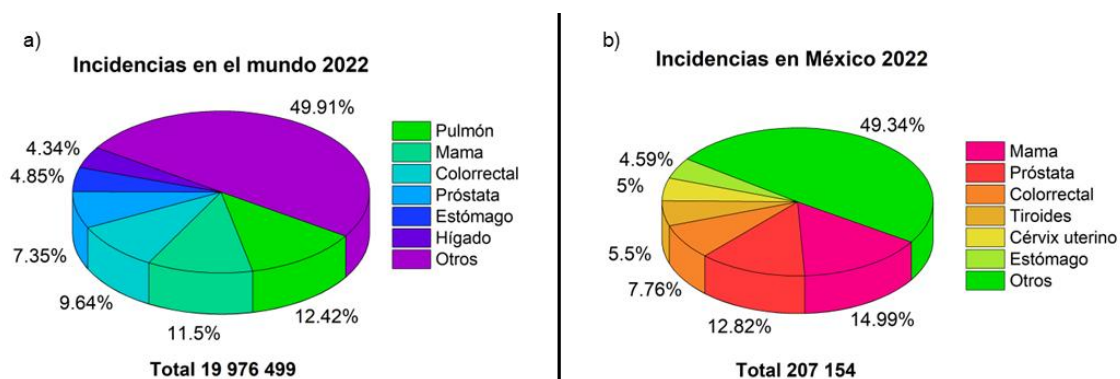


Figura 4. Incidencias de cáncer 2022. a) en el mundo, b) en México. *Adaptado* del Observatorio Global del Cáncer, IARC (32,33).

Dado el impacto del cáncer a nivel mundial y su alta incidencia, es fundamental comprender los mecanismos subyacentes a su desarrollo. La formación de neoplasias es un proceso de varios pasos, implica la modificación del ADN genómico seguido del crecimiento selectivo de la célula mutada (34). En este sentido, las células normales sufren una transformación conocida como carcinogénesis para convertirse en células cancerosas, esta transformación se describe en tres fases clave, que abarcan varios procesos y características, las cuales son iniciación, promoción y progresión (34,35).

La iniciación implica la formación de una célula preneoplásica mutada a partir de la acumulación de diversas mutaciones, este proceso es irreversible y dependiente de la dosis (34,35). La promoción implica la expansión clonal selectiva de la célula preneoplásica mediante un aumento del crecimiento celular, esto puede ser por un aumento de la proliferación celular o por una disminución de la apoptosis (34,36). Esta etapa es dosis-dependiente y reversible tras eliminarse el estímulo de promoción tumoral. La progresión incluye cambios celulares y moleculares que ocurren desde el estado preneoplásico hasta el neoplásico, esta etapa es irreversible e implica inestabilidad genética (34).

A medida que las células pasan de la normalidad a estados de crecimiento neoplásico, estas adquieren un conjunto de capacidades funcionales. Estas características fueron propuestas por Hanahan y Weinberg en el 2000 y son conocidas como “Hallmarks of Cancer” (figura 5); son cruciales para la formación de tumores malignos e incluyen alteraciones metabólicas, evasión de supresores del crecimiento, formación de metástasis e inducción de angiogénesis, entre otras (37).



Figura 5. Hallmarks of Cancer. *Adaptado de Hanahan (37).*

1.3.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un estado de desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (tabla 1) y la eficiencia de los antioxidantes, también es uno de los principales factores que contribuyen a las mutaciones en el ADN (38,39). En condiciones normales, las células producen cantidades pequeñas de ROS y se mantienen en equilibrio debido a los efectos antioxidantes. Un ligero cambio en este equilibrio hacia el estrés oxidativo activa varias vías de señalización que generan daño al ADN, inducen mutagénesis, aumentan la proliferación celular y exacerban el efecto Warburg en el metabolismo de las células cancerosas (35).

Tabla 1. Ejemplos de especies reactivas de oxígeno.

Radical libre	
Oxígeno singulete	$^1\text{O}_2$
Ión superóxido	$\text{O}_2^\cdot$
Radical hidroxilo	$\text{OH}^\cdot$
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radicales alcoxí y peroxi	$\text{RO}^\cdot, \text{ROO}^\cdot$
Radical hidroperoxilo	$\text{ROOH}^\cdot$

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas formadas por la reducción parcial del oxígeno molecular y sus productos de reacción con otras moléculas (39). Las ROS funcionan como mensajeros intracelulares participando en el desarrollo celular, la proliferación, la diferenciación, la detección de oxígeno y la inmunidad adaptativa mediante modificaciones oxidativas reversibles de macromoléculas (35,39). Existen dos fuentes de ROS, las endógenas, células inflamatorias, mitocondrias y peroxisomas; y las exógenas, radiación ionizante, agentes ambientales, sustancias químicas, y agentes infecciosos (38).

1.3.2 Actividad anticancerígena

Los flavonoides tienen el potencial de interrumpir la carcinogénesis a través de mecanismos variables, principalmente esto se asocia con su actividad antioxidante. La actividad antioxidante de los flavonoides está asociada a su estructura molecular, ya que el número y la posición de los grupos -OH, junto con su configuración, influyen en los sitios antioxidantes. Esto permite la eliminación de radicales libres y la quelación de iones metálicos (14,22). La configuración de los grupos -OH en el anillo B de los flavonoides determina su potencial de eliminación de ROS, ya que dona átomos de hidrógeno y electrones a los radicales, estabilizándolos y dando lugar a radicales de flavonoides relativamente estables (22,40).

Algunos de los mecanismos de acción que pueden estar asociados a esta actividad incluyen: 1) supresión de la formación de ROS mediante la inhibición de enzimas relacionadas (xantina oxidasa, ciclooxigenasa-2, 5-lipoxigenasa); 2) quelación de metales traza involucrados en la generación de radicales libres; 3) eliminación de ROS; 4) mejorar

la regulación de las defensas antioxidantes (22,40,41). Se sugiere que la actividad antioxidante resulta de la combinación de estos mecanismos (41).

Además de esto, también pueden inducir la apoptosis, promover la autofagia, regular el metabolismo y suprimir la proliferación e invasión celular (4). Los flavonoides podrían dirigirse a la cascada de señalización apoptótica y estimular la vía de muerte celular. Además, al actuar como prooxidantes, podrían suprimir la proliferación de células cancerosas mediante la inhibición del receptor de crecimiento epidérmico/proteína quinasa activada por mitígeno (EGFR/MAPK), fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), proteína quinasa B (Akt), así como del factor nuclear (4).

1.3.3 Línea celular

1.3.3.1 L5178Y-R

La línea L5178Y-R deriva de un linfoma inducido en un ratón DBA/2 con metilcolantreno(42). Se emplea ampliamente para estudios de radio sensibilidad principalmente, y de toxicidad *in vitro* e *in vivo*(43). Son linfoblastos de timo, crecen en suspensión en medio Fischer suplementado con piruvato de sodio 0.1 g/L, bicarbonato de sodio 1.125 g/L, y 10% de suero de caballo en una atmosfera de 5% CO₂ a 37°C(42,44,45).

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Producción de flavonoides por *Chlorella sorokiniana*

En el 2017, Hamed *et al.* analizaron la respuesta del estrés oxidativo de *Chlorella sorokiniana* frente a diferentes concentraciones subletales de ZnCl_2 (0.4, 0.6, 1 mM) durante 7 días. Se analizó la respuesta a nivel de crecimiento, estrés oxidativo y producción de antioxidantes, como polifenoles totales, flavonoides totales, entre otros. Obteniendo como resultados alrededor de 1.2 mg/g de peso fresco en el cultivo control y alrededor de 2.4 mg/g de peso fresco en el cultivo con ZnCl_2 al 1mM (18).

En el 2019, Saad *et al.* realizaron un cribado fitoquímico de *Chlorella sorokiniana* utilizando medio BG-11 adicionado con solución de metales traza y una iluminación continua. El cribado se realizó para diversos biocompuestos, entre ellos flavonoides, para el cual dio positivo a la prueba de amonio/ácido sulfúrico y a la prueba de acetato/ácido con AlCl_3 indicando la presencia de flavonoides en el extracto (46).

En el 2019, Pikula *et al.* realizaron una revisión de los marcadores del estrés oxidativo y sus mecanismos de defensa en plantas y microalgas. Mencionando que en el caso de *Chlorella sorokiniana* el zinc causa un estrés xenobiótico en la microalga causando un incremento en la producción de flavonoides (20).

En el 2020, Yadavalli *et al.* compararon la producción de flavonoides de *Chlorella vulgaris* y *Auxenochlorella pyrenoidosa* en condiciones mixotróficas y autotróficas. Se cultivaron en medio BG-11 y BG-11 adicionado con 3 g/L de glucosa y Na_2CO_3 a 28°C durante 20 días, adicionando a todos los cultivos *L*-fenilalanina al final de la fase exponencial para acentuar la producción de flavonoides. El peso seco de biomasa máxima

de 13.7 g/L se observó con CV-mixotrófico seguido de AP-mixotrófico (12.9 g/L), CV-autótrofo (12.15 g/L) y AP autótrofo (11.2 g/L). Las mayores cantidades de flavonoides se observaron en el caso de AP-autótrofo (138 µg/L, el día 18), seguido de AP-mixotrófico (120 µg/mL; día 16), CV-mixotrófico (118 µg/mL; día 17) y CV-autotrófico. (113 µg/mL; día 17) (21).

En el 2022, Fernández Valenzuela *et al.* realizó un cultivo mixotrófico de una cepa de *Chlorella sorokiniana* aislada del estado de Nuevo León. La microalga fue cultivada en medio LC suplementado con 4 g/L de glucosa durante 10 días a 30°C. Obtuvieron 1.88 g/L de biomasa seca, y posteriormente se realizó una extracción con metanol, obteniendo 136 mg de extracto metanólico. El extracto fue analizado por UPLC-MS/MS para posterior identificación de compuestos, indicando la posible presencia de flavonoides, los cuales podrían indicar ser hidrato de catequina, cianidina, isoquercetina, e isoramnentina 3-O-glucosido 7-O-ramnósido (47).

2.2 Evaluación de actividad citotóxica de extractos microalgales.

En el 2018, Reyna-Martínez *et al.* evaluaron la actividad citotóxica *in vitro* del extracto metanólico crudo obtenido a partir de cepas aisladas de *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus* sp. contra la línea murina L5178Y-R (linfoma murino) y linfocitos sanos mediante la técnica de MTT. El extracto de *C. sorokiniana* obtuvo actividad significativa de 17% y 61% a la concentración de 250 y 500 µg/mL respectivamente, mientras que para *Scenedesmus* sp. fue indujo 15%, 25% y 75% a 125, 250 y 500 µg/mL respectivamente. Se obtuvo el IC₅₀ de ambos extractos, donde para *C. sorokiniana* fue de 460 ± 21.5 µg/mL, y para *Scenedesmus* sp. 362.9 ± 13.5 µg/mL. En base a los resultados, se observó que la actividad es dependiente de concentración contra la línea murina (48).

En el 2022, Fernández Valenzuela evaluó la actividad citotóxica *in vitro* del extracto metanólico crudo obtenido a partir de una cepa de *Chlorella sorokiniana* contra líneas celulares MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HT29 (adenocarcinoma colorrectal), Vero (tejido normal de riñón) y L5178-R (linfoma murino). Presentando actividad citotóxica contra las líneas celulares MCF-7 (IC_{50} 266.14 ± 7.13 $\mu\text{g/mL}$, citotoxicidad al 70% contra línea celular MCF-7 a 500 $\mu\text{g/mL}$) y L5178-R (citotoxicidad a 250 $\mu\text{g/mL}$ y 500 $\mu\text{g/mL}$ a 49.86% y 81.83% respectivamente, y la IC_{50} 230.12 ± 4.16 $\mu\text{g/mL}$), mientras que con la línea celular HT-29 (citotoxicidad no superando el 30% a 15.625 $\mu\text{g/mL}$) no se obtuvo actividad significativa, así como tampoco contra las células Vero, no superando los valores de citotoxicidad superiores al 16%, no representando una toxicidad importante en una línea celular sana (47).

En el 2025, Ferdous *et al.* evaluaron los extractos crudos de *Tetraselmis* sp, *Nannochloropsis* sp obtenidos con siete solventes de distintas polaridades (metanol, etanol, acetona, cloroformo, acetato de etilo, diclorometano y hexano). Los extractos se probaron a una sola concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ y evaluaron la inhibición de proliferación de la línea MCF7 a las 24, 48 y 72 horas. Los extractos que reportan tener mejor actividad antiproliferativa de *Nannochloropsis* sp a las 72 h de incubación fueron el hexánico con 29.80%, el de acetato de etilo 42.64% y de acetona con 42.52%; mientras que de *Tetraselmis* sp reportan que el que mejor resultado fue el de cloroformo a las 48 h de incubación con 36.52% de inhibición (49).

Capítulo 3.

3.1 Análisis Crítico

El conjunto de antecedentes sugiere que *Chlorella sorokiniana* es una microalga con capacidad demostrada para producir flavonoides y otros metabolitos secundarios bajo condiciones de estrés oxidativo o suplementación específica. Estudios como los de Hamed *et al.* (2017) y Pikula *et al.* (2019) evidencian que el zinc actúa como un agente xenobiótico que estimula la producción de compuestos antioxidantes, entre ellos flavonoides, lo cual coincide directamente con el primer componente de la hipótesis planteada (18,20). De manera complementaria, Yadavalli *et al.* (2022) demostraron que la adición de *L*-fenilalanina potencia la vía biosintética de los flavonoides, reforzando la plausibilidad de que un medio enriquecido con este aminoácido y zinc incremente su producción en *C. sorokiniana* (21).

En cuanto a la actividad biológica de los extractos, diversos estudios previos confirman que *C. sorokiniana* puede generar compuestos con potencial citotóxico contra líneas cancerígenas. Reyna-Martínez *et al.* (2018) y Fernández-Valenzuela *et al.* (2022) reportaron una actividad dependiente de la concentración frente a la línea murina L5178Y-R, alcanzando citotoxicidades superiores al 60% en extractos crudos. La observación de una mayor selectividad hacia células cancerígenas frente a células sanas apoya la idea de que parte de esta bioactividad puede deberse a metabolitos específicos, posiblemente flavonoides, conocidos por sus efectos citotóxicos y proapoptóticos en modelos cancerígenos (Kumar y Pandey, 2013; Nabavi *et al.*, 2015).

Sin embargo, debe considerarse que en los trabajos citados la bioactividad se evaluó principalmente en extractos crudos o fraccionados sin una clara atribución a compuestos individuales, lo que abre la posibilidad de sinergia entre metabolitos. De igual forma, los niveles de flavonoides detectados en microalgas son relativamente bajos en comparación con plantas superiores, por lo que la estrategia de inducir su producción mediante la suplementación de zinc y *L*-fenilalanina representa una innovación metodológica que podría superar esta limitante. Por lo que se buscó comprobar si la combinación de estos inductores potencia la biosíntesis de flavonoides y si estos metabolitos son responsables de la citotoxicidad observada frente a la línea L5178Y-R.

3.2 Aportación científica

Este proyecto permitió establecer las condiciones que favorecieron el incremento en la producción de flavonoides en *Chlorella sorokiniana*, así como realizar su fraccionamiento y evaluar su actividad citotóxica, con el fin de identificar compuestos con potencial terapéutico.

3.3 Hipótesis

La microalga *Chlorella sorokiniana* aislada del estado de Nuevo León es capaz de crecer en un medio enriquecido con *L*-fenilalanina y zinc aumentando su producción de flavonoides, los cuales pueden tener un efecto citotóxico contra la línea L5178Y-R.

3.4 Objetivos

3.4.1 Objetivo general

Cultivar a la microalga *Chlorella sorokiniana* bajo condiciones de estrés que favorezcan la producción de flavonoides para realizar su extracción y fraccionamiento, y posterior evaluación citotóxica *in vitro*.

3.4.2 Objetivos específicos

- 1) Establecer las condiciones de cultivo de *Chlorella sorokiniana* bajo las cuales se aumenten los rendimientos de producción de flavonoides.
- 2) Escalar la producción de biomasa.
- 3) Extraer y fraccionar los flavonoides de *Chlorella sorokiniana*.
- 4) Evaluar el efecto citotóxico de las fracciones *in vitro*.

Capítulo 4. Metodología

Los reactivos utilizados para la parte de cultivo de la microalga fueron proporcionados por el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas, mientras que la cepa de *Chlorella sorokiniana* utilizada para este proyecto fue proporcionada por el grupo de investigación del Dr. Raul Reyna. Los solventes utilizados para las separaciones, así como el rotavapor, fueron proporcionados por el Laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Químicas. La línea celular y los reactivos utilizados para el mantenimiento de las células y la evaluación de actividad citotóxica fueron proporcionados por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas.

4.1 Reactivación y mantenimiento de la cepa

La cepa de *C. sorokiniana* se encontraba preservada a una temperatura de 4°C en el medio sólido reportado previamente por López-Chuken (LC), en condiciones axénicas (50). La reactivación de la cepa se realizó mediante su cultivo en el medio LC líquido (50). Se emplearon matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de volumen de trabajo a una temperatura de 28°C, 130 rpm (Thermo Scientific, Compact Digital Mini Shaker) e intensidad lumínica de 5000 lux. La pureza de la cepa se evaluó mediante tinción de Gram y siembra en caldo nutritivo para descartar la contaminación de las microalgas por hongos o bacterias.

4.2 Establecimiento de condiciones de cultivo

4.2.1 Crecimiento de la biomasa bajo condiciones de estrés

Se cultivó la microalga *C. sorokiniana* en diferentes concentraciones de ZnCl_2 y *L*-fenilalanina en medio LC (tabla 1). Los cultivos se prepararon por triplicado en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL del medio, teniendo como control un cultivo sin adicionar ZnCl_2 y fenilalanina. Se incubaron (Shell Lab Labtech, 516 LS13016A) a 30°C, intensidad lumínica de 5000 luxes, y 145 rpm durante 25 días. Pasado el tiempo de cultivo, se centrifugó (THERMO Electron, Centra CL3R) la biomasa a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante. La biomasa se secó por liofilización (Thermo Fisher, FR Drying) a -50°C durante 48 horas y se obtuvo el peso seco.

Tabla 2. Condiciones de cultivos

Cultivo	ZnCl_2 (mM)	<i>L</i> -fenilalanina (mM)
C0	NA	NA
C1	0.4	0.5
C2	0.4	1
C3	0.6	0.5
C4	0.6	1
C5	1	0.5
C6	1	1

NA: no aplica

4.2.2 Extracción de flavonoides

A la biomasa liofilizada se le agregó 1.5 mL de etanol al 80% y se agitó en vortex (Constant Speed Mixer LabLine) por 10 min. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente (25°C) durante 30 min en agitación orbital a 160 rpm cubriendo los tubos con papel aluminio. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó a 3000 rpm a 4°C durante 15 min y se filtró el sobrenadante con papel filtro no.1 (Whatman no.1, 90 mm) (51). Repitiendo el proceso cuatro veces a cada muestra.

Se determinó el contenido total de flavonoides por el método Dowd. Para este método se preparó la curva de calibración utilizando un estándar de quercetina; los estándares se prepararon utilizando etanol al 80% en concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm. Se tomó 1 mL de estándar y se adicionaron 0.2 mL de AlCl_3 10% (preparado en metanol), 0.2 mL de acetato de potasio 1 M y 5.6 mL de agua destilada; se dejó incubar la reacción durante 30 min a temperatura ambiente, y pasado el tiempo se midió a 415 nm en el espectrofotómetro UV-Vis (VELAB, VE-5100 UV). Se repitió el mismo proceso con las muestras y se utilizó de blanco agua destilada, los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de quercetina por gramo de biomasa seca (mg EqQ/g biomasa) obtenidos a partir de la ecuación 1 ($R^2=0.9929$) (30).

$$y = 0.0071x - 0.001 \quad (1)$$

4.3 Escalamiento de la producción de biomasa

4.3.1 Biorreactores de columna de burbujeo

Se escaló el cultivo con las condiciones del C0 y C1 (tabla 1) dado que fueron los que mostraron mejores resultados, utilizando unos biorreactores de columna de burbujeo. Dichos reactores se construyeron utilizando materiales reciclados y de bajo costo (botellas de PET). La incubación y manejo se llevó a cabo utilizando cajas de cartón, realizándole ranuras para colocar 5 cm del cuello de la botella y poder mantenerlas posicionadas; también se recubrió el interior de la caja con papel aluminio, favoreciendo la dispersión de luz dentro de ella. Se colocaron 2 tiras LED (5 m cada una) (52).

Las botellas utilizadas se les realizaron 3 perforaciones; una en la tapa para introducir una válvula y poder regular el flujo de aire (figura 6c), la cual va conectado a

la bomba de aire (Bomba Elite 802, Lomas 802 HA802); en el fondo de la botella (figura 6a), agregando igualmente una válvula de escape del aire inyectado; y una lateral (figura 6b), donde se agregó un tapón de goma para facilitar la toma de muestra. Posteriormente, se le conectaron a las botellas manguera de plástico y filtro de membrana de fluoruro de polivinilideno de 0.22 μm (Millex-GV, Durapore PVDF membrane) para prevenir contaminación ambiental.

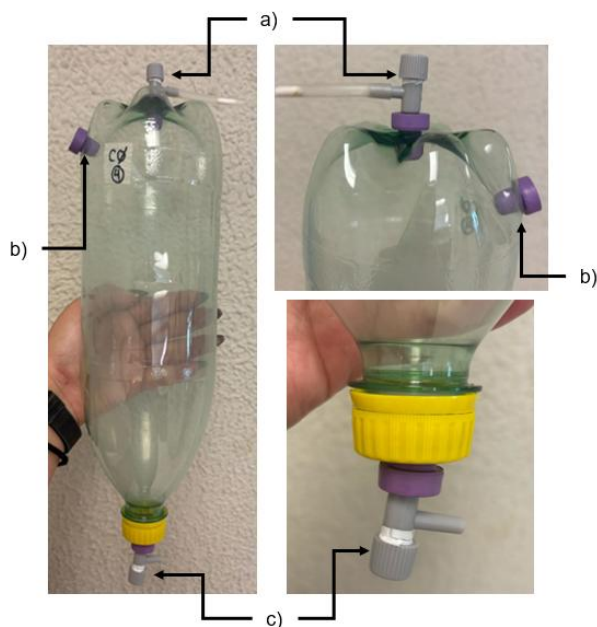


Figura 6. Modelo de biorreactor utilizado. a) Válvula de escape de aire, b) tapón de goma para toma de muestra, c) válvula de flujo de aire.

4.3.2 Desinfección de los biorreactores

La desinfección se realizó con lavados utilizando detergente comercial para laboratorio (L100, gluconato de sodio 0.75%, EDTA 1%, hidróxido de sodio 1.30%, pirofosfato de sodio 0.90%, nonilfenol etoxilado 2%), hipoclorito de sodio comercial al 5.25% y etanol al 70%, así como exposición a luz UV durante 45 min para la minimización de contaminación.

4.3.3 Preparación de inóculo

Se prepararon 5 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio LC y otros 5 matraces con 100 mL de medio LC adicionado con ZnCl_2 0.4 mM y fenilalanina 0.5 mM. Ambos cultivos fueron inoculados con 5 mL de un cultivo de 10 días preparado en medio LC. Los matraces se dejaron en incubación durante 7 días para posteriormente inocular los biorreactores con 100 mL de cultivo y 900 mL de medio nuevo. Se prepararon 10 biorreactores con 1 L de medio cada uno, siendo 5 reactores de cultivo con medio LC sin suplementar y 5 reactores de cultivo con medio LC suplementado con lo anteriormente descrito. El crecimiento de las cepas en los biorreactores se realizó a 27°C, 5000 luxes de intensidad lumínica, ciclo de luz 24:0 horas e inyección de aire ambiental entre 0.1-0.5 vvm.

4.3.4 Monitoreo de biorreactores

Se realizó el monitoreo de los reactores mediante densidad óptica a 750 nm con el espectrofotómetro UV-Vis cada 24 horas de cultivo para construir una curva de crecimiento. Así como visualización microscópica en fresco y con tinción Gram para descartar el crecimiento de hongos y/o bacterias en los biorreactores.

4.3.5 Recolección y liofilización de biomasa

A los 25 días se procedió a recolectar la biomasa, centrifugando el cultivo a 3000 rpm durante 15 min a 4°C. La biomasa obtenida se secó por liofilización en las condiciones descritas anteriormente (apartado 4.2.1). Posterior a la liofilización, se pesó la biomasa seca para estimar la producción de gramos por litro de cultivo, y finalmente realizar la extracción anteriormente descrita.

4.4 Obtención de fracciones

4.3.1 Separación líquido-líquido

El extracto etanólico obtenido se rotaevaporó a 37°C y se pesó para obtener el peso del extracto seco (BUCHI, Rotavapor R-300, Vacuum Pump V-300, Heating Bath B-300 Base). Posteriormente, se recuperó el extracto y se completó hasta los 15 mL con metanol al 25%. Se realizó una extracción líquido-líquido con hexano en partes iguales por triplicado, ambas fases se recuperaron repitiendo el proceso con la fase acuosa y diclorometano, y finalmente con la fase acuosa y acetato de etilo (53). Las fracciones obtenidas de hexano, diclorometano y acetato de etilo fueron secadas por rotaevaporación; mientras que a la fase acuosa se rotaevaporó hasta eliminar el metanol presente y posteriormente se liofilizó en las condiciones descritas anteriormente (apartado 4.2.1). Se pesaron las cuatro fracciones, se analizaron por cromatografía en capa fina (Silica gel 60 matrix, on TLC Alu foils, Sigma-Aldrich) eludida con diclorometano:metanol (9:1). Finalmente, se realizó la actividad biológica de cada fracción.

4.5 Evaluación de actividad biológica *in vitro*

4.4.1 Mantenimiento de la línea celular

Las células de la línea L5178Y-R se mantuvieron en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, y 0.5% de solución penicilina-estreptomicina. Incubando a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ (54).

4.4.3 Evaluación de la actividad citotóxica de las fracciones del extracto

Para evaluar la inhibición de proliferación celular y citotoxicidad *in vitro* de los extractos se utilizó la técnica colorimétrica de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-

ilo-2,5-difeniltetrazol), este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por las oxidorreductasas y deshidrogenasas dependientes del NADPH mitocondriales en un compuesto de color azul (formazán), que se produce de forma natural cuando las células son viables (55,56).

Para esta evaluación, se tomó una alícuota del cultivo celular y se lavó una vez con medio por centrifugación a 1800 rpm por 10 min; posteriormente se resuspendió en medio de cultivo completo y se ajustó a 5×10^4 células/mL. Las células se sembraron en microplacas de 96 pozos de fondo plano, conteniendo cultivos por triplicado en alícuotas de 200 μ L (10,000 células/pozo), y se incubaron en las mismas condiciones de mantenimiento durante 24 horas. Posteriormente, se desechó el medio exhausto y se añadieron 100 μ L de medio nuevo y 100 μ L de tratamiento a diferentes concentraciones en diluciones seriadas 1:2 partiendo de 500 μ g/mL. Como control positivo se utilizaron 100 μ L del antineoplásico vincristina (50 μ g/mL), como molécula similar 100 μ L de quercetina (333 μ g/mL) como control negativo 100 μ L de medio de cultivo, y como blanco pocillos sin células con 100 μ L de medio; incubando los cultivos a las mismas condiciones durante 24 horas. Al finalizar este período de tiempo, se colocaron 15 μ L de MTT a una concentración final de 0.5 mg/mL y se incubaron 4 horas adicionales; posteriormente se retiró el sobrenadante y se añadieron 80 μ L de DMSO a todos los pozos, las densidades ópticas se determinaron en un lector de microplacas (espectrofotómetro de microplacas Multiskan TM Go; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EE. UU.) a 570 nm (47,54).

El porcentaje de inhibición de proliferación se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \frac{DO \text{ células tratadas con extracto} - DO \text{ blanco}}{DO \text{ células no tratadas} - DO \text{ blanco}} \times 100 \quad (2)$$

Y para obtener el porcentaje de citotoxicidad, primero se debe calcular el porcentaje de viabilidad y posteriormente el de citotoxicidad:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{DO \text{ células tratadas con extracto} - DO \text{ blanco}}{DO \text{ células no tratadas} - DO \text{ blanco}} \times 100 \quad (3)$$

$$\% \text{ citotoxicidad} = 100 - \% \text{ viabilidad} \quad (4)$$

4.5 Identificación de la composición química de las fracciones activas.

Se llevó a cabo la identificación de los compuestos químicos presentes en la fracción con mejor actividad citotóxica utilizando un equipo de cromatografía líquida de ultra resolución UPLC MS/MS, acoplado a un detector de masas QDA® de Waters (Milford, MA, EE. UU.). La columna utilizada fue ACQUITY UPLC CORTECS® C18 1.6 µm 3.0 x 100 mm, modo ion positivo, con una temperatura de columna de 40 °C, y una temperatura de automuestreador 15 °C. Se tomó 1 mg de las fracciones seleccionadas y se disolvió en 1 mL de metanol grado HPLC, la muestra se filtró a través de un filtro 0.45 µm y se traspasó a un vial de vidrio. La identificación se logró con ácido fórmico al 0.1% en agua ultrapura (Fase A), acetonitrilo (Fase B) y acetato de amonio al 5 mM (Fase C). La velocidad de flujo utilizada fue de 0.3 mL/min, con un volumen de inyección 3 µL. La composición de los solventes a lo largo del tiempo fue la siguiente: inicial A: 5%; B: 85%; C: 10%, a los 3.0 min aumento A: 15%; B: 75%; C: 10%, cambiando a los 10.0 min A: 5%; B: 85%; C: 10%. Tiempo de corrida fue de 15.0 min. La identificación tentativa de los compuestos se realizó comparando sus espectros de masas con los reportados en bases de datos (MassBank, Metlin).

4.6 Disposición de residuos

La disposición de los residuos se realizó de acuerdo con el reglamento de Manejo Integral de Residuos del departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas y el reglamento de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

Tabla 3. Disposición de residuos

Colector	Residuo
A	Stock B, C, D; medio LC; AlCl_3 , reacciones método Dowd
C	EtOH, MeOH, AcOEt, hexano
D	Diclorometano
E orgánico	Quercetina (sln), fenilalanina (sln)
H	Stock A
Colorantes y lugol	Desechos de tinciones
Punzocortantes	Agujas
Cultivos y cepas	Cultivos en placa, material desechable en contacto con cultivos

Capítulo 5. Resultados y discusión

5.1 Reactivación y mantenimiento de la cepa

La reactivación de la cepa de *C. sorokiniana* se realizó conforme a lo descrito en el apartado 4.2.1. Durante el mantenimiento de la cepa, se realizó una curva de crecimiento para identificar las fases de crecimiento de la cepa (figura 7). Se observó que la fase estacionaria se alcanza alrededor de los 15 y 20 días, lo cual se observó un comportamiento similar en los trabajos de Fernández-Valenzuela, 2022 y Cantú-Martínez, 2023 (47,52).

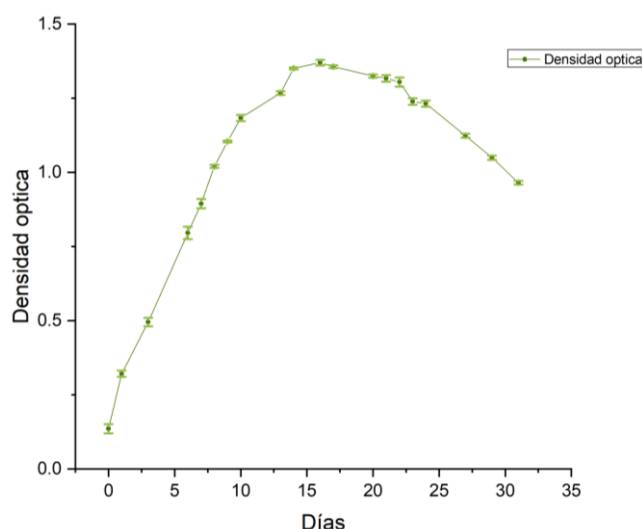


Figura 7. Curva de crecimiento de *Chlorella sorokiniana*

5.2 Establecimiento de condiciones de cultivo

A los 25 días se retiraron los cultivos obteniendo entre 0.48 g/L y 1.22 g/L de producción de biomasa. A partir de esta biomasa se obtuvieron alrededor de 10 mL de extracto etanólico de cada cultivo, el cual se utilizó para el análisis cuantitativo de

flavonoides. Obteniendo de 2.25 mg equivalentes de Quercetina/g biomasa seca (eq Q/g) a 10.35 mg eq Q/g biomasa seca (tabla 4).

Tabla 4. Resultados de cultivos

Cultivo	Biomasa (g/L)	Flavonoides Totales (mg EqQ/ g biomasa)
C0	1.22 ± 0.17	8.20 ± 2.16
C1	0.48 ± 0.13	10.35 ± 1.54
C2	0.59 ± 0.19	8.02 ± 1.03
C3	0.99 ± 0.14	2.25 ± 0.75
C4	1.08 ± 0.08	4.70 ± 1.02
C5	0.79 ± 0.04	7.05 ± 1.14
C6	0.91 ± 0.07	8.26 ± 2.41

La producción de biomasa baja en algunos cultivos puede deberse al estrés al que fueron sometidos los cultivos, lo que se refleja en la producción de metabolitos secundarios antioxidantes. En el estudio realizado por Hamed *et al.* 2017 utilizaron las mismas concentraciones de ZnCl₂ y obtuvieron un contenido total de flavonoides de 2.25 mg eq Q/mg de peso fresco en un cultivo adicionado con 1 mM de ZnCl₂ (18). Al comparar estos resultados con los obtenidos en este estudio, se puede observar que se obtuvo mayor contenido de flavonoides en la mayoría de los cultivos, a excepción del C3, donde se obtuvieron resultados similares. Por otro lado, en el estudio de Ansilago *et al.* 2021 reportaron 13.12 ± 1.33 mg eq Q/ g y 72.30 ± 5.28 mg eq Q/ g producidos por *C. sorokiniana* en medio comercial Sueoka (fotoautótrofo) y medio enriquecido con nitrógeno, potasio y fósforo y vinaza (mixotrófico), respectivamente (57). Los resultados obtenidos en este estudio fueron superiores, esto podría deberse principalmente a la variabilidad de concentración de los nutrientes, ya que el medio con vinaza contenía mayor concentración de nitrógeno, así como la adición de otros nutrientes y azúcares

presentes en la vinaza que enfatizaron el aumento de la producción de metabolitos secundarios, entre ellos flavonoides (57). En otro estudio, Mursandi *et al.* 2022 reportaron 31.93 ± 5.60 mg eq Q/ g de biomasa al cultivar *C. sorokiniana* en un medio de aguas residuales de tofu durante 10 días; la composición exacta del medio es desconocida ya que solo se menciona que el agua residual contiene 0.02% de nitrógeno, 0.01% de fósforo, y 0.07% de potasio (58). Se ha visto que la concentración de nitrógeno en cultivos mixotróficos y fotoautótrofos afecta la producción de metabolitos secundarios, principalmente en los cultivos mixotróficos, donde la fuente de carbono orgánico juega un papel importante en el crecimiento y desarrollo de los metabolitos aumentando la producción y acumulación de compuestos fenólicos (59,60).

El análisis cuantitativo de flavonoides indica que, aunque la producción de biomasa pudo haberse visto afectada por el estrés, las microalgas podrían haber activado mecanismos compensatorios, como la síntesis de antioxidantes. Estos resultados sugieren que, además de los flavonoides, otras moléculas antioxidantes como los carotenoides y otros polifenoles, o la activación de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, podrían haber contribuido a la defensa celular frente al estrés oxidativo (18). El aumento en la concentración de antioxidantes es consistente con la hipótesis de que, bajo condiciones de estrés, las microalgas tienden a incrementar la producción de compuestos secundarios como respuesta protectora. Sin embargo, este aumento en la producción de antioxidantes podría estar relacionado con una disminución en la producción de biomasa.

El ANOVA (anexo 1, tabla 7) reveló que, al variar las concentraciones de los compuestos en el medio, se encontraron diferencias significativas entre los cultivos a un

nivel de confianza del 95%, lo que indica que los factores experimentales tuvieron un efecto notable en los resultados.

Por lo que se decidió continuar con una prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para identificar el cultivo o cultivos que fueran diferentes (anexo 1, tabla 8), para posteriormente realizar una prueba F y una prueba t contra el control (anexo 1, tabla 9). Donde se observó que no hay diferencias significativas entre los cultivos y el control. Con base a esto, se optó por realizar la parte del escalamiento con el medio C0 (control) y las condiciones del medio C1 (0.4 mM ZnCl_2 y 0.5 mM *L*-fenilalanina), que fue en el que se observó una mayor producción de flavonoides.

5.3 Escalamiento de la producción de biomasa

Durante el escalamiento se realizó el monitoreo de los reactores, donde no se observó que llegaran a la fase estacionaria sin embargo para evitar posibles contaminaciones con el tiempo se optó por dejarlos solamente durante 25 días (figura 8). Del escalamiento se obtuvieron 0.62 ± 0.05 g/L de biomasa seca del C0 (sin suplementar) y 0.62 ± 0.02 g/L de biomasa seca del C1 (suplementado con ZnCl_2 y fenilalanina). Dicha biomasa fue liofilizada para realizar la extracción y cuantificación de flavonoides, como se describe en la metodología. Obteniendo 29.51 ± 2.29 mg EqQ/g biomasa y 36.47 ± 2.07 mg EqQ/g biomasa de los cultivos C0 y C1 respectivamente.

Al comparar los cultivos en matraz con los reactores, se observa un incremento notable en el contenido de flavonoides por gramo de biomasa, donde pasa de 8-10 mg EqQ/g biomasa a 29 y 36 mg EqQ/g biomasa. El incremento de la producción puede atribuirse a diversos factores asociados con la transferencia de masa, disponibilidad de

gases y la inducción de respuestas metabólicas asociadas al escalamiento en sistemas aireados. En particular, el uso de columnas de burbujeo modifica la dinámica gas-líquido, donde el tamaño de burbuja y la velocidad superficial del gas determinan la eficiencia de transferencia de CO_2 y O_2 . En el sistema empleado, el burbujeo tiene el rol más importante en el crecimiento de las microalgas, ya que al variar el tamaño de las burbujas que se suministra, cambia la transferencia de CO_2 para la fotosíntesis, así como la eliminación de oxígeno disuelto.

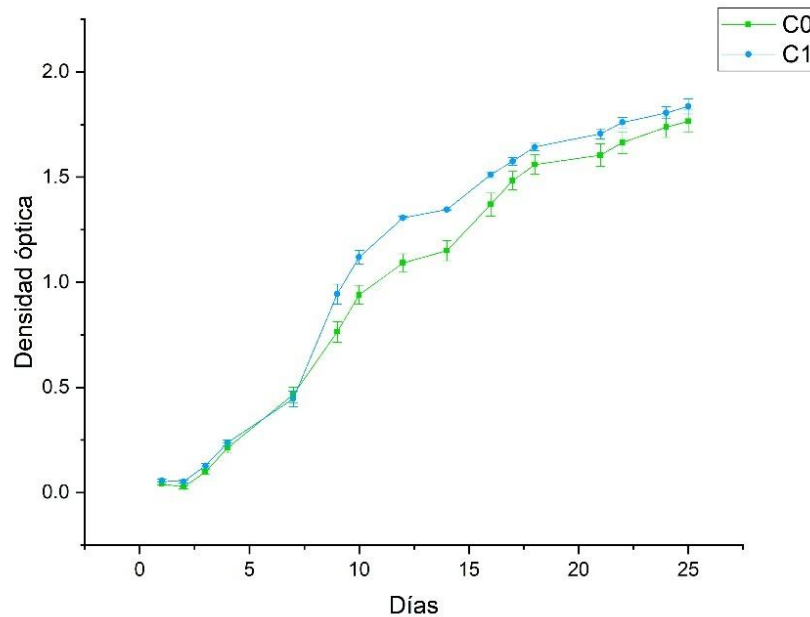


Figura 8. Curvas de crecimiento de los reactores.

En el reactor empleado se vio afectado el tamaño de la burbuja al no poder controlarse este factor. Esto produjo que las burbujas teóricamente presentaran una menor relación área superficial/volumen reduciendo la capacidad de transferencia de masa entre las fases gas-líquido (61). Otro factor que considerar es la velocidad superficial del gas, al haber un incremento en la velocidad puede provocar una disminución del coeficiente de

transferencia de masa como consecuencia de la transición hacia un burbujeo de alta densidad (61).

El aumento de disponibilidad de CO₂ favorece la fijación de carbono y la generación de intermediarios metabólicos como fosfoenolpiruvato y eritrosa 4-fosfatos, los cuales alimentan la vía del shikimato y la biosíntesis de fenilalanina (62). Este aminoácido al actuar como precursor y promover la síntesis de flavonoides, las condiciones de cultivo en el reactor pueden favorecer la producción de metabolitos secundarios (63). Además de esto, la aireación incrementa la transferencia de oxígeno, lo que puede aumentar el flujo de electrones y promover la generación ROS activando así la biosíntesis de compuestos antioxidantes, como los flavonoides (18,20).

Además, el aumento de homogeneidad del cultivo reduce gradientes de luz, nutrientes y carbono inorgánico exponiendo a las células a condiciones que favorecen la acumulación de metabolitos secundarios sobre el crecimiento celular. Este comportamiento se refleja en un desacoplamiento entre crecimiento y producción de flavonoides, ya que, aunque no hubo diferencia en la producción de biomasa entre ambos cultivos (C0 y C1), si hubo diferencia en la concentración de los compuestos. Esto puede indicar que las condiciones produjeron un estrés moderado o hubo una redistribución del carbono disponible hacia las rutas secundarias. En el cultivo suplementado (C1), la adición de fenilalanina y zinc pudo haber amplificado la respuesta metabólica. Sin embargo, los resultados sugieren que el efecto está asociado a las condiciones de cultivo en especial a la aireación.

5.4 Obtención del extracto y las fracciones

El extracto obtenido fue llevado a sequedad mediante presión reducida y se pesó, obteniendo 329.75 mg de extracto crudo del C0 y 415.45 mg del C1. Ambos extractos fueron fraccionados de acuerdo con la metodología (apartado 4.3.1), y se obtuvieron al final 8 fracciones, 4 del extracto C0 y 4 del extracto C1, los cuales fueron secados y pesados (tabla 5).

Tabla 5. Fracciones obtenidas a partir del extracto crudo

Fracción	Muestra C0 (mg)	Muestra C1 (mg)
Hexano (H)	19.6	91.68
Diclorometano (D)	32.4	147
Acetato de etilo (AE)	83.6	18
Acuosa (A)	146.2	43.5

A las fracciones se les realizaron cromatografías en capa fina, donde se observaron perfiles químicos complejos en ambos cultivos, confirmando la presencia de una amplia diversidad de compuestos con distintas polaridades.

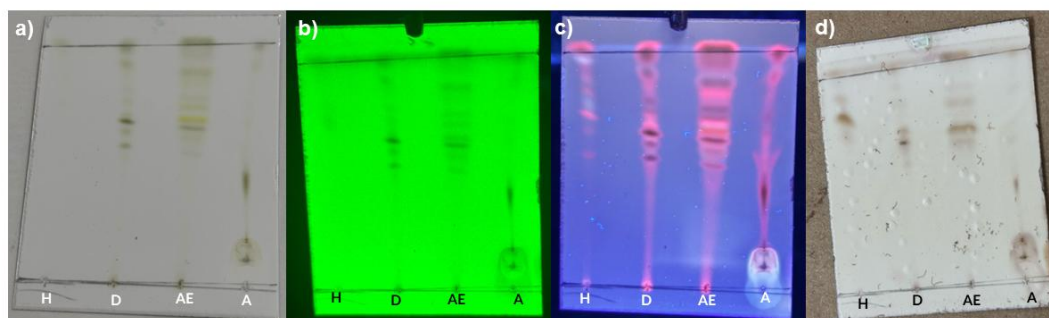


Figura 9. Cromatografía en capa fina de las fracciones C0, fase móvil diclorometano:metanol (9:1). a) sin revelar b) 254 nm, c) 365 nm, d) $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$.

Al observarse las placas a 254 y 365 nm se detectan varias manchas fluorescentes, lo cual es característico de compuestos que tienen sistemas conjugados y grupos

cromóforos, como los compuestos fenólicos y pigmentos. La revelación con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, el cual es un agente oxidante, permitió visualizar bandas de compuestos susceptibles a oxidación, reforzando la presencia de metabolitos fenólicos, los cuales son consistentes con los resultados cuantitativos de flavonoides obtenidos previamente.

Al comparar los perfiles cromatográficos de ambos cultivos se pueden observar diferencias marcadas en la distribución de compuestos según su polaridad. En las fracciones de hexano y diclorometano de la muestra C1 (figura 10) presentaron más compuestos apolares a comparación de dichas fracciones en la muestra C0 (figura 9). Este comportamiento sugiere que las condiciones del C1, tanto las propias del reactor como la suplementación, generaron un estrés oxidativo mayor pudiendo afectar la membrana celular causando una peroxidación lipídica, facilitando la extracción de compuestos apolares; también se pudo incrementar la producción o acumulación de metabolitos menos polares (64). Esto último podría suceder debido a que los flavonoides pueden sufrir modificaciones estructurales como metilación, acilación o glicosilación, alterando la polaridad de los compuestos; además de esto las microalgas pueden aumentar la producción de compuestos lipofílicos como carotenoides, terpenoides o lípidos oxidados, que también cumplen funciones protectoras frente al estrés oxidativo (65,66).

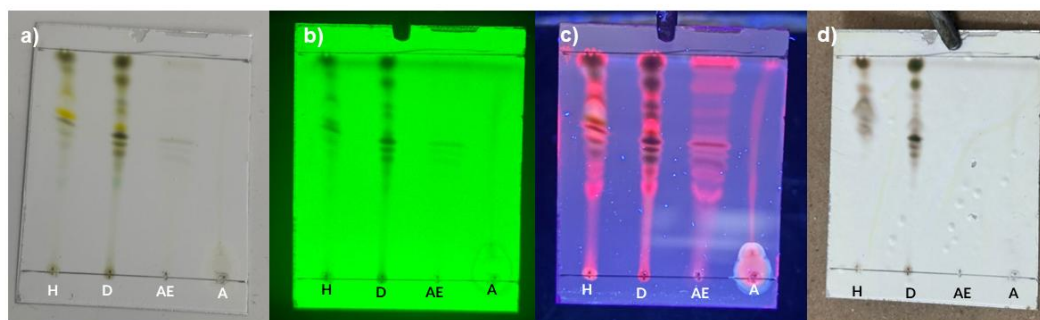


Figura 10. Cromatografía en capa fina de las fracciones C1, fase móvil diclorometano:metanol (9:1). a) sin revelar b) 254 nm, c) 365 nm, d) $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$.

Por otro lado, en la muestra C0 se observaron más compuestos polares, principalmente en la fracción de acetato de etilo (figura 9), indicando predominancia de compuestos con polaridad intermedia a alta, posiblemente asociados a flavonoides más hidroxilados o conjugados, así como otros compuestos fenólicos. Las diferencias de ambos perfiles cromatográficos nos sugieren que es la respuesta adaptativa de las microalgas en base a las condiciones de escalado, así como la suplementación con ZnCl_2 y fenilalanina.

5.5 Evaluación de actividad biológica *in vitro*

Una vez secadas y pesadas las fracciones se procedió a evaluar su actividad biológica contra la línea celular de linfoma murino L5178Y-R, la cual anteriormente se había mostrado susceptible en trabajos previos (47,48). Los resultados se muestran en la tabla 9, en los cuales se puede observar que las fracciones que obtuvieron mejores resultados fueron H0, H1, AE1 y A1, en las cuales se observó actividad arriba del 70% a 125 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo, la fracción que más destacó fue la H0, la cual siguió presentando actividad arriba del 80% hasta una concentración de 62.5 $\mu\text{g/mL}$. El resto de las fracciones solo presentó actividad en las concentraciones altas (250 y 500 $\mu\text{g/mL}$). La actividad de la mayoría de las fracciones es inferior a los controles utilizados (vincristina y quercetina) a excepción de la fracción H0, la cual muestra una actividad similar a la vincristina, esto sugiere que esta fracción contienen compuestos con potencial farmacológico.

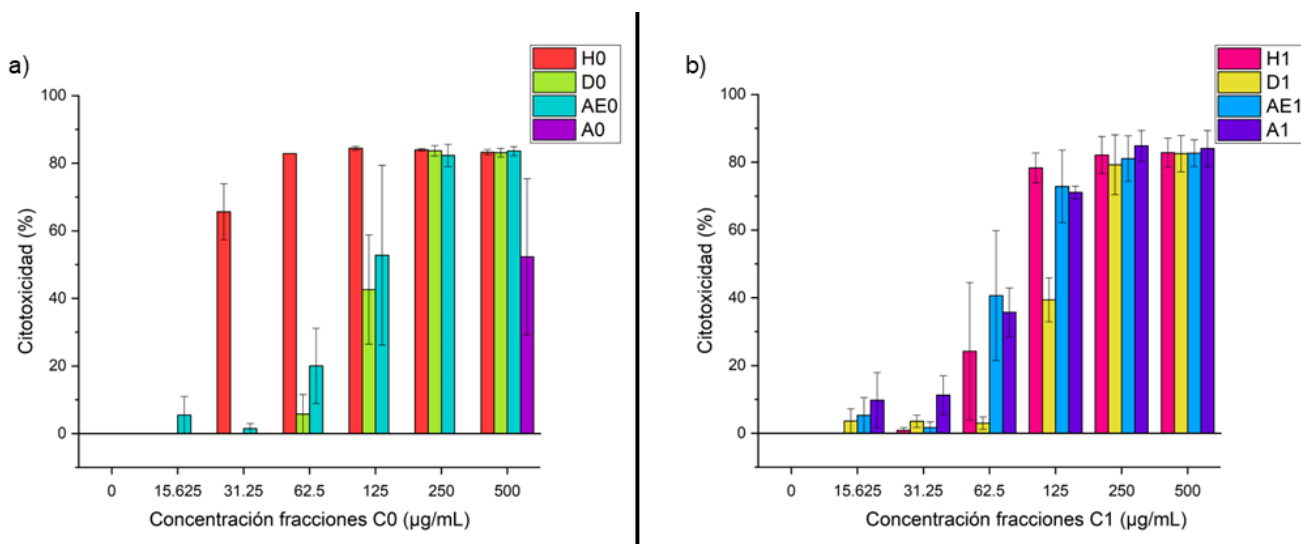


Figura 11. Resultados de ensayos de citotoxicidad. Controles utilizados: vincristina (50 µg/mL) = $78.7 \pm 4.7\%$ y quercetina (333.3 µg/mL) = $94.4 \pm 1.1\%$.

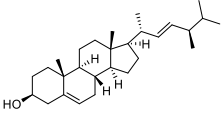
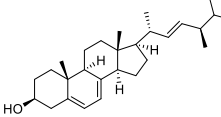
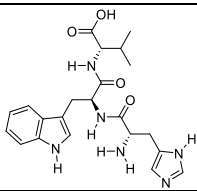
Se calcularon los valores de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) de las fracciones con mejores resultados mediante regresión sigmoideal utilizando GraphPad Prism, obteniendo los siguientes valores 22.56 µg/mL, 73.38 µg/mL, 64.14 µg/mL y 76.16 µg/mL para las fracciones H0, H1, AE1 y A1 respectivamente.

El efecto citotóxico de *C. sorokiniana* contra la línea celular L5178Y-R ha sido reportado previamente en extractos crudos. En dichos estudios se han reportado valores de IC₅₀ de 320.12 µg/mL, 460 µg/mL y 36.18 µg/mL, utilizando la misma cepa empleada en el presente trabajo (47,48,67). En comparación, los IC₅₀ obtenidos en este estudio fueron menores, lo que sugiere una mayor actividad citotóxica; a excepción de lo reportado por Domínguez Gámez (36.18 µg/mL), cuyos resultados fueron similares a los obtenidos en este trabajo (67). Es importante destacar que en los estudios previos se evaluaron extractos crudos, mientras que en el presente trabajo se evaluaron las fracciones obtenidas del extracto etanólico, lo que podría explicar la mayor actividad observada debido a una posible concentración de los compuestos bioactivos.

5.6 Identificación de la composición química

La caracterización de la fracción H0 mediante UPLC-MS indica que contiene presuntamente compuestos liposolubles, brassicasterol y ergosterol, así como hidrosolubles, His-Trp-Val; esto puede deberse a una emulsificación de la fase orgánica (hexano) y la fase acuosa al momento de realizar la separación liquido-liquido.

Tabla 6. Moléculas identificadas de la fracción H0.

I.	1	2	3	4
Estructuras 2D				-
Nombre común	Brassicasterol	Ergosterol	His-Trp-Val	-
IUPAC	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((2R,5R,E)-5,6-dimethylhept-3-en-2-yl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	(3S,9S,10R,13R,14R,17R)-17-((2R,5R,E)-5,6-dimethylhept-3-en-2-yl)-10,13-dimethyl-2,3,4,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	L-histidyl-L-tryptophyl-L-valine	-
Clase	Esterol	Esterol	Péptido	Posible glicolípido
Formula Molecular	C ₂₈ H ₄₆ O	C ₂₈ H ₄₄ O	C ₂₂ H ₂₈ N ₆ O ₄	-
Masa exacta (Da)	398.35	396.66	440.22	-
PubChem CID	5281327	444679	145456000	-
Rt (min)	1.524	1.666	6.370	0.774
m/z Experimental [M+H] ⁺	399.830	396.830	441.160	701.710
m/z Calculada [M+H] ⁺	399.35	397.66	441.22	-
Area (%)	21.503	37.294	2.784	38.418
Referencia	(68)	(69)	(70)	-

De los compuestos identificados, solo del brassicasterol y ergosterol se ha reportado actividad biológica de interés para este trabajo; mientras que del péptido His-Trp-Val no se ha reportado directamente. Se han reportado péptidos bioactivos derivados de algas, estos dependen principalmente de su secuencia, tamaño y propiedades

fisicoquímicas, además se ha reportado que la presencia de residuos hidrofóbicos, como triptófano y fenilalanina, y residuos cargados, como lisina, arginina e histidina, les permite interactuar con las membranas celulares y tener actividad biológica de relevancia (71–73). Por otro lado, el cuarto compuesto no se pudo identificar en base al espectro de masas, sin embargo, se puede deducir que podría corresponder a un glicolípido debido al alto peso molecular que presenta y el tipo de patrón de fragmentación que presenta (anexo 3, figura 16).

El brassicasterol y ergosterol pertenecen al grupo de esteroides y cumplen funciones estructurales en la membrana celular. Se ha reportado que los esteroides actúan como reguladores de la homeostasis del colesterol, anticonvulsivos, antidepresivos, hepatoprotectores e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; además de presentar actividad anticancerígena, antioxidante, y antiinflamatoria, entre otras (74).

El ergosterol presente en el extracto de *Termitomyces heimii* se le atribuyó parte importante de la actividad anticancerígena contra la línea Hep G2 (hepatocarcinoma); el extracto produjo efectos antiproliferativos induciendo alteraciones morfológicas celulares, condensación nuclear y fragmentación del ADN, al estudiar el acoplamiento molecular *in silico* del ergosterol se observó que tiene alta afinidad de unión hacia proteínas antiapoptóticas como Bcl-XL y receptores angiogénicos como VEGFR-1 y VEGFR-3 sugiriendo que el ergosterol podría favorecer la apoptosis al inhibir proteínas antiapoptóticas e inhibiendo la angiogénesis y migración celular (75). En otro estudio, se observó que el ergosterol presente en el extracto de *Ganoderma lucidum* redujo la viabilidad de las líneas MCF-7 (adenocarcinoma de mama ER+), MDA-MB-231

(adenocarcinoma de mama ER-, PR-, HER2-) y BT-474 (adenocarcinoma de mama HER2+) (76).

En el caso del brassicasterol, se ha observado que reduce la viabilidad de las células LNCaP y PC-3 (adenocarcinoma de próstata), además de suprimir la expresión del antígeno prostático específico (PSA) y los receptores de andrógenos (AR), también se observó la inducción de apoptosis evidenciada por el aumento de caspasa-3 activada y la disminución de poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), además de provocar la detención del ciclo celular en fase sub-G1, indicando la fragmentación del ADN y la apoptosis (77). Al utilizar el brassicasterol en ratas con cáncer de vejiga inducido se observó que este compuesto disminuyó la expresión de genes relacionados con el ciclo celular, particularmente ciclina D1, proteína clave en la regulación del ciclo celular que suele sobre expresarse en diferentes tipos de cáncer; así como los factores de transcripción c-fos y c-jun (componentes de AP-1) los cuales están involucrados en la proliferación celular, además se observó una reducción de ciclooxigenasa-2 (COX-2), marcador clave de la inflamación asociado a la promoción tumoral (78,79).

El brassicasterol aislado de la corteza de raíz de *Rhizophora apiculata* mostró actividad citotóxica frente a MCF-7, A549 (adenocarcinoma pulmonar) y HeLa (adenocarcinoma de cérvix) presentando los siguientes resultados de IC₅₀ 78.88, 61.77 y 79.04 µM respectivamente; además se menciona que al combinar el brassicasterol con estigmasterol; otro fitoesterol aislado con los siguientes resultados de IC₅₀ 67.95, 54.9 y 71.2 µM respectivamente; incrementa la citotoxicidad disminuyendo el IC₅₀ a 28.48, 51.62 y 34.50 µM, en las líneas MCF-7, A549 y HeLa respectivamente; sugiriendo un posible efecto sinérgico entre ambos fitoesteroles (80).

Además de la evidencia reportada sobre la actividad biológica del ergosterol y el brassicasterol, es importante interpretar estos reportes en conjunto con la actividad detectada por la fracción H0, la cual mostró un valor de IC_{50} de 22.56 $\mu\text{g/mL}$ frente a la línea L5178Y-R; esa respuesta indica una citotoxicidad relevante, sin embargo, es poco probable que pueda atribuirse exclusivamente a la presencia de estos fitoesteroles. A pesar de que ambos compuestos han demostrado actividad citotóxica en diferentes líneas celulares, los valores de IC_{50} reportados para estos compuestos individuales suelen encontrarse en rangos micromolares moderados, lo que sugiere que su potencia individual es limitada en comparación con extractos complejos.

Asimismo, los fitoesteroles son capaces de modular las propiedades fisicoquímicas de las membranas celulares, particularmente su integridad y fluidez, debido a su similitud estructural con el colesterol; esta interacción con los lípidos de membrana puede favorecer la permeabilidad celular y facilitar la entrada de otros compuestos bioactivos o potenciar efectos citotóxicos (81,82). Con base en esto, se ha propuesto que, en extractos complejos, la actividad biológica observada no es atribuible a un único metabolito, sino al efecto sinérgico derivado de la interacción entre múltiples componentes presentes en la matriz (83,84). En conjunto, estos resultados respaldan la idea de que la presencia de brassicasterol y ergosterol, junto con otros metabolitos presentes en la fracción H0, contribuyen a potenciar la actividad citotóxica observada a través de un efecto sinérgico entre los distintos componentes.

Capítulo 6. Conclusiones

La concentración más alta fue de 10.35 equivalentes de quercetina/g de biomasa seca cuando se trabajó a nivel de matraz, el cual fue obtenido en el cultivo adicionado con 0.4 mM ZnCl_2 y 0.5 mM de *L*-fenilalanina (C1). Se observó que la suplementación con ZnCl_2 y *L*-fenilalanina no generó diferencias significativas en la producción de flavonoides a nivel de matraz en comparación con el control (C0).

Al escalar, se vio aumentada la producción de flavonoides en ambos cultivos, obteniendo 36.47 ± 2.07 y 29.51 ± 2.29 mg equivalentes de quercetina/g de biomasa seca, de los cultivos C1 y C0 respectivamente. Sin embargo, los rendimientos fueron similares en cuanto a la producción de biomasa entre ambos medios utilizados.

La extracción permitió obtener 329.75 mg y 415.45 mg de extracto etanólico crudo de los cultivos C0 y C1 respectivamente; el fraccionamiento permitió obtener compuestos de distintas polaridades, con una mayor recuperación de compuestos polares en el C0 y compuestos apolares en el C1, indicando que las condiciones de cultivo influyen en el perfil metabólico.

Se evaluaron las 8 fracciones obtenidas contra la línea murina L5178Y-R, observándose actividad mayor al 80% de citotoxicidad en las concentraciones altas (250 y 500 $\mu\text{g/mL}$) a excepción de la fracción acuosa del cultivo sin estrés (A0), y destacando la fracción hexánica del cultivo sin estrés (H0) como la más activa con un IC_{50} de 22.56 $\mu\text{g/mL}$.

En la fracción H0 se identificaron 2 compuestos de interés, brassicasterol y ergosterol, los cuales se han reportado con actividad citotóxica; además de posiblemente haber presentado un efecto sinérgico en conjunto ambos compuestos.

En conjunto, los resultados indican que el aumento en la producción de flavonoides no se relaciona directamente con una mayor actividad citotóxica, y que el perfil metabólico es un factor determinante en la actividad biológica de la microalga. Por ello, se rechaza la hipótesis planteada inicialmente, ya que, aunque fue posible establecer condiciones que favorecieron la producción de flavonoides y se identificaron compuestos con potencial terapéutico, el incremento de estos metabolitos no se asoció con un aumento en la actividad citotóxica observada.

Capítulo 7. Perspectivas

Como prospectos a futuro dado que exceden los alcances de este proyecto quedan evaluar las fracciones con otras líneas celulares cancerígenas y con una línea celular sana; así como identificar los compuestos presentes en las demás fracciones que permita conocer más del metabolismo de la microalga frente a las condiciones utilizadas en este proyecto.

Capítulo 8. Referencias

1. Olasehinde TA, Olaniran AO, Okoh AI, Koulen P. Therapeutic potentials of microalgae in the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules*. MDPI AG; 2017. doi:10.3390/molecules22030480 PubMed PMID: 28335462.
2. Dolganyuk V, Belova D, Babich O, Prosekov A, Ivanova S, Katserov D, et al. Microalgae: A promising source of valuable bioproducts. *Biomolecules*. MDPI AG; 2020. p. 1–24. doi:10.3390/biom10081153 PubMed PMID: 32781745.
3. Ferdous UT, Balia Yusof ZN. Insight into potential anticancer activity of algal flavonoids: Current status and challenges. *Molecules*. MDPI; 2021. doi:10.3390/molecules26226844 PubMed PMID: 34833937.
4. Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*. MDPI AG; 2020. doi:10.3390/nu12020457 PubMed PMID: 32059369.
5. Lizzul AM, Lekuona-Amundarain A, Purton S, Campos LC. Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230. *Biology (Basel)*. el 1 de junio de 2018;7(2). doi:10.3390/biology7020025
6. Rajkumar R, Yaakob Z. The Biology of Microalgae. En: *Biotechnological Applications of Microalgae. Biodiesel and Value-Added Products*. 2019. p. 7–16.
7. Rizwan M, Mujtaba G, Memon SA, Lee K, Rashid N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier Ltd; 2018. p. 394–404. doi:10.1016/j.rser.2018.04.034
8. Sugiura M. The chloroplast genome. En: Sugiura M, editor. *Plant Molecular Biology*. Dordrecht: Springer; 1992. p. 149–68.
9. Mackinder LCM. The *Chlamydomonas* CO₂-concentrating mechanism and its potential for engineering photosynthesis in plants. *New Phytologist*. el 1 de enero de 2018;217(1):54–61. doi:10.1111/nph.14749 PubMed PMID: 28833179.
10. Borowitzka MA. Biology of microalgae. En: *Microalgae in Health and Disease Prevention*. Elsevier; 2018. p. 23–72. doi:10.1016/B978-0-12-811405-6.00003-7
11. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 2007. p. 294–306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001 PubMed PMID: 17350212.
12. Liu J, Chen F. Biology and industrial applications of *Chlorella*: Advances and prospects. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. el 1 de diciembre de 2016;153:1–35. doi:10.1007/10_2014_286 PubMed PMID: 25537445.

13. Politaeva NA, Smyatskaya YA, Dolbnya I V., Sobgaida DS. Microalgae biotechnology multiple use of *Chlorella sorokiniana*. En: Litvinenko V, editor. Advances in raw material industries for sustainable development goals. London, UK: Taylor & Francis Group; 2021. p. 252–61.
14. Ullah A, Munir S, Badshah SL, Khan N, Ghani L, Poulson BG, et al. Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules*. MDPI AG; 2020. doi:10.3390/molecules25225243 PubMed PMID: 33187049.
15. De Souza Farias SA, Da Costa KS, Martins JBL. Analysis of Conformational, Structural, Magnetic, and Electronic Properties Related to Antioxidant Activity: Revisiting Flavan, Anthocyanidin, Flavanone, Flavonol, Isoflavone, Flavone, and Flavan-3-ol. *ACS Omega*. el 6 de abril de 2021;6(13):8908–18. doi:10.1021/acsomega.0c06156
16. Safe S, Jayaraman A, Chapkin RS, Howard M, Mohankumar K, Shrestha R. Flavonoids: structure–function and mechanisms of action and opportunities for drug development. *Toxicological Research*. Springer; 2021. p. 147–62. doi:10.1007/s43188-020-00080-z
17. Liga S, Paul C, Péter F. Flavonoids: Overview of Biosynthesis, Biological Activity, and Current Extraction Techniques. *Plants*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023. doi:10.3390/plants12142732
18. Hamed SM, Zinta G, Klöck G, Asard H, Selim S, AbdElgawad H. Zinc-induced differential oxidative stress and antioxidant responses in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus acuminatus*. *Ecotoxicol Environ Saf*. el 1 de junio de 2017;140:256–63. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.02.055 PubMed PMID: 28273625.
19. López A, Rico M, Santana-Casiano JM, González AG, González-Dávila M. Phenolic profile of *Dunaliella tertiolecta* growing under high levels of copper and iron. *Environmental Science and Pollution Research*. el 1 de octubre de 2015;22(19):14820–8. doi:10.1007/s11356-015-4717-y PubMed PMID: 25989863.
20. Pikula KS, Zakharenko AM, Aruoja V, Golokhvast KS, Tsatsakis AM. Oxidative stress and its biomarkers in microalgal ecotoxicology. *Current Opinion in Toxicology*. Elsevier B.V.; 2019. p. 8–15. doi:10.1016/j.cotox.2018.12.006
21. Yadavalli R, Ratnapuram H, Motamarri S, Reddy CN, Ashokkumar V, Kuppam C. Simultaneous production of flavonoids and lipids from *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass Convers Biorefin*. el 1 de marzo de 2022;12(3):683–91. doi:10.1007/s13399-020-01044-x
22. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*. ScientificWorld Ltd.; 2013. doi:10.1155/2013/162750 PubMed PMID: 24470791.

23. Del Mondo A, Smerilli A, Ambrosino L, Albini A, Noonan DM, Sansone C, et al. Insights into phenolic compounds from microalgae: structural variety and complex beneficial activities from health to nutraceuticals. *Critical Reviews in Biotechnology*. Taylor and Francis Ltd.; 2021. p. 155–71. doi:10.1080/07388551.2021.1874284 PubMed PMID: 33530761.
24. Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry*. Elsevier Ltd; 2022. doi:10.1016/j.foodchem.2022.132531 PubMed PMID: 35413752.
25. Nabavi SM, Šamec D, Tomczyk M, Milella L, Russo D, Habtemariam S, et al. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.; 2020. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.005 PubMed PMID: 30458225.
26. Liu W, Feng Y, Yu S, Fan Z, Li X, Li J, et al. The flavonoid biosynthesis network in plants. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021. doi:10.3390/ijms222312824 PubMed PMID: 34884627.
27. Del Mondo A, Sansone C, Brunet C. Insights into the biosynthesis pathway of phenolic compounds in microalgae. *Comput Struct Biotechnol J*. el 1 de enero de 2022;20:1901–13. doi:10.1016/j.csbj.2022.04.019
28. Dowd LE. Spectrophotometric determination of quercetin. *Analytical chemistry*. 1959;31(7):1184–7. doi:10.1021/ac60151a033
29. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem*. julio de 2005;91(3):571–7. doi:10.1016/j.foodchem.2004.10.006
30. Aryal S, Baniya MK, Danekhu K, Kunwar P, Gurung R, Koirala N. Total Phenolic content, Flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from western Nepal. *Plants*. el 1 de abril de 2019;8(4). doi:10.3390/plants8040096 PubMed PMID: 30978964.
31. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. enero de 2023;73(1):17–48. doi:10.3322/caac.21763 PubMed PMID: 36633525.
32. International Agency for Research on Cancer W. Absolute numbers, Incidence, Both sexes, in 2022, Continents [Internet]. 2025. Disponible en: https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&group_populations=1&populations=903_904_905_908_909_935&multiple_populations=1
33. International Agency for Research on Cancer W. Absolute numbers, Incidence, Both sexes, in 2022, Mexico [Internet]. 2025. Disponible en:

https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&group_populations=1&populations=484

34. Klaunig JE, Wang Z. Oxidative stress in carcinogenesis. *Current Opinion in Toxicology*. Elsevier B.V.; 2018. p. 116–21. doi:10.1016/j.cotox.2017.11.014
35. Slika H, Mansour H, Wehbe N, Nasser SA, Iratni R, Nasrallah G, et al. Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson s.r.l.; 2022. doi:10.1016/j.biopha.2021.112442 PubMed PMID: 35062053.
36. Schule-Hermann R, Grasl-Kraupp B, Bursch W. Tumor development and apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 1994;105:363–7. doi:10.1159/000236784
37. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc.; 2022. p. 31–46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059 PubMed PMID: 35022204.
38. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU. Oxidative stress and its role in cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2021. p. 22–8. doi:10.4103/jcrt.JCRT_862_16 PubMed PMID: 33723127.
39. Sarmiento-Salinas FL, Perez-Gonzalez A, Acosta-Casique A, Ix-Ballote A, Diaz A, Treviño S, et al. Reactive oxygen species: Role in carcinogenesis, cancer cell signaling and tumor progression. *Life Sciences*. Elsevier Inc.; 2021. doi:10.1016/j.lfs.2021.119942 PubMed PMID: 34506835.
40. Roy A, Khan A, Ahmad I, Alghamdi S, Rajab BS, Babalghith AO, et al. Flavonoids a Bioactive Compound from Medicinal Plants and Its Therapeutic Applications. *BioMed Research International*. Hindawi Limited; 2022. doi:10.1155/2022/5445291 PubMed PMID: 35707379.
41. Hernández-Rodríguez P, Pabón Baquero L, Rodríguez Larrota H. Flavonoids: potential therapeutic agents by their antioxidant capacity. En: *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications*. Elsevier; 2019. p. 265–88. doi:10.1016/B978-0-12-814774-0.00014-1
42. Beer JZ, Budzicka E, Niepokojczycka E, Rosiek O, Szumiel I, Walicka M. Loss of Tumorigenicity with Simultaneous Changes in Radiosensitivity and Photosensitivity during in Vitro Growth of L5178Y Murine Lymphoma Cells1. *CANCER RESEARCH*. 1983.
43. Szumiel I. From radioresistance to radiosensitivity: In vitro evolution of L5178Y lymphoma. *Int J Radiat Biol*. el 1 de junio de 2015;91(6):465–71. doi:10.3109/09553002.2014.996263 PubMed PMID: 25651039.

44. Jacobson ED, Krell K, Olempska-Beer Z, Beer JZ. UV-induced mutagenesis at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus in two L5178Y mouse lymphoma cell strains with different UV sensitivities. *Mutation Research*. 1984.
45. ATCC. L5178-R (LY-R) CRL-1722 TM [Internet]. Disponible en: www.atcc.org
46. Saad MG, Abdu M, Shafik HM, Marwa C, Saad G. Phytochemical screening and antimicrobial activities of some green algae from Egypt. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 2019;7(3):12–6.
47. Fernández Valenzuela SO. Producción y caracterización de biocompuestos con actividad antitumoral producidos por la microalga *Chlorella sorokiniana*. 2022.
48. Reyna-Martinez R, Gomez-Flores R, López-Chuken U, Quintanilla-Licea R, Caballero-Hernandez D, Rodríguez-Padilla C, et al. Antitumor activity of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus* sp. microalgae native of Nuevo León State, México. *PeerJ*. 2018;2018(2). doi:10.7717/peerj.4358
49. Ferdous UT, Nurdin A, Ismail S, Shaari K, Balia Yusof ZN. A comparative study on antioxidant properties, total phenolics, total flavonoid contents, and cytotoxic properties of marine green microalgae and diatoms. *Journal of genetic engineering and biotechnology*. marzo de 2025;23. doi:10.1016/j.geb.2024.100456
50. López-Chuken UJ, Young SD, Guzmán-Mar JL. Evaluating a “biotic ligand model” applied to chloride-enhanced Cd uptake by *Brassica juncea* from nutrient solution at constant Cd²⁺ activity. *Environ Technol*. 2010;31(3):307–18. doi:10.1080/09593330903470685 PubMed PMID: 20426272.
51. Monteiro M, Santos RA, Iglesias P, Couto A, Serra CR, Gouveias I, et al. Effect of extraction method and solvent system on the phenolic content and antioxidant activity of selected macro- and microalgae extracts. *J Appl Phycol*. el 1 de febrero de 2020;32(1):349–62. doi:10.1007/s10811-019-01927-1
52. Cantú Martínez MS. Producción de microcelulosa y nanocelulosa cristalina mediante la utilización de la microalga *Chlorella sorokiniana* aislada en Nuevo León, México. agosto de 2023.
53. Lima LD, Reis ACC, Sousa JAC, Valente GM, de Mello Silva B, Magalhães CL de B, et al. Anti-Zika Virus Activity and Isolation of Flavonoids from Ethanol Extracts of *Curatella americana* L. Leaves. *Molecules*. el 1 de marzo de 2023;28(6). doi:10.3390/molecules28062546 PubMed PMID: 36985517.
54. Reyna-Martinez R. Aislamiento de microalgas del estado de Nuevo León con actividad antitumoral contra el linfoma murino L5178Y-R.
55. van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. En. 2011. p. 237–45. Disponible en: https://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-080-5_20 doi:10.1007/978-1-61779-080-5_20

56. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int J Mol Sci.* el 1 de diciembre de 2021;22(23). doi:10.3390/ijms222312827 PubMed PMID: 34884632.
57. Ansilago M, Ramos MM, Mussury RM, Carvalho EM de. Enhancing secondary metabolite production by *Chlorella sorokiniana* using an alternative medium with vinasse. *Research, Society and Development.* el 14 de mayo de 2021;10(5):e49710515237. doi:10.33448/rsd-v10i5.15237
58. Mursandi H, Susanty D, Nurhayati L, Oksari AA. Short Communication: Antioxidant activity of ethanol extract of *Chlorella sorokiniana* cultured in tofu wastewater. *Nusantara Bioscience.* el 18 de julio de 2022;14(2). doi:10.13057/nusbiosci/n140204
59. Yun HS, Kim YS, Yoon HS. Effect of Different Cultivation Modes (Photoautotrophic, Mixotrophic, and Heterotrophic) on the Growth of *Chlorella* sp. and Biocompositions. *Front Bioeng Biotechnol.* el 17 de diciembre de 2021;9. doi:10.3389/fbioe.2021.774143
60. Aremu AO, Neményi M, Stirk WA, Ördög V, van Staden J. Manipulation of nitrogen levels and mode of cultivation are viable methods to improve the lipid, fatty acids, phytochemical content, and bioactivities in *Chlorella minutissima*. *J Phycol.* el 1 de agosto de 2015;51(4):659–69. doi:10.1111/jpy.12308
61. Luna-Brito MJ, Sacramento-Rivero JC, Baz-Rodríguez SA. Effects of Medium Composition and Gas Superficial Velocity on Mass Transfer during Microalgae Culturing in a Bubble Column Photobioreactor. *Ind Eng Chem Res.* el 19 de diciembre de 2018;57(50):17058–63. doi:10.1021/acs.iecr.8b03940
62. Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A. *Plant Physiology and Development.* 6a ed. 2015.
63. Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant.* Oxford University Press; 2010. p. 2–20. doi:10.1093/mp/ssp106 PubMed PMID: 20035037.
64. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology.* 2004. p. 373–99. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701 PubMed PMID: 15377225.
65. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep.* 2009;26(8):1001–43. doi:10.1039/b802662a PubMed PMID: 19636448.
66. Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant Journal.* 2008. p. 621–39. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x PubMed PMID: 18476868.

67. Domínguez Gámez M. Caracterización del efecto biológico de compuestos bioactivos de *Chlorella sorokiniana* cultivada en nejayote. 2025.
68. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5281327, Brassicasterol [Internet]. 2026 [citado el 2 de abril de 2026]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281327#section=Classification>
69. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 444679, Ergosterol [Internet]. 2026 [citado el 2 de abril de 2026]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/444679>
70. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 145456000, His-Trp-Val. [Internet]. 2026 [citado el 2 de abril de 2026]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/His-Trp-Val>
71. Zhang Y, Wang C, Zhang W, Li X. Bioactive peptides for anticancer therapies. *Biomaterials Translational*. Chinese Medical Multimedia Press Co Ltd; 2023. p. 5–17. doi:10.12336/biomatertransl.2023.01.003 PubMed PMID: 37206303.
72. Admassu H, Gasmalla MAA, Yang R, Zhao W. Bioactive Peptides Derived from Seaweed Protein and Their Health Benefits: Antihypertensive, Antioxidant, and Antidiabetic Properties. *Journal of Food Science*. Blackwell Publishing Inc.; 2018. p. 6–16. doi:10.1111/1750-3841.14011 PubMed PMID: 29227526.
73. Ma X, Wang Q, Ren K, Xu T, Zhang Z, Xu M, et al. A Review of Antimicrobial Peptides: Structure, Mechanism of Action, and Molecular Optimization Strategies. *Fermentation*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024. doi:10.3390/fermentation10110540
74. Sohn SI, Rathinapriya P, Balaji S, Balan DJ, Swetha TK, Durgadevi R, et al. Phytosterols in seaweeds: An overview on biosynthesis to biomedical applications. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021. doi:10.3390/ijms222312691 PubMed PMID: 34884496.
75. Ray R, Saha S, Paul S. Two novel compounds, ergosterol and ergosta-5,8-dien-3-ol, from *Termitomyces heimii* Natarajan demonstrate promising anti-hepatocarcinoma activity. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*. el 1 de octubre de 2022;9(4):443–53. doi:10.1016/j.jtcms.2022.09.006
76. Martínez-Montemayor MM, Ling T, Suárez-Arroyo IJ, Ortiz-Soto G, Santiago-Negrón CL, Lacourt-Ventura MY, et al. Identification of biologically active *ganoderma lucidum* compounds and synthesis of improved derivatives that confer anti-cancer activities in vitro. *Front Pharmacol*. 2019;10(FEB). doi:10.3389/fphar.2019.00115
77. Xu Y, Ryu S, Lee YK, Lee HJ. Brassicasterol from edible aquacultural *Hippocampus abdominalis* exerts an anti-cancer effect by dual-targeting AKT and

AR signaling in prostate cancer. *Biomedicines*. el 1 de septiembre de 2020;8(9). doi:10.3390/BIOMEDICINES8090370

78. Sanchez Y, Elledge SJ, results unpublished, Weinert thank T, Murray A, Carr A, et al. *Cancer Cell Cycles*. *Curr. Opin. Cell Biol* [Internet]. 1995. Disponible en: www.sciencemag.org
79. Ikarashi N, Ono T, Hoshino M, Toda T, Yazawa Y, Sugiyama K. Mechanistic analysis of bladder cancer suppression by brassicasterol in a rat model of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder cancer. *Traditional and Kampo Medicine*. el 1 de agosto de 2021;8(2):163–9. doi:10.1002/tkm2.1289
80. Kurniawan R, Azis S, Maulana S, Ashari A, Prasetyo BA, Suhartati T, et al. The cytotoxicity studies of phytosterol discovered from *Rhizophora apiculata* against three human cancer cell lines. *J Appl Pharm Sci*. el 1 de enero de 2023;13(1):156–62. doi:10.7324/JAPS.2023.130115
81. Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses § [Internet]. Disponible en: www.elsevier.com/locate/plipres
82. Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM. Review Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition.
83. Wagner H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*. 2011. p. 34–7. doi:10.1016/j.fitote.2010.11.016 PubMed PMID: 21075177.
84. Caesar LK, Cech NB. Synergy and antagonism in natural product extracts: When 1 + 1 does not equal 2. *Natural Product Reports*. Royal Society of Chemistry; 2019. p. 869–88. doi:10.1039/c9np00011a PubMed PMID: 31187844.

Anexos

Anexo 1. Tablas de análisis estadísticos.

Tabla 7. Análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
<i>Entre grupos</i>	132.822	5.000	26.564	4.362	0.017	3.106
<i>Dentro de los grupos</i>	73.077	12.000	6.090			
<i>Total</i>	205.899	17.000				

Tabla 8. Prueba de diferencia mínima significativa

	Diferencia absoluta	Diferencias<LSD
<i>A-B</i>	2.33	VERDADERO
<i>A-C</i>	8.09	FALSO
<i>A-D</i>	6.28	FALSO
<i>A-E</i>	3.30	FALSO
<i>A-F</i>	2.08	VERDADERO
<i>B-C</i>	5.76	FALSO
<i>B-D</i>	3.95	FALSO
<i>B-E</i>	0.97	VERDADERO
<i>B-F</i>	0.25	VERDADERO
<i>C-D</i>	1.82	VERDADERO
<i>C-E</i>	4.79	FALSO
<i>C-F</i>	6.01	FALSO
<i>D-E</i>	2.98	FALSO
<i>D-F</i>	4.19	FALSO
<i>E-F</i>	1.22	VERDADERO

Tabla 9. Pruebas F y t contra control

	Cultivo 2	Cultivo 5	Cultivo 6
<i>Prueba F*</i>	4.42	3.57	0.80
<i>Prueba t**</i>	0.08	0.47	-0.02

*F critica: 39. **t critica: 2.78

Anexo 2.

Tabla 10. Resultados de ensayos de citotoxicidad

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	H0	D0	AE0	A0	H1	D1	AE1	A1
	(% citotoxicidad)*							
0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
15.625	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	5.5 ± 5.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.6 ± 3.6	5.3 ± 5.3	9.8 ± 32.9
31.25	65.7 ± 8.3	0.0 ± 0.0	1.5 ± 1.5	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.8	3.5 ± 1.8	1.7 ± 1.7	11.3 ± 6.4
62.5	82.9 ± 0.1	5.8 ± 5.8	20.0 ± 11.1	0.0 ± 0.0	24.2 ± 20.3	3.0 ± 1.8	40.6 ± 19.2	35.7 ± 7.2
125	84.4 ± 0.6	42.6 ± 16.2	52.8 ± 26.6	0.0 ± 0.0	78.3 ± 4.4	39.4 ± 6.5	72.9 ± 10.7	71.1 ± 1.8
250	84.0 ± 0.3	83.7 ± 1.5	82.3 ± 3.3	0.0 ± 0.0	82.1 ± 5.5	79.3 ± 8.8	81.1 ± 6.7	84.9 ± 4.5
500	83.3 ± 0.8	83.1 ± 1.3	83.6 ± 1.3	52.3 ± 23.1	82.8 ± 4.3	82.5 ± 5.4	82.7 ± 3.9	84.0 ± 5.3

Vincristina ($50 \mu\text{g/mL}$) = $78.7 \pm 4.7 \%$

Quercetina ($333.3 \mu\text{g/mL}$) = $94.4 \pm 1.1\%$

*Los valores se expresan como media $\pm$ error estándar de la media ($n = 3$).

Anexo 3. Cromatograma y espectros de masas.

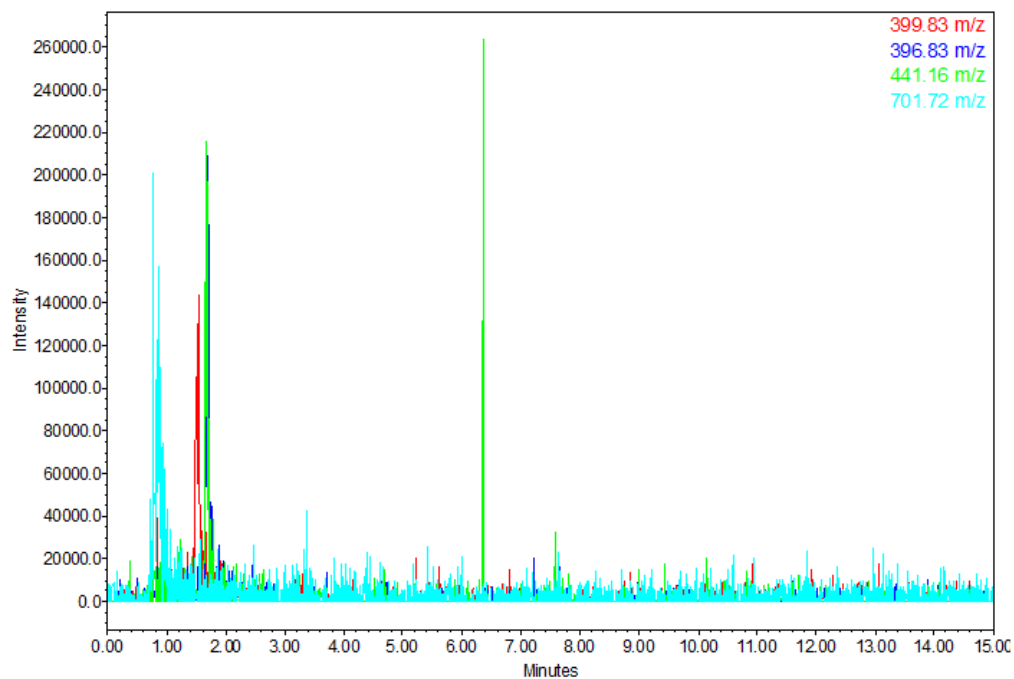


Figura 12. Cromatograma de la fracción H0.

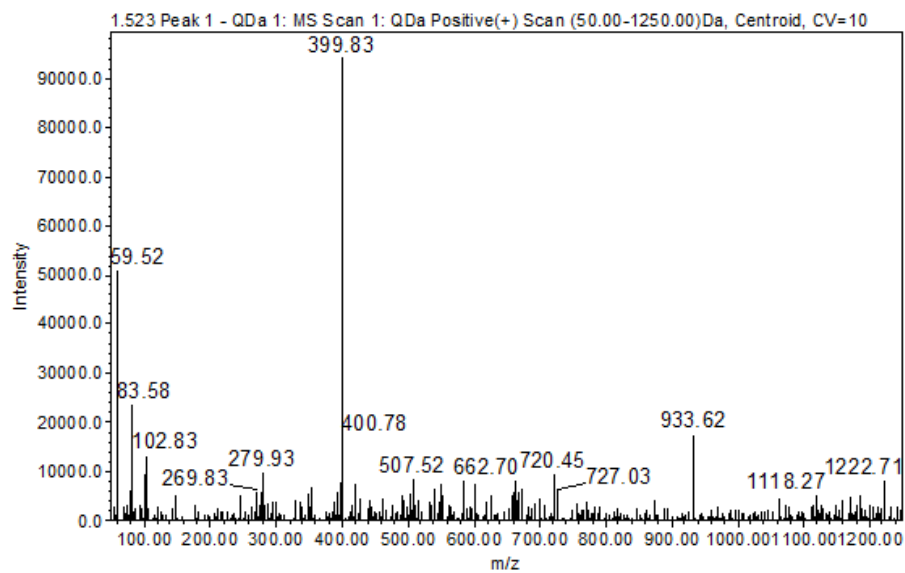


Figura 13. Espectro de masas del compuesto 1 de la fracción H0.

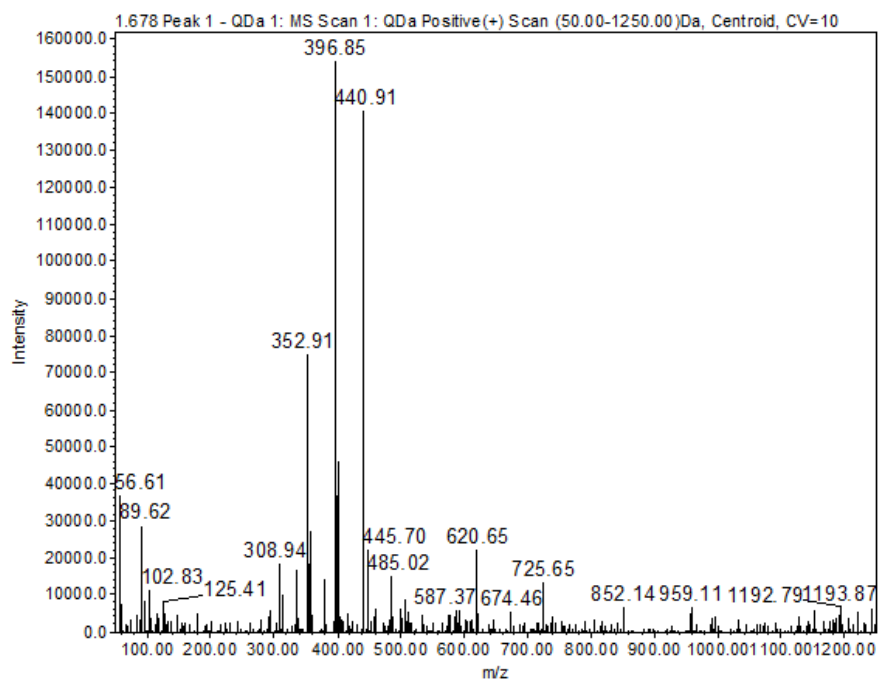


Figura 14. Espectro de masas del compuesto 2 de la fracción H0.

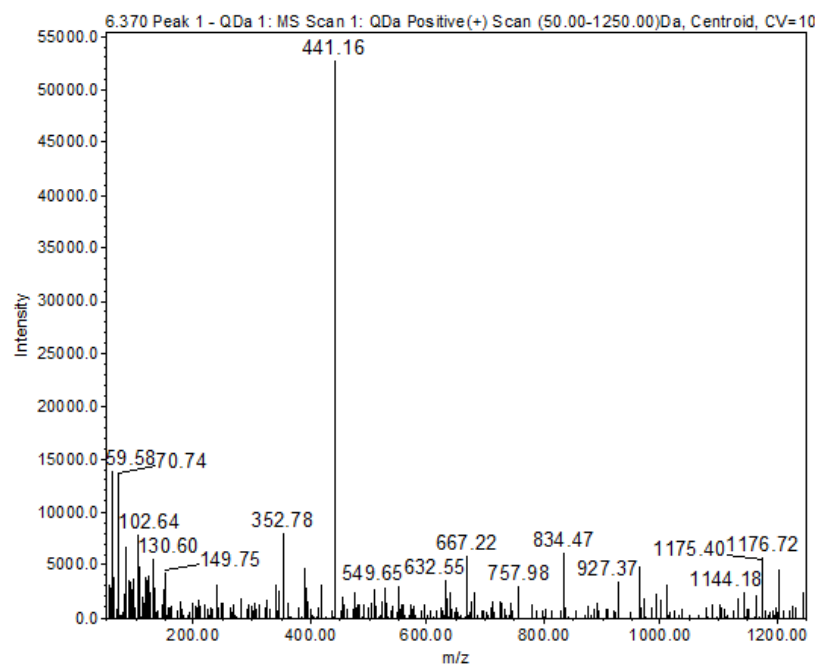


Figura 15. Espectro de masas del compuesto 3 de la fracción H0.

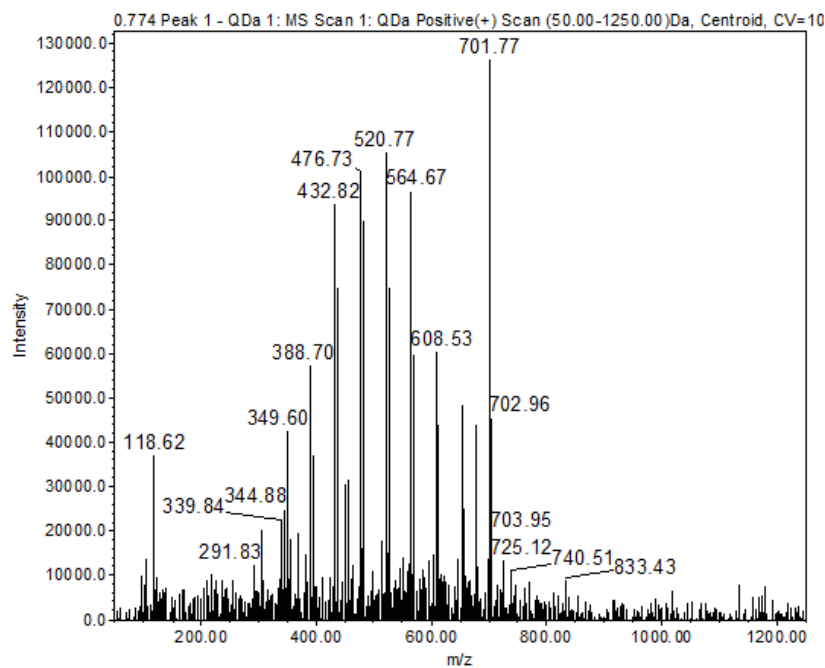


Figura 16. Espectro de masas del compuesto 4 de la fracción H0.