



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**CARACTERÍSTICAS MACROMOLECULARES Y
PROPIEDADES BIOACTIVAS DE POLISACÁRIDOS
SULFATADOS DE *Chaetoceros muelleri***

Por:

Valeria Miranda Arizmendi

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Valeria Miranda Arizmendi, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Elizabeth Carvajal Millán
Directora de Tesis



Dra. Diana Fimbres Olivarria
Integrante del comité de tesis



Dr. Agustín Rascón Chu
Integrante del comité de tesis



Dr. Jaime Lizardi Mendoza
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Características Macromoleculares y Propiedades Bioactivas de Polisacáridos Sulfatados de *Chaetoceros muelleri*” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Valeria Miranda Arizmendi, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD. A.C.) y a su coordinación por brindarme las herramientas y la disposición que permitieron la realización de mis estudios de maestría y tesis.

Al proyecto CONACYT "Estudio de las características macromoleculares y las propiedades gelificantes y bioactivas de los polisacáridos sulfatados de algas marinas" (FOP16-2021-01) clave 000000000319684, que proporcionó los recursos necesarios para la realización de esta investigación.

A mi directora de tesis, la Dra. Elizabeth Carvajal Millán por recibirme como estudiante y transmitirme el conocimiento para crecer tanto académica como personalmente. Por su gran dedicación, apoyo y paciencia que me ayudaron a encontrar soluciones para cada imprevisto que puedo presentarse y me motivaron a sacar el mayor provecho de cada experiencia.

A los miembros de mi comité de tesis, la Dra. Diana Fimbres Olivarria, Dr. Agustín Rascón Chu, Dr. Jaime Lizardi Mendoza y la M.C. Karla Martínez Robinson. Por su dedicación para que todo saliera en tiempo y forma. Gracias por orientarme, compartirme sus conocimientos y su pasión por la ciencia.

A mis compañeros de laboratorio por hacer esta experiencia tan provechosa y a la vez divertida.

A mis amigos y a los que acompañaron en el camino, por su cariño y sus palabras de ánimo.

A mis padres por su apoyo incondicional, por darme el valor y el impulso para seguir superándome, por darme las herramientas para alcanzar mis metas y motivarme a dar lo mejor de mí.

A mi hermana Pau por siempre estar, por su apoyo emocional y por alegrarme el día con sus ocurrencias.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
CONTENIDO	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE CUADROS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES	13
2.1. Compuestos Bioactivos de Origen Marino.....	13
2.2. Compuestos Estructurales y Bioactivos en Microalgas.....	14
2.3. Ficoloides y Polisacáridos Sulfatados de Algas	14
2.4. Polisacáridos de Microalgas	16
2.5. Diatomeas y sus Polisacáridos.....	17
2.5.1. Características Biológicas y Clasificación Taxonómica de <i>Chaetoceros muelleri</i> ..	21
3. HIPOTESIS	23
4. OBJETIVOS	24
4.1. Objetivo General	24
4.2. Objetivos Específicos	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 Cultivo de Microalgas y Extracción de Polisacáridos	25
5.2. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	25
5.3. Microestructura y Composición Elemental	26
5.4. Características Macromoleculares	26
5.5. Análisis Químico	27
5.6. Citotoxicidad	27
5.6.1. Cultivo celular.....	27
5.6.2. Determinación de la Proliferación Celular	27
5.7. Capacidad Antioxidante	28
5.8. Índice Glucémico.....	28
5.9 Análisis Estadístico	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1. Cultivo Celular de <i>C. muelleri</i>	30
6.2 Extracción y Análisis Químico de Polisacáridos de <i>C. muelleri</i>	31
6.3. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier	32

CONTENIDO (continuación)

6.4. Microestructura y Composición Elemental	33
6.5. Características Macromoleculares	36
6.6. Citotoxicidad	37
6.7. Capacidad Antioxidante	38
6.8. Índice Glucémico (IG).....	40
7. CONCLUSIONES	42
8. RECOMENDACIONES	43
9. REFERENCIAS	44

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina
1 Modelo conceptual de los diferentes polisacáridos presentes en diatomeas bentónicas. Modificado de Shniukova y Zolotareva, (2015). EPS=exopolisacáridos	18
2 (a) Esquema de una frústula de sílice de diatomeas. (b) Secciones transversales esquemáticas de frústulas de sílice de diatomeas durante una división celular. Tomada de Alipour <i>et al.</i> , (2015)	19
3 Micrografía de <i>C. muelleri</i> , donde señala; 1) las frústulas ligeramente silificadas, 2) celdas contiguas por setas retorcidas, 3) presencia de rimoportula, esporas endógenas en reposo producidas. Tomada de: diatoms.org Tomada de: diatoms.org (Burge y Edlund, 2017)	22
4 Curva de crecimiento de la microalga <i>C. muelleri</i>	31
5 Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) de PSCM. Las flechas indican las principales bandas de absorción	33
6 Microscopía electrónica de barrido (SEM) a 500x (a) y 1000x (b) y análisis de espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDS) (c) de PSCM	35
7 Efecto de PSCM a distintas concentraciones en la proliferación de células sanas de colon CCD 841 CoN en relación con el tratamiento control.....	38
8 Actividad antioxidante de PSCM y su comparación con el valor registrado en vitamina C bajo las condiciones de estudio utilizadas	40
9 Índice glucémico en ratas Wistar determinado a partir de la administración por sonda oral de 1 ml de solución de glucosa o PSCM a 25 mg/mL	41

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Pagina
1 Composición de los polisacáridos extraídos <i>C. muelleri</i>	32
2 Características macromoleculares de PSCM	37
3 Grado de sulfatación y potencial Z de PSCM	37

RESUMEN

Las algas son consideradas una fuente valiosa de polisacáridos con propiedades bioactivas importantes, dado que aportan beneficios a la salud humana como antitumorales, antioxidantes y antivirales, entre otras. *Chaetoceros muelleri* es una diatomea planctónica cosmopolita presente en el Mar de Cortez, su biomasa es de gran importancia en acuicultura, ya que es fuente de productos de alto valor. Existen diversos estudios sobre los polisacáridos de macroalgas, sin embargo, la información sobre polisacáridos de microalgas es escasa. El objetivo de esta investigación es generar conocimiento sobre las características macromoleculares y las propiedades bioactivas de los polisacáridos sulfatados de *Chaetoceros muelleri* (PSCM). Para ello, se cultivó esta diatomea bajo condiciones controladas de laboratorio. A partir de la biomasa obtenida se realizó la extracción de PSCM, obteniendo un rendimiento de 2.2 % (p/p de biomasa seca). Los PSCM fueron analizados por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier presentando algunas bandas relacionadas con este tipo de polisacáridos en un rango de 3405 cm^{-1} a 590 cm^{-1} y un grado de sustitución con sulfato de 0.1. La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector dinámico de dispersión de luz registró un valor de peso molecular (Mw), índice de polidispersidad (PDI), viscosidad intrínseca $[\eta]$ y radio hidrodinámico (Rh) de 4.13 kDa, 2.0, 4.68 mL/g y 1.3 nm, respectivamente para PSCM. Estos polisacáridos no presentaron citotoxicidad en células sanas de colon CCD 841. La actividad antioxidante y el índice glicémico de los PSCM fue de 23% y 49, respectivamente.

Palabras clave: Microalgas, Diatomeas, Polisacáridos sulfatados, Bioactividad

ABSTRACT

Algae are considered a valuable source of polysaccharides with important bioactive properties, since they provide benefits to human health such as antitumor, antioxidant and antiviral, among others. *Chaetoceros muelleri* is a cosmopolitan planktonic diatom present in the Sea of Cortez, its biomass is of great importance in aquaculture since it's a source of high-value products. There are several studies on polysaccharides from macroalgae; however, information on polysaccharides from microalgae is limited. The objective of this research is to generate knowledge about the macromolecular characteristics and bioactive properties of polysaccharides (PSCM) from *Chaetoceros muelleri*. Accordingly, this diatom was cultivated under controlled laboratory conditions. PSCM extraction was carried out from the biomass obtained, obtaining a yield of 2.2% (w/w of dry biomass). The PSCM were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy showing some bands in a range from 3405 cm^{-1} to 590 cm^{-1} and a sulphate substitution degree of 0.1. High-performance liquid chromatography coupled to a dynamic light scattering detector yielded molecular weight (Mw), polydispersity index (PDI), intrinsic viscosity $[\eta]$, and hydrodynamic radius (Rh) values of 4.13 kDa, 2.0, 4.68 mL/g and 1.3 nm, respectively for PSCM. This polysaccharide did not presented cytotoxicity in CCD 841 colon cells. The antioxidant activity and glycemic index of PSCM was 23% and 49, respectively.

Keywords: Microalgae, Diatoms, Sulfated polysaccharides, Bioactivity

1. INTRODUCCIÓN

Se estima que la explotación de los recursos oceánicos alcanzará una escala industrial de 3 billones de dólares estadounidenses para el año 2030 (OECD, 2016). Mientras que los océanos cubren más del 71 % de la superficie terrestre, más del 80 % del océano no ha sido explorado. Considerando que el océano cubre la mayoría de la superficie terrestre, el conocimiento y la utilización de organismos como las algas a un nivel industrial sigue en los primeros pasos. La búsqueda de conocimiento sobre las algas da lugar al desarrollo de una industria basada en materiales extraídos a partir de estos organismos con un potencial sin explotar (Beaumont *et al.*, 2021).

Los ficocoloides son polisacáridos asociados a la pared celular y los espacios intercelulares de las algas marinas y son valiosos ingredientes que se han utilizado ampliamente en preparaciones industriales. Las carrageninas y el agar son los principales polisacáridos sulfatados empleados en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, papelera y textil como agentes espesantes, estabilizadores, emulsionantes y gelificantes (Glicksman, 1987). Para comprender mejor las diferentes aplicaciones potenciales de los polisacáridos se debe tomar en cuenta su estructura, características fisicoquímicas y propiedades reológicas, dado que estos parámetros determinan sus propiedades funcionales (Geresh *et al.*, 2002). Por lo tanto, investigar esta relación estructura-función en polisacáridos de fuentes inexploradas como aquéllos presentes en algunas microalgas puede representar el punto de partida en el desarrollo de nuevos biomateriales.

Los polisacáridos son polímeros de monosacáridos que constan de al menos 10 monosacáridos unidos mediante enlaces glucosídicos que pertenecen a una clase de macromoléculas cruciales para el crecimiento y desarrollo de múltiples organismos (Yi *et al.*, 2020). Las estructuras de los polisacáridos son complejas y diversas, sin embargo, las estructuras básicas de su cadena principal son a menudo glucano, fucano, xilano, manano, galactano, etc. (Shi, 2016). La concentración de polisacáridos totales en las distintas especies de algas oscila entre el 4 y el 76% del peso seco (Kraan, 2012).

Las algas son consideradas como una fuente valiosa de polisacáridos con propiedades bioactivas dado que aportan beneficios a la salud humana como antitumorales, anticoagulantes, antivirales, entre otras (Wijesekara *et al.*, 2011). Por ejemplo, la actividad antioxidante de la carragenina se ha

determinado mediante varios métodos y adicionalmente se ha observado cómo aquellas con pesos moleculares más bajos tienen una mayor actividad antioxidante (Sun *et al.*, 2010). Así mismo, se ha reportado que los polisacáridos sulfatados presentan distintos tipos de bioactividad (Khan *et al.*, 2019) que podrían estar relacionados con las diferencias de componentes químicos y estructura. Sin embargo, la citotoxicidad de polisacáridos extraídos de microalgas ha sido evaluada en pocas líneas celulares y es necesario realizar investigación adicional al respecto.

Existen diversos estudios sobre la obtención y aprovechamiento de polisacáridos de origen marino y en ellos se menciona el potencial de los polisacáridos sulfatados presentes en las macroalgas. Sin embargo, la información sobre polisacáridos sulfatados de las microalgas es escasa. Por lo tanto, la presente investigación pretende generar conocimiento acerca de las características macromoleculares y las propiedades bioactivas de los polisacáridos sulfatados extraídos de la microalga *Chaetoceros muelleri*, microalga cosmopolita que se encuentra en el Golfo de California.

2. ANTECEDENTES

2.1. Compuestos Bioactivos de Origen Marino

El incremento en la búsqueda de sustancias novedosas para el tratamiento de enfermedades como cáncer, infecciones microbianas y procesos inflamatorios ha motivado la exploración de sus compuestos bioactivos (Lordan *et al.*, 2011). El descubrimiento de nuevos materiales bioactivos es un trabajo que requiere de múltiples disciplinas. Uno de los primeros pasos de esta tarea es lograr la identificación de un compuesto con potencial o características que puedan ser modificadas químicamente para incrementar actividad, mejorar su metabolismo o perfil farmacocinético. Dentro de las fuentes para el descubrimiento de nuevos productos naturales se encuentran los organismos terrestres como plantas y hongos, los microbios y organismos de origen marino que cuentan con compuestos estructuralmente diversos y biológicamente activos. En bases de datos recientemente publicadas sobre compuestos producidos por plantas, bacterias y organismos marinos se ha estimado que existen en la literatura aproximadamente 45,000 compuestos naturales, de los cuales la mayoría son de origen vegetal. Sin embargo, en el medio marino se encuentran la mayoría de los productos naturales bioactivos, aunque todavía hay una gran parte sin explorar (Ntie-Kang y Svozil, 2020).

El océano se puede considerar como la fuente de recursos naturales más rica en el planeta. Gracias a su gran diversidad de organismos y las condiciones a las que se ven sometidos, en ocasiones son extremas, del mar se pueden extraer numerosas sustancias biológicamente activas (Hamed *et al.*, 2015). Los organismos marinos se consideran el mejor reservorio potencial de tales compuestos bioactivos. Se han reportado múltiples compuestos marinos como péptidos aislados de peces y polisacáridos aislados de algas que presentan actividades anticancerígenas, anticoagulantes, antioxidantes, entre otras (Lordan *et al.*, 2011).

2.2 Compuestos Bioactivos en Algas

Entre la gran variedad de vida marina, aproximadamente el 90% de las especies de flora marina son algas y son las responsables de alrededor del 50% de la fotosíntesis global (John, 1994). Según estadísticas reportadas por Brasil *et al.* (2017) se producen aproximadamente 7000 toneladas de biomasa de algas secas anualmente en todo el mundo y el mercado mundial de esta biomasa tiene un valor entre 3.8 y 5.4 mil millones de dólares. Estos valores demuestran la popularidad que las microalgas están ganando en el mundo y el potencial de utilizarlas e incorporarlas en una amplia variedad de productos industriales. Entre las características que poseen las microalgas que permiten ser aprovechadas ampliamente es la tasa de crecimiento rápido, los requisitos de cultivos simple y la capacidad de sobrevivir en condiciones difíciles o al ser sometidas a estrés (Tang *et al.*, 2020). Varios estudios científicos han demostrado el gran potencial de las algas como materia prima y fuente de diversos recursos biológicos valiosos. Los cuales incluyen inhibidores de enzimas, florotaninos, polisacáridos, lípidos, péptidos bioactivos, alcaloides, terpenoides halogenados y pigmentos (Rengasamy *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2020). En revisiones por Rengasamy *et al.* (2020) compilaron estudios de compuestos bioactivos aislados de algas marinas y su papel en el tratamiento de múltiples enfermedades como cáncer, diabetes, inflamación y demencia.

2.3. Ficocoloides y Polisacáridos Sulfatados de Algas

Los polisacáridos son biopolímeros que consisten en largas cadenas formadas por unidades de monosacáridos. La gran variabilidad estructural que presentan se debe a la cantidad de azúcares simples disponibles (en su mayoría hexosas y pentosas), así como a las posibilidades de enlaces glucosídicos. Entre el enlace de un monosacárido simple, como la glucosa, el carbono anomérico en conformación α o β y los cinco hidroxilos de una segunda glucosa, se puede dar lugar a 11 isómeros estructurales diferentes. Por lo tanto, la estructura de los polisacáridos depende tanto de su composición como del tipo de uniones glucosídicas presentes, lo que le confiere a la vez una gran flexibilidad conformacional (Prybylski, 2020). La complejidad de los glucanos se ve

influenciada por la flexibilidad de la cadena, dada la naturaleza de los azúcares implicados. Además de la naturaleza de la estructura carbonatada, si está constituida por homopolisacáridos o heteropolisacáridos y/o ácidos neutros. Por último, el peso molecular, los grupos funcionales que presenta la cadena y la presencia otras moléculas unidas covalentemente como proteínas (Prybylsk, 2020).

Las algas se valoran fundamentalmente por su contenido de polisacáridos de alto peso molecular; en estos organismos se denominan ficocoloides. Los ficocoloides tienen numerosos roles en las algas; son los principales componentes estructurales de sus paredes celulares y pueden estar involucrados en los mecanismos de reconocimiento entre las algas y los patógenos (Cardozo *et al.*, 2007). Estos polisacáridos desempeñan desde funciones estructurales, aportan rigidez, acumulan mucílago en su pared celular y brindan protección ante desecación o condiciones de estrés (Pangestuti y Kim, 2014). Además, por su capacidad para retener cantidades significativas de agua, su capacidad para formar geles y la quelación de metales, los ficocoloides se utilizan para una variedad de propósitos comerciales en las ciencias farmacéuticas, tecnología alimentaria, biotecnología, cosmética, ingeniería, etc. (Venugopal, 2008).

El tipo de carbohidrato varía mucho entre las algas; las fibras solubles son alignatos, fucanos y laminaranos en el caso de las algas pardas. Mientras que las rojas presentan fibras solubles con galactanos sulfatados (agares y carragenanos), xilanos y almidón florideano (Kraan 2012). Las algas verdes contienen almidón, xilanos, mananos y polisacáridos iónicos que contienen grupos sulfato (Zaporozhets *et al.*, 2014). El resultado de la variabilidad estructural de estas biomoléculas es una gran diversidad en la composición y el rol de los carbohidratos en los seres vivos. En el caso de las microalgas, estas desempeñan tanto funciones de almacenamiento y estructurales como de activadores biológicos, soportes de adhesión, metabolismo o reguladores del contenido de agua (Singh y Sáxea, 2015). Los polisacáridos de las microalgas se pueden clasificar en tres grupos principales: a) intracelulares, estructurales y extracelulares (Delattre *et al.*, 2016). Los principales azúcares presentes en microalgas son la celulosa en la pared celular y el almidón en los plastidios. Los monosacáridos básicos presentes en estos organismos son glucosa, galactosa, manosa, ramnosa, arabinosa, xilosa, ribosa y fucosa (Vuppaladadiyam *et al.*, 2018).

Las macro- y microalgas son conocidas como fuentes de polisacáridos de interés, en especial los que se encuentran sulfatados. Estos organismos contienen polisacáridos ricos en sulfato en sus paredes celulares (Raposo *et al.*, 2015). Con base en el pigmento que presentan se pueden clasificar

en tres grupos principales: las *Phaeophyceae* (algas pardas), principalmente de color marrón debido a su contenido de fucoxantina. Las *Chlorophyceae* (alga verde) dominada por pigmentos de clorofila a y b, y xantofila. Por último, las *Rhodophyceae* (algas rojas) pigmentadas principalmente de ficocianina y ficoeritrina (Cunha y Grana, 2016; O'Sullivan *et al.*, 2010).

Los polisacáridos de alto peso molecular y sus productos de degradación de bajo peso molecular son económicamente muy importantes debido a las numerosas propiedades biológicas con mínima toxicidad. La mayoría de los polisacáridos se utilizan como estabilizadores, espesantes y emulsionantes en las industrias alimentarias. Dentro de los polisacáridos importantes que se encuentran en las algas marinas están los alginatos, agar, carragenina, fucoidan, laminarina y ulvanos (Tseng, 2001; Rengasamy *et al.*, 2014).

2.4. Polisacáridos de Microalgas

El interés por las microalgas es cada vez mayor debido a los compuestos que producen y las ventajas que presentan por el hecho de ser fáciles de cultivar y la cosecha no depende de algún clima o estación. Lo que permite que la producción de polisacáridos o cualquier otro compuesto se pueda realizar durante todo el año. Los polisacáridos y los exopolisacáridos en particular son liberados por múltiples especies de microalgas y se ha reportado que tienen actividad como agentes antivirales, antioxidantes, antiinflamatorios, inmunoreguladores y lubricantes biomédicos (Raposo *et al.*, 2013).

Las investigaciones reportadas hacen énfasis en como el peso molecular, el contenido de grupos sulfato, y la carga negativa pueden ser responsables de las múltiples actividades bioactivas de este polisacárido. Los exopolisacáridos sulfatados sintetizados por distintas microalgas son heterogéneos y muy diferentes estructuralmente, lo que hace que su investigación sea desafiante. A diferencia de las macroalgas, las microalgas tienen la ventaja de poder ser cultivadas en condiciones controladas. Lo que puede hacer que la composición química, la estructura y el comportamiento reológico de sus polisacáridos sea más estable sin importar los periodos de recolección (Raposo *et al.*, 2013).

A pesar de la reconocida importancia de estos organismos, la estructura de los polisacáridos de las

microalgas ha sido prácticamente inexplorada en contraste con la de las macroalgas. Sólo se han resuelto pocas estructuras de polisacáridos de microalgas debido a las dificultades encontradas en la extracción de muestras puras y la complejidad de su estructura química. Por ejemplo, se dispone de datos estructurales avanzados para sólo tres polisacáridos de microalgas: sobre el polisacárido extracelular de la microalga roja *Porphyridium* sp., el polisacárido de la pared celular de *Chlorella* sp. y los polisacáridos de teca de *Tetraselmis* sp. (Le Costaouëc *et al.*, 2017).

Para comprender mejor los usos y las aplicaciones potenciales de los polisacáridos extracelulares es necesario conocer su estructura y propiedades fisicoquímicas. Las cuales incluyen propiedades reológicas y peso molecular ya que resultan determinantes en su comportamiento (Raposo *et al.*, 2013). Geresh *et al.*, (2002) reportaron que en el caso de la microalga *Porphyridium*, la caracterización de sus exopolisacáridos dependía también de factores como el número de azúcares, la resistencia del polisacárido a la digestión enzimática y a su tendencia de agregarse en solución.

2.5. Diatomeas y sus Polisacáridos

Las diatomeas (Bacillariophyta) son consideradas el grupo más diverso dentro del fitoplancton oceánico, con un estimado de entre 10^5 y 10^7 especies, y son un grupo de suma importancia dado que contribuyen con aproximadamente el 40% de productividad primaria en los ecosistemas marinos y el 20% de la fijación de carbono global (Norton *et al.*, 1996). Las diatomeas pertenecen a la división heterokontophyta y se dividen en dos grupos taxonómicos basados en la forma de la célula, donde las diatomeas centrales presentan una simetría radial y las diatomeas penadas presentan una simetría bilateral. Las diatomeas centrales son predominantemente planctónicas, mientras que las diatomeas penadas pueden encontrarse adheridas a superficies o creciendo y trasladándose por el sedimento (Van den Hoek *et al.*, 1995).

En años recientes, se ha estudiado de manera paralela el potencial de las diatomeas en nanotecnología y como fuente de compuestos bioactivos sobre todo en la industria alimentaria (Gügi *et al.*, 2015). Dependiendo de la movilidad de la microalga (bentónica o planctónica) y las condiciones ambientales, estos organismos producen diferentes cantidades de sustancias extracelulares poliméricas, siendo estas principalmente carbohidratos. Debido a las miles de

especies con las que cuenta el grupo de las diatomeas y a la gran variedad de formas y simetrías disponibles, tanto la composición de monosacáridos como la de sus glico-conjugados suele ser altamente específica. Estos organismos consisten en una célula con un protoplasto incrustado en una frústula (nombre de la pared celular de las diatomeas) que se encuentra entre dos válvulas o tecas superpuestas, donde la epiteca superior es más grande que la hipoteca inferior

La frústula se compone de tres capas sucesivas: 1) la capa orgánica más interna, denominada diatotepum y que está en contacto con el plasmalema; 2) una capa mineral silificada que contiene materia orgánica; y 3) una capa orgánica externa que queda atrapada en el mucilago secretado, al cual se le denomina “exopolisacárido” y se encuentra unido a la pared celular. En diversas diatomeas se han investigado los polisacáridos de la pared celular, los de almacenamiento (alimento intracelular) y el mucilago producido (Figura 1). Dichos estudios han revelado que el contenido, composición y características de estos polisacáridos varía con las condiciones ambientales y las técnicas de extracción utilizadas (Underwood & Paterson, 2003; Gügi *et al.*, 2015).

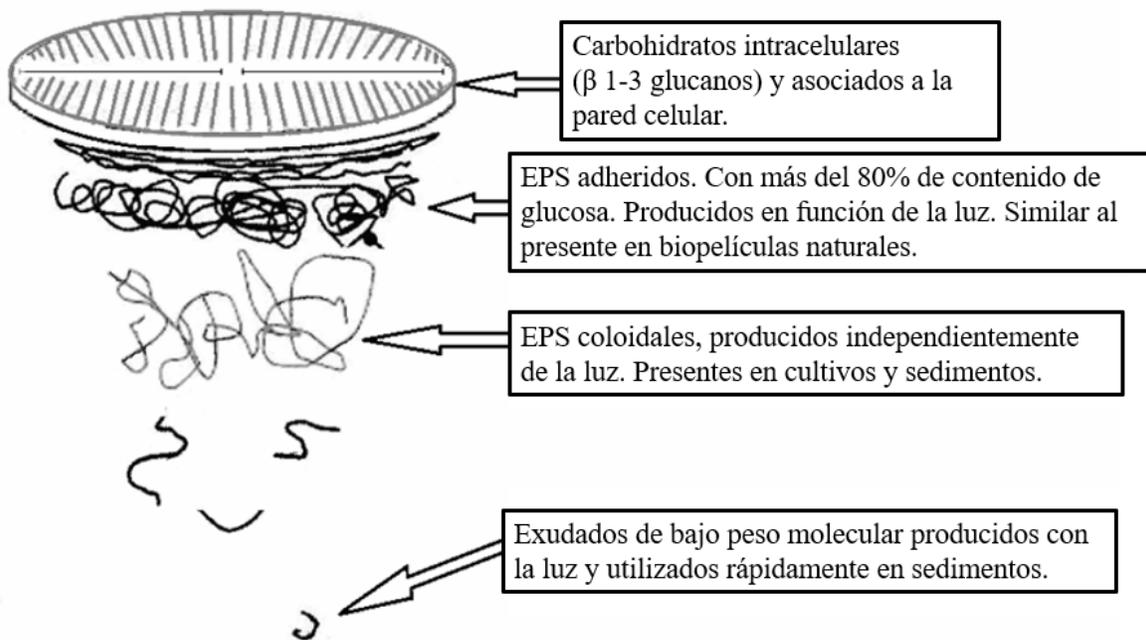


Figura 1.- Modelo conceptual de los diferentes polisacáridos presentes en diatomeas bentónicas. Modificado de Shniukova y Zolotareva (2015). EPS=exopolisacáridos.

La pared celular de las diatomeas está compuesta principalmente de sílice amorfo hidratado

(SiO₂.nH₂O) y macromoléculas, entre ellas proteínas y polisacáridos. Durante la síntesis, el ácido silícico se polimeriza en sílice formando las frústulas de las diatomeas (Figura 2). Alipour *et al.*, (2016) argumentan que la sílice hidratada posiblemente se deposita sobre capas orgánicas debido a que los aminoácidos como serina y treonina presentan altos porcentajes de grupos OH. Se ha propuesto que el Si (OH)₄ disuelto se deposita en las capas de proteína a través de la reacción de deshidratación con aminoácidos portadores de OH (Hecky *et al.*, 1973) y que estas capas presentan una alta relación Si-OH/Si-O-Si y un bajo grado de polimerización Si-O. Durante el proceso de crecimiento de las frústulas de sílice y por consiguiente la formación de capas más gruesas, se desarrollan capas más deshidratadas y polimerizadas. Sin embargo, los mecanismos responsables de estas reacciones aún no están claros (Alipour *et al.*, 2016).

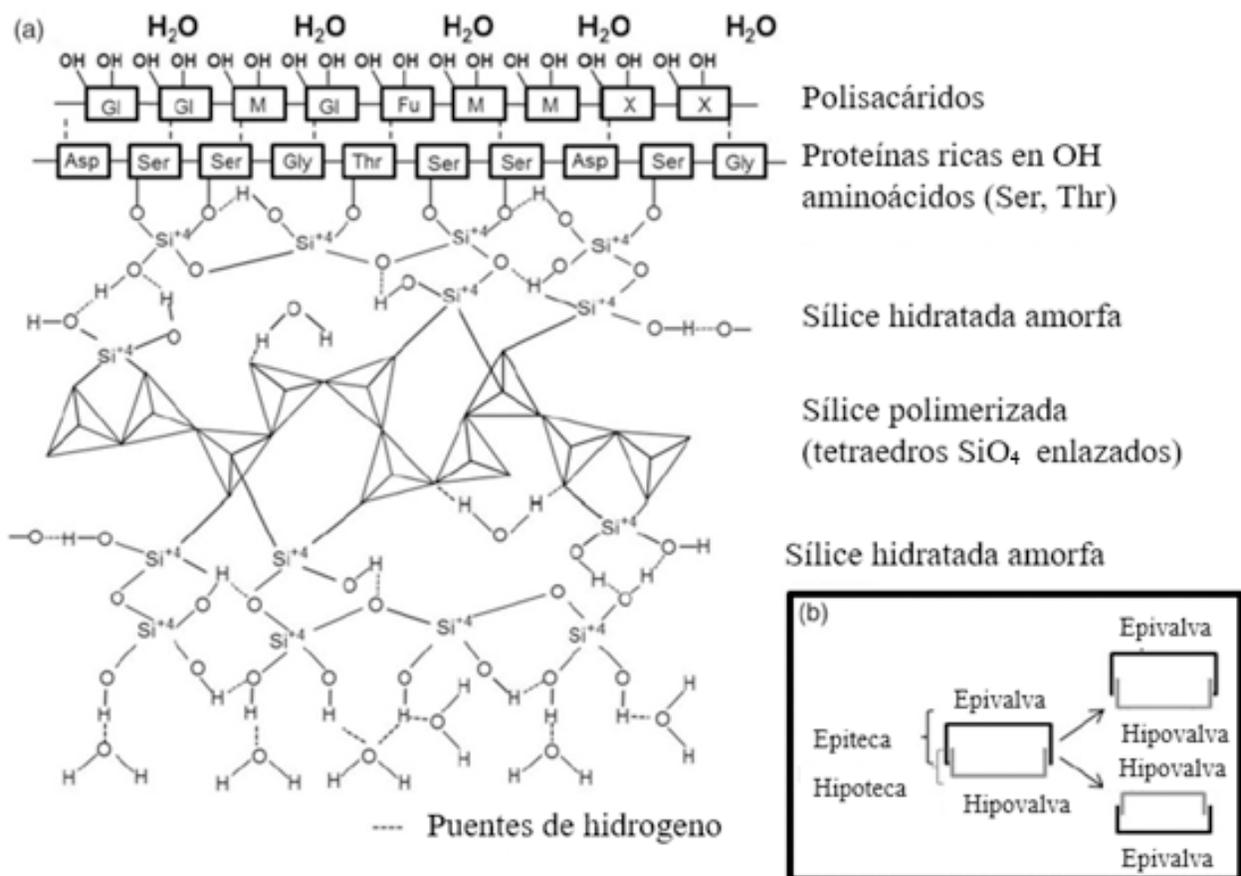


Figura 2.- (a) Esquema de una frústula de sílice de diatomeas. (b) Secciones transversales esquemáticas de frústulas de sílice de diatomeas durante una división celular. Tomada de Alipour *et al.*, 2015)

Los polisacáridos reportados en diatomeas están relacionados principalmente con el almacenamiento intracelular, seguido por los encontrados en la matriz extracelular denominados exopolisacáridos y finalmente los polisacáridos asociados a la frústula o pared celular, principalmente polisacáridos sulfatados (Gügi *et al.*, 2015). Más allá de las aplicaciones como agentes gelificantes o emulsificantes que se les da actualmente a los polisacáridos de algas en la industria alimentaria, en diatomeas, estas moléculas poseen actividad biológica de alto valor agregado en campos biotecnológicos (Beaumont *et al.*, 2021). Se han reportado múltiples efectos benéficos de distintos polisacáridos de diatomeas en la salud humana. Uno de ellos es la crisolaminarina, estructuralmente compuesto por un esqueleto de β -glucosa en una proporción de 11:1 de (β -1,3)-glucosa y (β -1,6)-glucosa, respectivamente (Hildebrand *et al.*, 2017), la cual ha reportado inhibición en la proliferación de células tumorales de colon.

En diatomeas, los exopolisacáridos se producen como resultado de la fijación fotosintética del carbón inorgánico (Decho, 1990). Estos polímeros realizan varias funciones, entre ellas, se pueden encontrar formando envolturas de mucilago y coberturas que forman un microambiente alrededor de las células y las protege de cambios ambientales repentinos y adversos. La presencia de grupos carboxilo y sulfato en estos exopolisacáridos aseguran la desintoxicación causada por metales pesados y la inmovilización de sustancias tóxicas, además de evitar que las células se sequen durante marea baja (Ordain *et al.*, 2003; Shniukova *et al.*, 2015).

Una de las razones por la cual las diatomeas bentónicas dominan sobre otras algas es la capacidad de moverse gracias a que secretan una sustancia mucilaginosa que brinda unión al sustrato y les permite deslizarse a través de éste. Dicho movimiento es característico de las diatomeas penadas con rafe y campos porosos apicales que permiten asociación con el sustrato, sin embargo, algunas diatomeas céntricas también pueden secretar mucílago a partir de procesos valvares de una manera menos frecuente (Lee 2008; Buendía-Flores *et al.*, 2015). Estos polisacáridos de diatomeas bentónicas se incorporan a la cadena alimentaria marina como fuente de materia orgánica para animales marinos tanto planctónicos como bentónicos (Decho, 1990; Shniukova *et al.*, 2015).

El mucilago extracelular que producen las diatomeas está conformado por un alto contenido de carbohidratos y tal matriz puede incluir otro tipo de biopolímeros. Los polisacáridos sulfatados se encuentran en la pared celular de estas microalgas. Los compuestos de azufre se involucran en la formación de la frústula y tanto la cantidad como la configuración varía de acuerdo con las condiciones ambientales. Se ha reportado que en condiciones de estrés ocurre un aumento en el

contenido de ácido urónico, sulfatos y fucosa para ayudar a la diatomea a adaptarse a cambios repentinos (Gügi *et al.*, 2015). En un estudio realizado por Fimbres-Olivarria *et al.*, (2018), se evaluaron los polisacáridos sulfatados de *Navicula* sp. obteniendo un rendimiento de 4.4% peso seco con un contenido de sulfato de 0.33%. Adicionalmente estos autores reportaron la formación geles a un 1% (peso/volumen) de polisacárido en agua con 0.4% (peso/volumen) de FeCl₃, así como capacidad antioxidante (Fimbres-Olivarria *et al.*, 2016) demostrando el potencial de los polisacáridos de este origen.

2.5.1. Características Biológicas y Clasificación Taxonómica de *Chaetoceros muelleri*

Chaetoceros muelleri es una diatomea planctónica céntrica que mide un diámetro de 8.4 a 19.5 µm (Figura 3). Se distribuye de manera cosmopolita, pero se encuentra con mayor frecuencia en ambientes salinos endorreicos. Sus células forman colonias filamentosas de valvas con forma elíptica, con valvas y setas ligeramente salificadas unidas por setas retorcidas, frústulas disociadas que conectan las caras de las valvas continuas (Burge y Edlund, 2007). Gracias al rápido crecimiento y fácil mantenimiento se ha utilizado en la acuicultura como alimento para larvas de camarón en criaderos comerciales de muchas regiones (Wang *et al.*, 2014; Malibari *et al.*, 2018). A partir de la biomasa de *C. muelleri* se pueden generar productos de alto valor como ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, proteínas y carbohidratos para la industria alimentaria (Lopez-Elias *et al.*, 2020), lo que la ha convertido en una de las especies de microalgas más importantes de la industria acuícola (Rahmadi *et al.*, 2020).

Clasificación taxonómica por Lemmermann, 1898:

Reino: Chromista

Filo: Ochrophyta

Clase: Bacillariophyceae

Orden: Centrales

Familia: Chaetocerotaceae

Género: *Chaetoceros*

Especie: *C. muelleri*

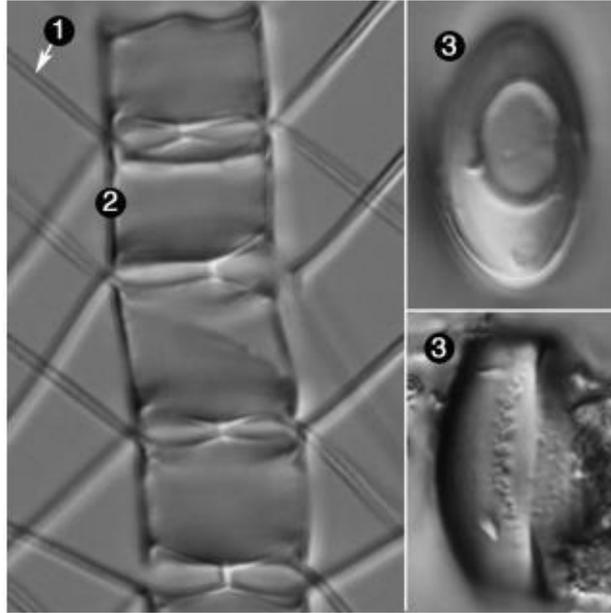


Figura 3.- Micrografía de *C. muelleri*, donde señala; 1) las frústulas ligeramente silificadas, 2) celdas contiguas por setas retorcidas, 3) presencia de rimoportula, esporas endógenas en reposo producidas. Tomada de: diatoms.org (Burge y Edlund, 2017).

3. Hipótesis

La microalga *Chaetoceros muelleri* contiene polisacáridos sulfatados que presentan propiedades bioactivas definidas por sus características macromoleculares.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Determinar las características macromoleculares y las propiedades bioactivas de los polisacáridos sulfatados extraídos de la microalga *Chaetoceros muelleri*.

4.2. Objetivos Específicos

- Extraer polisacáridos sulfatados de la biomasa de *Chaetoceros muelleri* y determinar sus características macromoleculares y morfológicas.
- Investigar la citotoxicidad de los PSCM sobre una línea celular de cáncer de colon.
- Evaluar la actividad antioxidante de los polisacáridos sulfatados extraídos de *Chaetoceros muelleri* (PSCM), utilizando un método *in vitro*.
- Determinar, en un modelo murino, el índice glucémico de los PSCM.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivo de Microalgas y Extracción de Polisacáridos

La cepa de *Chaetoceros muelleri* se obtuvo del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS). El cultivo se realizó bajo condiciones controladas en el Laboratorio de Tecnologías para el Cultivo de Organismos Marinos de la Universidad Estatal de Sonora utilizando el medio "F" de Ryther y Guillard (1962), luz blanca (3,500 luxes), 23 °C y aireación continua. Se realizaron recuentos celulares diarios. La biomasa se floculó con $Al_2(SO_4)_3$ y se cosechó al comienzo de la fase estacionaria del cultivo. La biomasa recuperada fue liofilizada. Posteriormente se suspendieron 20 g de biomasa liofilizada en 200 mL de agua destilada y la mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, la biomasa suspendida se centrifugó durante 10 min a 20 000 $\times g$ para obtener un sedimento celular. Al sedimento celular resultante se le añadió etanol al 95 % (200 ml) y luego se calentó a 42 °C y se agitó durante 1 hora a 350 rpm para eliminar los pigmentos y los lípidos. Después de la centrifugación, el sedimento celular se lavó tres veces con 100 ml de etanol al 95 % para eliminar completamente los pigmentos y las proteínas. El sedimento celular resultante se extrajo con 400 ml de ácido sulfúrico (50 mM) en un baño de agua a 60 °C durante 30 min. Los sobrenadantes se recogieron por centrifugación y se precipitaron con cuatro volúmenes de etanol al 95 % a -20 °C durante 24 h. El precipitado se sedimentó por centrifugación, se resuspendió de nuevo, se filtró (45 μ m) y se liofilizó para obtener los polisacáridos sulfatados de *Chaetoceros muelleri* (PSCM) (Lai *et al.*, (2020).

5.2. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

El análisis FTIR del polvo seco de PSCM se realizó en un espectrómetro Nicolet iS50 FT-RI (Madison, WI, EE. UU.). Se registró el espectro desde 4000 hasta 400 cm^{-1} (Fimbres-Olivarría *et*

al., 2018). A partir del espectro FTIR se estimó el grado de sulfatación de acuerdo con el método reportado por Rochas *et al.* (1986).

5.3. Microestructura y Composición Elemental

La microestructura de PSCM se estudió mediante microscopía electrónica de barrido (JEOL 5410LV, JEOL, Peabody, MA, EE. UU.) a bajo voltaje (20 kV). La imagen SEM se obtuvo en el modo de imágenes de electrones secundarios (SEI). La composición química se realizó mediante espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDS) (INCA-200 Oxford Instruments, Reino Unido).

5.4. Características Macromoleculares

El polvo de PSCM se dispersó en NaNO_3 100 mM/ NaN_3 al 0.02 % a 5 mg/mL y se filtró (0.45 μm , Millipore). La muestra filtrada se analizó en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EE. UU.) por exclusión por tamaño (SEC). Se utilizaron las columnas Shodex OH-pak SBH-Q-804 y 805 (Shodex Showa Denco KK, Tokio, Japón) a 0.7 mL/min y 25 °C. Este sistema estuvo acoplado a un detector de dispersión de luz láser multiángulo (MALS) DAWN HELOS-II 8, un viscosímetro ViscoStar-II y un detector Optilab T-rex de índice de refracción (RI) (Wyatt Technology Corp., Santa Bárbara, CA, EE. UU.). Se utilizó el programa ASTRA 6.1 (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA, EE. UU.). Las características macromoleculares determinadas fueron la masa molar promedio en peso (M_w), la masa molar promedio en número (M_n), la viscosidad intrínseca ($[\eta]$), el radio hidrodinámico (R_h) y el índice de polidispersidad ($I = M_w/M_n$) (Fimbres-Olivarria *et al.*, 2018).

El potencial Z de los PSCM se determinó por dispersión dinámica de luz (DLS) en un equipo Möbiuż (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA, USA) a 532 nm y un ángulo de detección de 163.5°

5.5. Análisis Químico

El contenido de proteínas se determinó por espectrofotometría mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). El contenido de carbohidratos se obtuvo por colorimetría mediante el método de Dubois *et al.* (1956). El contenido de cenizas fue determinado mediante el método AOAC 920,153.

5.6. Citotoxicidad

5.6.1. Cultivo Celular

Se utilizó la línea celular de colon humano, CCD 841 CoN (ATCC® CRL1790™) de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.) Las células se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), 1% de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina. Las células se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO₂ en una incubadora humidificada (Thermo Fischer Scientific, San José, CA, EE.UU.) (Chen *et al.*, 2020) y el medio de cultivo se renovó dos veces por semana. Para tripsinizar las células cultivadas se utilizó solución al 0.25% [p/v] de tripsina-EDTA 0.53 mM durante un máximo de 7 min hasta alcanzar aproximadamente el 80% de confluencia y se subcultivaron (1×10^4 células/cm²) en DMEM fresco suplementado con 10% FBS.

5.6.2. Determinación de la Proliferación Celular

El efecto de los PSCM sobre la proliferación de la línea celular de colon se determinó siguiendo el ensayo estándar de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Chen *et al.*, 2020) con algunas modificaciones (Hernandez *et al.*, 2007). Las células (1×10^4 células / 50 μ l) se

sembraron en microplacas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% para permitir la adhesión celular. El medio de cultivo se utilizó como control (100% proliferación celular) y el fármaco citotóxico 5-fluorouracilo (5-FU) se utilizó como control positivo (fármaco citotóxico). En las últimas 4 h del período de incubación, se pipetearon 10µL de solución de MTT (5 mg/mL) en cada pocillo. La viabilidad celular se midió por la capacidad de las células metabólicamente activas para reducir la sal de tetrazolio a cristales de formarán de color púrpura. Los precipitados coloreados resultantes formados se disolvieron con alcohol isopropílico ácido (0.4%). La absorbancia de las muestras se midió a una longitud de onda de prueba de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 650 nm utilizando un lector de placas ELISA (Thermo Scientific MultiSkan Go, Madrid, España). Los resultados se expresaron como el número de células viables expuestas a los tratamientos en comparación con el número de células de control (medio solo).

5.7. Capacidad Antioxidante

Se utilizó el ensayo de actividad de eliminación de radicales DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Se preparó una solución etanólica de DPPH (0.1 mM). Se añadió una alícuota de la muestra (25-200 mg/mL) a la solución de DPPH (1:1 v/v) (Hou *et al.*, 2002). La absorbancia se midió a 517 nm en un espectrofotómetro GENESYS™ 10UV (Thermo Scientific). Se incubó durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Las mediciones se realizaron por triplicado. Se utilizó vitamina C como control positivo. La estabilización de los radicales DPPH por los polisacáridos sulfatados se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{DPPH – actividad estabilizante (\%)} = [1 - \text{Amuestra}_{517\text{nm}} - \text{Ablanco}_{517\text{nm}}] / \text{Acontrol}_{517} \times 100$$

5.8. Índice Glucémico

Para el experimento se utilizaron ratas Wistar macho (244-278 g) donadas por la Universidad de

Sonora. Los organismos se alojaron individualmente en jaulas de malla de acero inoxidable en un ambiente controlado (23 ± 2 °C, 60 ± 5 % de humedad relativa y ciclo día/noche de 12 h). Se utilizó una dieta estándar (LabDiet 5001) y agua *ad libitum* durante 15 días de aclimatación. El experimento fue aprobado por el H. Comité de Ética de Investigación del Centro de Investigación para la Alimentación y el Desarrollo (CIAD), de acuerdo con los lineamientos del comité de control y supervisión de experimentos con animales (NOM-062-ZOO-1999) en México. Después del período de aclimatación, las ratas se mantuvieron en ayuno durante 10 h y se asignaron aleatoriamente a 2 grupos (n=3/grupo), grupo de glucosa y grupo de PSCM, que recibieron 1 mL de solución de glucosa o PSCM a 25 mg/mL, respectivamente, por sonda oral única. Se recogió sangre de la vena de la cola antes del tratamiento y luego a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos después de la administración. Los niveles de glucosa en sangre se midieron utilizando un medidor de glucosa en sangre Accu-Check Active (Roche, Mannheim, Alemania). El valor de GI se calculó a partir del área de la curva de respuesta glucémica de glucosa (So) y de PSCM (SPSCM) según lo informado por Li *et al.*, (2021):

$$GI = (SPSCM / So) \times 100$$

El área bajo la curva se calculó utilizando el programa OriginPro2021 (OriginLab Corp., Northampton, Massachusetts, EE. UU.).

5.9 Análisis Estadístico

Se utilizó estadística descriptiva. Se reportó el valor de la media \pm desviación estándar.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Cultivo Celular de *Chaetoceros muelleri*

Chaetoceros sp. es una de las especies de diatomeas más importantes en la industria, con una producción de biomasa muy variable con excelente valor nutricional en acuicultura, alcanzando una concentración promedio de 1×10^6 células/mL y (López-Elías *et al.*, 2004). Diversos autores han reportado que *C. muelleri* es una de las microalgas más adecuadas para producir biomasa a gran escala, así mismo, es una especie que puede ser cultivada tanto en exteriores como interior bajo condiciones controladas para uso comercial (Becerra-Dórame *et al.*, 2010). La concentración celular resultante del cultivo celular en este estudio fue de aproximadamente 1 500 000 células/mL (Figura 4). Mediante la regresión del log2 de la concentración celular se determinó que el cultivo entró en la fase estacionaria el día 3 después del inóculo. El rendimiento de biomasa calculado fue de 2.8 g/L, valor mayor al reportado por Wang *et al.* (2014) para esta misma especie (0.54 g/L), esto pudiendo deberse al uso de $Al_2(SO_4)_3$ como agente floculante para facilitar la cosecha. El rendimiento de polisacáridos fue de 2.2% (p/p), valores cercanos a los reportados para otras especies de diatomeas como *Gomphonema olivaceum* con 3% (p/p) (Huntsman y Sloneker, 1971) y *Navicula* sp. con 4% (p/p) (Fimbres-Olivarria *et al.*, 2016).

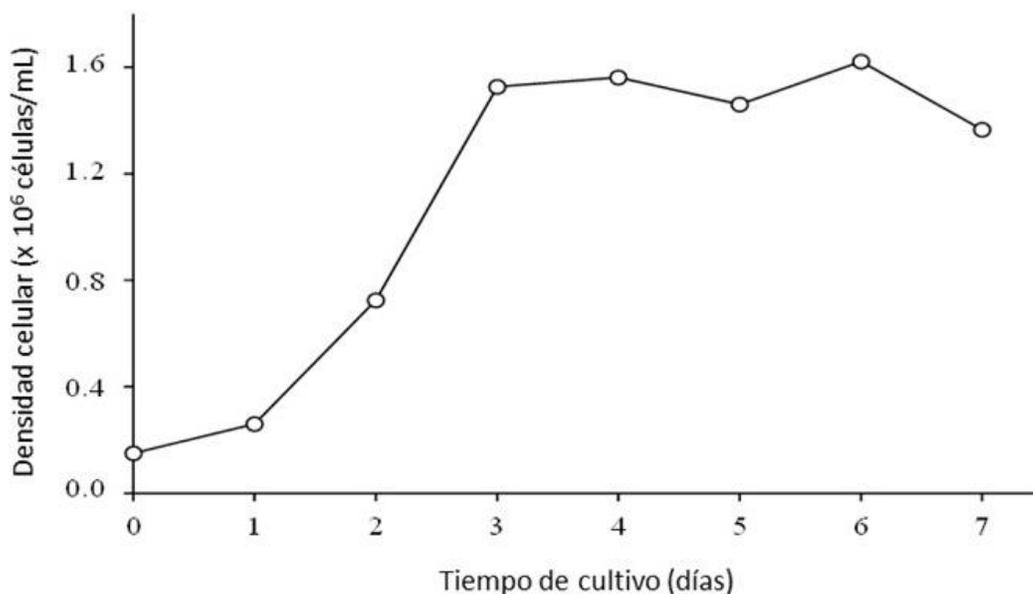


Figura 4. Curva de crecimiento de la microalga *C. muelleri*.

6.2 Extracción y análisis químico de polisacáridos de *C. muelleri*

El rendimiento de extracción de polisacáridos de *C. muelleri* fue de 2.2 % (p/p). El extracto obtenido presentó un 78% de carbohidratos totales (Cuadro 1). Varios factores ambientales, como la temperatura, la exposición a la luz, los nutrientes y la salinidad, pueden afectar la cantidad de carbohidratos presentes en las algas (Tiwari *et al.*, 2021). Sin embargo, es necesario optimizar técnicas de caracterización para los polisacáridos de *C. muelleri* para poder dilucidar la composición del resto de azúcares neutros presentes en la muestra. En el caso de proteínas, se encontró un contenido de 5%. Valores que coinciden con reportado para los polisacáridos de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*, donde Le Costaouëc *et al.*, (2020) reportaron que el contenido de proteínas medido en las muestras purificadas mostró un contenido de alrededor del 7 % (p/p) de proteínas, lo que nuevamente sugiere una fuerte interacción del polisacárido con las proteínas de la pared celular.

Cuadro 1. Composición de los polisacáridos extraídos *C. muelleri*.

Componente	% (p/p)
Carbohidratos totales	78 ± 0.3
Proteína	5 ± 0.7
Cenizas	17 ± 0.2

Promedio y desviación estándar de tres repeticiones.

6.3. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

La espectroscopia FTIR es una técnica analítica que permite estudiar estructuras moleculares identificando las vibraciones entre diferentes átomos presentes en una muestra (Chen *et al.*, 2021). Se identificaron tres bandas principales en el rango de número de onda de 3405 a 1137 cm^{-1} (Figura 5) en el espectro de los polisacáridos extraídos de *Chaetoceros muelleri* analizados en este estudio. Según la literatura, la banda de 3405 cm^{-1} es característica de la vibración del grupo OH y ha sido reportada en polisacáridos extraídos de algas verdes y pardas (Shao *et al.*, 2013; Saboural *et al.*, 2014). La banda detectada a 1656 cm^{-1} ha sido asociada con amidas en proteínas reportadas en otras microalgas (Stehfest *et al.*, 2005). La banda de 1035 cm^{-1} se considera básica en la estructura del polisacárido porque representa las vibraciones de estiramiento del puente glucósido (C-O-C) (Pereira *et al.* 2013). Por último, Pielesz *et al.*, (2014) atribuyen a las bandas en un rango de 622 y 583 cm^{-1} la deformación simétrica y asimétrica de los enlaces O=S=O de los sulfatos en extractos de fucoidan.

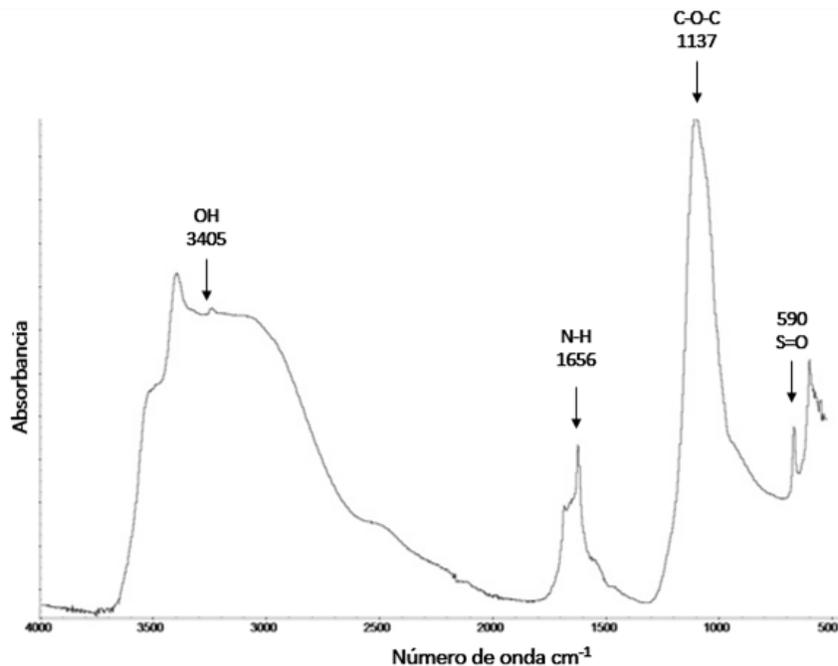


Figura 5. Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) de PSCM. Las flechas indican las principales bandas de absorción.

6.4. Microestructura y Composición Elemental

La pared celular en algas se caracteriza por la presencia de mucilago sobre el esqueleto, así como por contar con una abundante matriz intercelular y por contener macromoléculas sulfatadas de carácter polianiónico (Stiger-Pouvreau y Zubia, 2020). Los componentes estructurales de pared celular de las algas, entre ellos los polisacáridos sulfatados, brindan a las células de las algas resistencia mecánica ante la deformación. Además, estos compuestos mejoran las propiedades mecánicas de sus redes al incorporar CaCO_3 asociado a MgCO_3 y estroncio (Sr). Permiten también el aumento de intercambios iónicos por captación de iones como Ca^{2+} o Na^{2+} y brindan una gran adaptación ante la deshidratación por la presencia de los grupos sulfato (Hentati *et al.*, 2020).

En el presente estudio, la microscopía electrónica de barrido con análisis elemental (Figura 6) reveló que las partículas de PSCM secas extraídas de *Chaetoceros muelleri* consisten en polvo de forma irregular con ángulos no agudos. Este resultado es consistente con la descripción reportada para otros polisacáridos sulfatados extraídos de algas (Alboofetileh *et al.*, 2019). El análisis de composición de elementos arrojó principalmente la presencia de carbono, oxígeno, azufre, fósforo,

hierro y calcio (25.34, 50.45, 4.76, 7.06, 4.37 y 1.88% respectivamente) (Figura 6c). Elementos como el calcio fueron identificados en la muestra probablemente debido a los macronutrientes esenciales y la naturaleza de los metales alcalinotérreos de la fuente de extracción. Estos elementos, entre otros, se han descrito en *Chaetoceros* spp. por Lobus *et al.*, (2021), sin embargo, la información de esta naturaleza aún es escasa y las concentraciones elementales pueden variar significativamente entre diferentes especies dependiendo de su entorno y disponibilidad de nutrientes (Tesson 2009).

En una investigación Ibrahim *et al.* (2021) analizaron muestras de *Ulva lactuca* por espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDX) presentaron valores muy cercanos a los del presente estudio en el contenido de carbono, oxígeno y calcio (26.92%, 48.87% y 2.00% respectivamente). Sin embargo, el valor de azufre encontrado en *Chaetoceros muelleri* es 4.76%, valor más bajo en comparación con el reportado para *Ulva Lactuca* (9.11%), lo cual sugiere que *Chaetoceros muelleri* podría poseer exopolisacáridos sulfatados en pequeñas cantidades.

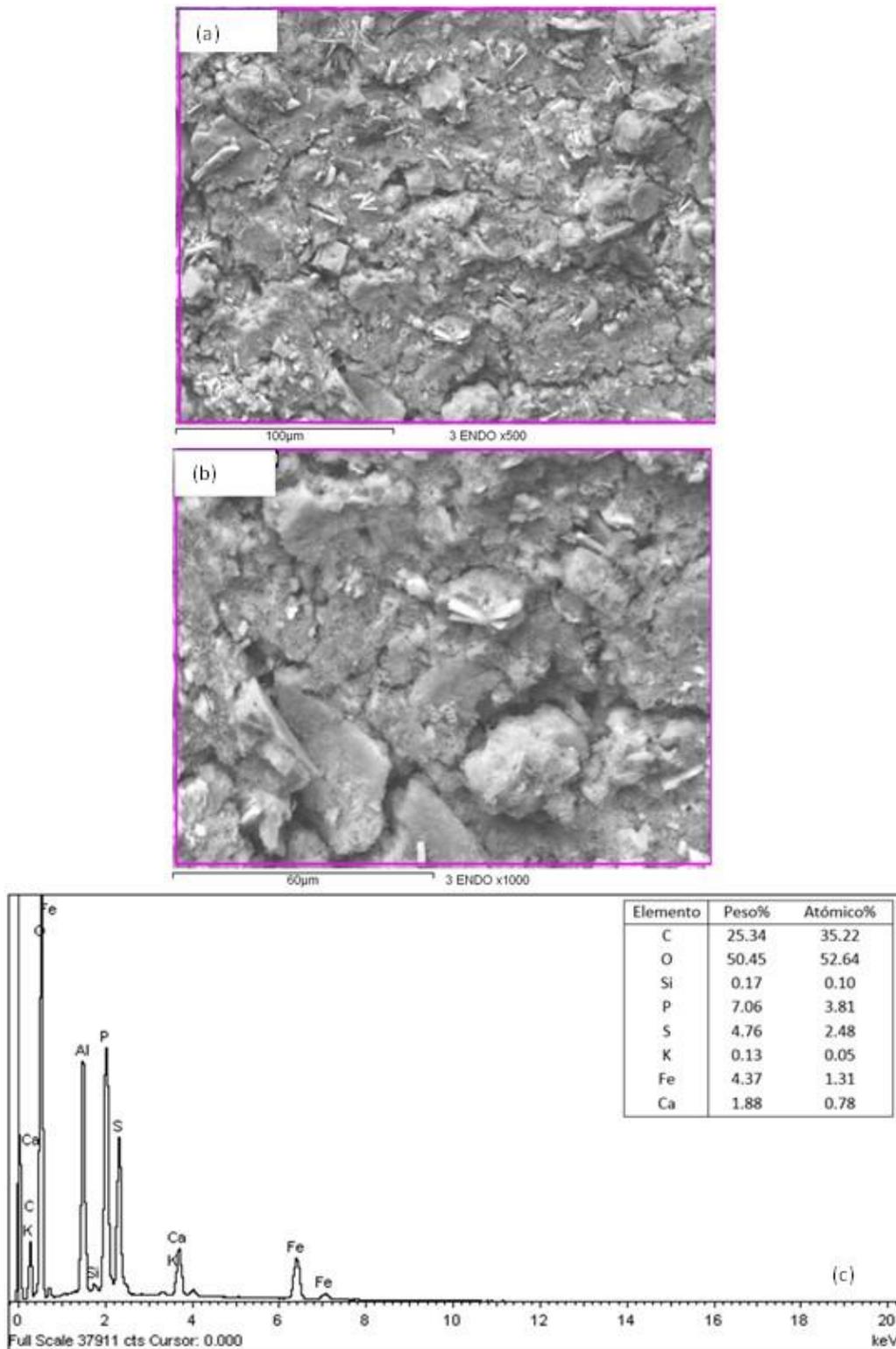


Figura 6. Microscopía electrónica de barrido (SEM) a 500x (a) y 1000x (b) y análisis de espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDS) (c) de PSCM.

6.5. Características macromoleculares

Las características macromoleculares de los PSCM se presentan en el Cuadro 2. El peso molecular (M_w) y la viscosidad intrínseca ($[\eta]$) de los PS fueron 4.13 kDa y 4.68 mL/g, respectivamente. El índice de polidispersidad (PI) indica la distribución del tamaño de las cadenas presentes en el polímero (Danaei *et al.*, 2018). Para los polímeros monodispersos, el PDI es 1, mientras que el PDI inferior a 1.2 y superior a 2 generalmente se consideran de dispersión estrecha y dispersión amplia, respectivamente (Guo *et al.*, 2017). Los PSCM analizados mostraron un valor de PDI de 2, lo que indica una polidispersidad amplia de las cadenas. Estudiar el M_w de los polímeros es de gran importancia ya que determina las propiedades fisicoquímicas de una macromolécula específica (Meyer y Chilkoti, 2002). La $[\eta]$ mide la contribución de un polímero a la viscosidad de una solución cuando su concentración tiende a cero y dependerá de la conformación y M_w del polímero en solución (Del Río *et al.*, 2017). El R_h de una muestra es el radio de una esfera teórica que posee la misma masa y densidad que se calcula para la muestra a partir de su peso molecular y viscosidad intrínseca en este caso el valor del R_h de los PS fue de 1.3 nm. Mientras que para el caso de radio de giro (R_g) y las constantes k y α no es posible obtener valores confiables debido a la difusión isotrópica y al tamaño tan pequeño del polisacárido (Hadj *et al.*, 2015).

La información sobre las características macromoleculares de PS de microalgas, particularmente diatomeas, es escasa. Para comprender mejor los usos y potenciales aplicaciones de los polisacáridos extracelulares, es necesario realizar ensayos de caracterización para conocer tanto su estructura como sus propiedades macromoleculares, entre las que se encuentran las propiedades reológicas y el peso molecular, ya que son determinantes en su comportamiento (Raposo *et al.*, 2013). El estudio de nuevas fuentes de polisacáridos en microalgas ofrece múltiples ventajas frente al trabajo con macroalgas al obtener polisacáridos en condiciones controladas generando información sobre nuevas fuentes y posibles aplicaciones.

Cuadro 2. Características macromoleculares de PSCM.

Mw (kDa)	4.13
Mn (kDa)	1.94
PI (Mw/Mn)	2.1
[η] (mL/g)	4.68
Rh (nm)	1.3

Mw: masa molar promedio en peso; Mn: masa molar promedio en número; PI: índice de polidispersidad; [η]: viscosidad intrínseca; Rh: radio hidrodinámico.

En el Cuadro 3 se presenta el grado de sulfatación y el potencial Z de los PSCM. Los PSCM presentaron un valor de potencial Z positivo. El bajo grado de sulfatación de PSCM sugiere que *Chaetoceros muelleri* podría poseer polisacáridos sulfatados en pequeñas cantidades lo cual explica que el potencial Z no presente carga negativa. De acuerdo con Bastias Solis (2017), un potencial zeta positivo es considerado una ventaja desde el punto de vista farmacéutico si lo que se busca es mayor contacto celular ya que favorece la interacción con membranas celulares de carga opuesta (en las superficies celulares predominan las cargas negativas).

Cuadro 3. Grado de sulfatación y potencial Z de PSCM.

Característica	Valor
Grado de sulfatación (proporción sulfato/carbohidrato)	0.10 ± 0.01
Potencial Z (mV)	$+1.91 \pm 0.33$

Promedio y desviación estándar de tres repeticiones.

6.6. Citotoxicidad

La evaluación de la citotoxicidad de un compuesto puede llevarse a cabo mediante pruebas químicas, biológicas *in vitro* (líneas celulares) y bioensayos en animales y humanos tras la ingesta de éstos. Los estudios *in vitro* con cultivos celulares son una herramienta de diagnóstico de gran utilidad ya que es posible reproducir diversos estados fisiológicos a nivel laboratorio, lo cual

facilita la manipulación y condiciones de ensayo (Chen *et al.*, 2020). Así, en el presente trabajo de investigación se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de los PSCM, para posteriormente estudiar sus posibles propiedades bioactivas y con ello revalorizar esta microalga y sus polisacáridos.

Los resultados de toxicidad de PSCM se presentan en la Figura 7 donde se observa que, en general, la proliferación celular de los cultivos con PSCM es similar a la del control. Se considera que un compuesto tiene un efecto tóxico cuando este valor es inferior al 75% (Veciana Galindo *et al.*, 2014). En el presente estudio el rango de proliferación celular fue del 91 a 116 % en las células expuestas a PSCM. Los resultados indican que los PSCM no presentan citotoxicidad sobre la línea celular de colon CCD 841 CoNs en el rango de concentraciones evaluado.

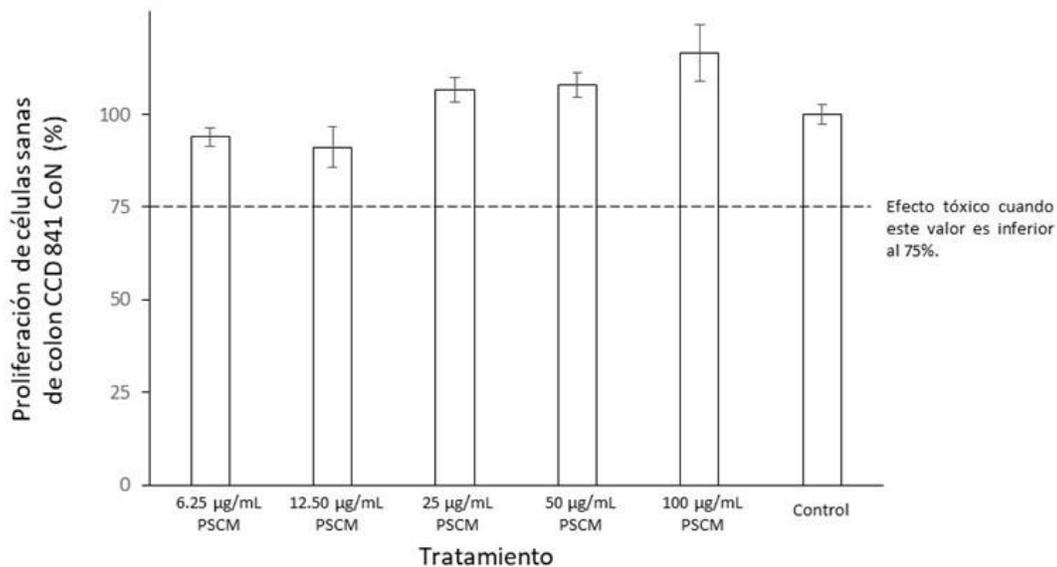


Figura 7. Efecto de PSCM a distintas concentraciones en la proliferación de células sanas de colon CCD 841 CoN en relación con el tratamiento control.

6.7. Capacidad antioxidante

Los antioxidantes pueden ayudar a anular los efectos dañinos de algunos radicales libres presentes en las células. Las personas con dietas ricas en antioxidantes tienen un menor riesgo de cáncer y de enfermedades cardíacas, así como de algunas enfermedades neurológicas menores. Estos efectos

sugieren que los compuestos con actividad antioxidante pueden prevenir algunos padecimientos relacionados con una nutrición deficiente y la neurodegeneración causada por el estrés oxidativo (Lordan *et al.*, 2011).

Los antioxidantes también han sido relacionados con la prevención del envejecimiento prematuro y las enfermedades crónico-degenerativas, como la hipertensión, la artritis reumatoide, y el endurecimiento de las arterias, entre otras enfermedades. Los niveles adecuados de antioxidantes en la dieta son esenciales para una buena salud, es por ello por lo que existe un gran interés sobre este tipo de compuestos, así como una búsqueda constante de nuevas fuentes o estructuras moleculares que presenten esta propiedad (Khan *et al.*, 2019).

Los polisacáridos de algas presentan actividad antioxidante. Por ejemplo, la se ha reportado que la carragenina con pesos moleculares más bajos tiene una mayor actividad antioxidante que la molécula de pesos moleculares altos (Sun *et al.*, 2010). Es posible que este efecto esté relacionado con los extremos reductores presentes en el polisacárido.

Los PSCM presentaron una actividad antioxidante del 23% lo cual representa aproximadamente la cuarta parte del valor registrado para vitamina C en el presente estudio (84%) (Figura 8). El porcentaje de actividad antioxidante registrado para PSCM (23%), es mayor al reportado por Xia *et al.* (2014) en los polisacáridos (crisolaminarinas) de la diatomea *Odontella aurita* a una concentración de 25 mg/mL (aproximadamente 20%), utilizando el mismo método (DPPH) empleado en la presente investigación. Estos autores sugieren que las características estructurales del polisacárido como el peso molecular y la conformación de las cadenas determinan la capacidad de la molécula para estabilizar radicales libres. Es posible que la actividad antioxidante de PSCM esté relacionada con su bajo peso molecular (4.13 kDa) y la presencia de sulfato en la molécula.

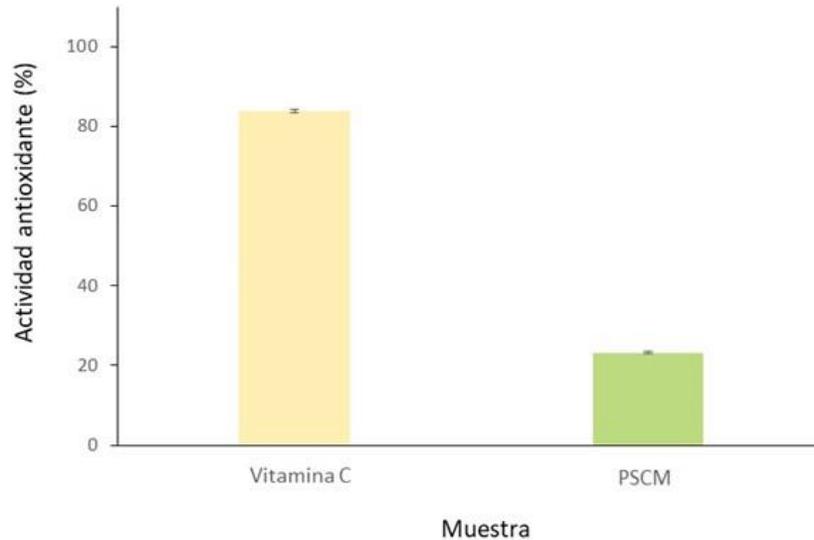


Figura 8. Actividad antioxidante de PSCM y su comparación con el valor registrado en vitamina C bajo las condiciones de estudio utilizadas.

6.8. Índice Glucémico (IG)

El índice glucémico (IG) se define como el aumento del nivel de glucosa en sangre por encima del nivel de referencia (nivel de ayuno) durante un período de 2 horas siguiente al consumo de una cantidad definida de carbohidrato en comparación con la misma cantidad de un carbohidrato de referencia. El IG representa un parámetro para clasificar los carbohidratos por su impacto en los niveles de glucosa en sangre debido a su facilidad de digestión y absorción. Representa además una manera de examinar los riesgos relativos de las dietas con el fin de prevenir las enfermedades cardíacas y la obesidad. Algunos carbohidratos se digieren y son absorbidos rápidamente causando un rápido aumento de los niveles de glucosa en sangre (IG alto). En este caso, la insulina liberada en respuesta puede conducir posteriormente a una caída rápida incluso bajo el nivel de ayuno. Otros carbohidratos se digieren y son absorbidos lentamente (IG bajo) lo cual se refleja en un aumento más lento y prolongado de glucosa en sangre, así como un nivel máximo más bajo tanto de glucosa como de insulina y una caída gradual de las mismas. La mayoría de los estudios sobre IG utilizan como referencia la glucosa o el pan blanco asignándole una puntuación de 100 (Gropper *et al.*, 2009). Si un alimento tiene un IG inferior a 56 se considera que tiene una potencia glucémica baja. Adherirse a una dieta con bajo IG permite un mejor control glucémico y a largo plazo ayuda a

reducir el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 (Lu y Chen, 2022).

Se ha demostrado que los carbohidratos complejos que forman parte de la fibra dietética ayudan a mantener un peso regular y aumenta la actividad intestinal, entre otras bioactividades que benefician la salud humana lo cual la convierte en parte de la familia de biomoléculas funcionales (Braithwaite *et al.*, 2014). En este sentido, varios autores en los últimos años se han centrado en estudiar la digestión, la fermentación e incluso el potencial antiobesidad de los polisacáridos complejos de las algas (Chin *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021).

El estudio de los niveles de glucosa en sangre con los tratamientos de glucosa y PSCM mostró un mayor aumento de glucosa en sangre con la solución de glucosa que con la solución de PSCM. Este resultado podría estar relacionado con una estructura compleja en los PSCM, lo cual ha sido previamente reportado para otros polisacáridos de algas (Li *et al.*, 2021). Utilizando estos resultados se calculó un valor de IG de PSCM de 49, el cual corresponde a un bajo IG, es decir que es considerado un polisacárido de baja potencia glucémica. (Figura 9). En este sentido, se ha reportado que los polisacáridos de algas con bajo valor de Mw (4-20 kDa) presentan un menor IG debido a que promueven la secreción de insulina, protegiendo así el páncreas y mejorando la resistencia a la insulina (Lu y Chen, 2022).

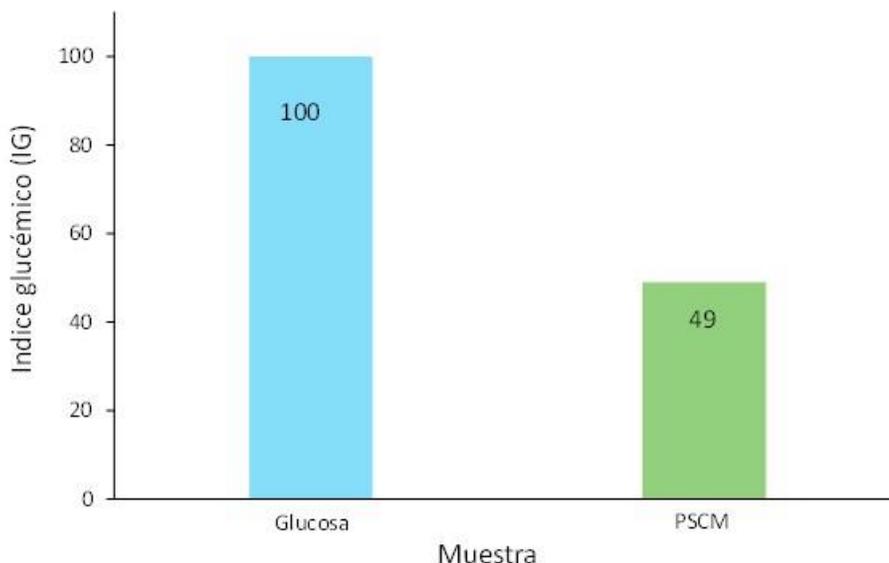


Figura 9. Índice glucémico en ratas Wistar determinado a partir de la administración por sonda oral de 1 ml de solución de glucosa o PSCM a 25 mg/mL.

7. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de estudio utilizadas, la extracción de PSCM provenientes de la biomasa de *Chaetoceros muelleri* genera un rendimiento de 2.2% (p/p). Estos polisacáridos presentan un peso molecular (Mw), viscosidad intrínseca $[\eta]$, radio hidrodinámico (Rh), grado de sulfatación y potencial Z de 4.13 kDa, 4.68 mL/g, 1.3 nm, 0.1 y +1.91 mV, respectivamente. La microscopia electrónica de barrido con análisis elemental revela que las partículas de PSCM presentan forma irregular y contienen azufre. No se registra efecto citotóxico de estos polisacáridos en la línea celular de colon CCD 841 CoNs. Los PSCM presentan actividad antioxidante en el rango reportado para otros polisacáridos de diatomeas (23%) y un índice glucémico bajo (49). Los resultados indican que las características macromoleculares, en especial el bajo valor de Mw, favorece las propiedades bioactivas de estos polisacáridos.

8. RECOMENDACIONES

Se sugiere integrar un análisis que permita determinar la estructura química fina de los PSCM. En futuras investigaciones sobre las propiedades bioactivas de PSCM sería interesante considerar estudiar sus propiedades antivirales e inmunoestimuladoras. Otro aspecto que sería importante explorar es el efecto de las condiciones de cultivo de *C. muelleri* sobre las características macromoleculares y bioactivas de PSCM.

9. REFERENCIAS

- Alboofetileh, M., Rezaei, M., Tabarsa, M., y You, S. 2019. Bioactivities of *Nizamuddiniana zanardinii* sulfated polysaccharides extracted by enzyme, ultrasound and enzyme-ultrasound methods. *Journal of food science and technology*. 56(3): 1212-1220.
- Alipour, L., Hamamoto, M., Nakashima, S., Harui, R., Furiki, M., y Oku, O. 2016. Infrared microspectroscopy of bionanomaterials (diatoms) with careful evaluation of void effects. *Applied Spectroscopy*. 70(3): 427-442.
- Bastías Solís, M.F. 2018. Determinación y cuantificación de la eficiencia de asociación de azitromicina en nanopartículas biopoliméricas de quitosano y condroitín sulfato mediante la técnica de diafiltración. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias. Escuela de Química y Farmacia. pp. 113.
- Beaumont, M., Tran, R., Vera, G., Niedrist, D., Rousset, A., Pierre, R., Shastri P., y Forget, A. 2021. Hydrogel-forming algae polysaccharides: From seaweed to biomedical applications. *Biomacromolecules*. 22(3): 1027-1052.
- Becerra-Dórame, M., López-Elías, J.A. y Martínez-Córdova, L.R. 2010. An alternative outdoor production system for the microalgae *Chaetoceros muelleri* and *Dunaliella* sp. during winter and spring in Northwest Mexico. *Aquacultural Engineering*. 43 (1): 24–28.
- Braithwaite, M. C., Tyagi, C., Tomar, L. K., Kumar, P., Choonara, Y. E., y Pillay, V. 2014. Nutraceutical-based therapeutics and formulation strategies augmenting their efficiency to complement modern medicine: An overview. *Journal of Functional Foods*. 6, 82–99.
- Brasil, B. D. S. A. F., de Siqueira, F. G., Salum, T. F. C., Zanette, C. M., y Spier, M. R. 2017. Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. *Algal research*. 25, 76-89.
- Buendía-Flores, M., Tavera, R., y Novelo, E. 2015. Florística y ecología de diatomeas bentónicas de la zona lacustre de Xochimilco-Tláhuac, México. *Botanical Sciences*. 93(3): 531-558.
- Burge, D. y Edlund, M. 2017. *Chaetoceros muelleri*. In *Diatoms of North America*. Recuperado de https://diatoms.org/species/chaetoceros_muelleri
- Cardozo, K.H., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O. y Colepicolo, P. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 146: 60–78.
- Carvajal-Millan, E., Vargas-Albores, F., Fierro-Islas, J. M., Gollas-Galván, T., Magdaleno-Moncayo, D., Rascon-Chu, A., Martínez-Porchas M., y Lago-Lestón, A. 2020. Arabinoxylans and gelled arabinoxylans used as anti-obesogenic agents could protect the stability of intestinal microbiota of rats consuming high-fat diets. *International journal of food sciences and nutrition*. 71(1): 74-83.
- Chen, L, Lin X y Teng H. 2020. Emulsions loaded with dihydromyricetin enhance its transport through Caco-2 monolayer and improve anti-diabetic effect in insulin resistant HepG2 cell. *Journal of Functional Foods*, 64: 103672.
- Chen, S., Sathuvan, M., Zhang, X., Zhang, W., Tang, S., Liu, Y. y Cheong, K. L. 2021.

Characterization of polysaccharides from different species of brown seaweed using saccharide mapping and chromatographic analysis. *BMC Chemistry*. 15(1): 1-11.

Chin, Y. X., Mi, Y., Cao, W. X., Lim, P. E., Xue, C. H., y Tang, Q. J. 2019. A pilot study on anti-obesity mechanisms of *Kappaphycus alvarezii*: The role of native κ -carrageenan and the leftover sans-carrageenan fraction. *Nutrients*. 11(5): 1133.

Cunha, L. y Grenha, A. 2016. Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications. *Marine Drugs*, 14(3): 42.

Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani S., y Mozafari, M. R. 2018. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2): 57.

De Jesús-Campos, D., López-Elías, J. A., Medina-Juarez, L. Á., Carvallo-Ruiz, G., Fimbres-Olivarria, D., & Hayano-Kanashiro, C. (2020). Chemical composition, fatty acid profile and molecular changes derived from nitrogen stress in the diatom *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture Reports*. 16, 100281.

Decho, A. W. 1990. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their roles in food webs and marine processes. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. 28(7): 73-153.

Del Rio, A. R., Ramírez-Gilly, M., y Tecante, A. 2017. Flow properties of lambda carrageenan in aqueous systems. En: E. Shalaby (ed.). *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides*. InTechOpen, Londres, 229-250 pp.

Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., y Michaud, P. 2016. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology advances*. 34(7): 1159-1179.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*. 28(3): 350-356.

Fimbres-Olivarria, D., Carvajal-Millan, E., Lopez-Elias, J. A., Martinez-Robinson, K. G., Miranda-Baeza, A., Martinez-Cordova, L. R., Miranda-Baeza A., Martinez-Cordova L. R., Enriquez-Ocaña F., y Valdez-Holguin, J. E. 2018. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharides from *Navicula* sp. *Food Hydrocolloids*. 75: 229-236.

Fimbres-Olivarría, D., López-Elías, J. A., Carvajal-Millán, E., Márquez-Escalante, J. A., Martínez-Córdova, L. R., Miranda-Baeza, A., Enríquez-Ocaña F., Valdéz-Holguín J. E., y Brown-Bojórquez, F. 2016. *Navicula* sp. sulfated polysaccharide gels induced by Fe (III): rheology and microstructure. *International journal of molecular sciences*. 17(8): 1238.

Geresh, S., Adin, I., Yarmolinsky, E. y Karpasas, M. 2002. Characterization of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: Molecular weight determination and rheological properties. *Carbohydrate Polymers*. 50(2): 183-189.

Geresh, S., Mamontov, A. y Weinstein, J. 2002. Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 50(2-3): 179-187.

Glicksman M. 1987. Utilization of seaweed hydrocolloids in the food industry. *Hydrobiologia* 151: 31-47.

- Gropper, S. S., Smith, J. L., y Groff, J. L. 2009. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. Wadsworth Cengage Learning. Quinta edición. Belmont, Estados Unidos. 600pp.
- Guillard, R. R. L. y Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana hustedt*, and *Detonula confervacea* (CLEVE) gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2): 229-239.
- Guo, M. Q., Hu, X., Wang, C., y Ai, L. 2017. Polysaccharides: structure and solubility. En: Z. Xu (ed.). *Solubility of polysac-charides*. InTechOpen, Londres, 7-21 pp.
- Gügi, B., Le Costaouec, T., Burel, C., Lerouge, P., Helbert, W. y Bardor, M. 2015. Diatom-specific oligosaccharide and polysaccharide structures help to unravel biosynthetic capabilities in diatoms. *Marine drugs*, 13(9): 5993-6018.
- Hadj Ammar, H., Lajili, S., Ben Said, R., Le Cerf, D., Bouraoui, A., y Majdoub, H. 2015. Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation of sulfated polysaccharides from three species of Mediterranean brown algae of the genus *Cystoseira*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 23(1): 1-8.
- Hamed, I., Özogul, F., Özogul, Y. y Regenstein, J. M. 2015. Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review: Importance of functional seafood. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 14(4): 446-465.
- Hecky, R. E., Mopper, K., Kilham, P., y Degens, E. T. 1973. The amino acid and sugar composition of diatom cell-walls. *Marine biology*. 19(4): 323-331.
- Hentati, F., Tounsi, L., Djomdi, D., Pierre, G., Delattre, C., Ursu, A. V., Fendri I., Abdelkafi S., y Michaud, P. 2020. Bioactive polysaccharides from seaweeds. *Molecules*, 25(14): 3152.
- Hernandez, J., Goycoolea, F. M., Quintero, J., Acosta, A., Castañeda, M., Dominguez, Z., Robles R., Vazquez-Moreno L., Velazquez E. F., Astiazaran H., Lugo E., y Velazquez, C. 2007. Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta medica*. 73(14): 1469-1474.
- Hildebrand, M., Manandhar-Shrestha, K., y Abbriano, R. 2017. Effects of chrysolaminarin synthase knockdown in the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Implications of reduced carbohydrate storage relative to green algae. *Algal research*. 23: 66-77.
- Hou, W. C., Hsu, F. L. y Lee, M. H. 2002. Yam (*Dioscorea batatas*) tuber mucilage exhibited antioxidant activities in vitro. *Planta Medica*. 68 (12): 1072-1076.
- Huntsman, S. A., y Sloneker, J. H. 1971. An exocellular polysaccharide from the diatom *gomphonema olivaceum*. *Journal of Phycology*. 7(3): 261-264.
- Ibrahim, M. I., Amer, M. S., Ibrahim, H. A., y Zaghloul, E. H. 2022. Considerable Production of Ulvan from *Ulva lactuca* with Special Emphasis on Its Antimicrobial and Anti-fouling Properties. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1-22.
- John, B. D. M. 1994. Alternation of generations in algae: its complexity, maintenance and evolution. *Biological Reviews*. 69(3): 275-291.
- Khan, T., Date, A., Chawda, H. y Patel, K. 2019. Polysaccharides as potential anticancer agents A review of their progress. *Carbohydrate Polymers*. 210: 412-428.
- Kraan, S. 2012. *Algal Polysaccharides, Novel Applications and Outlook*. En C. F. Chang (Ed.),

Carbohydrates Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology. InTechOpen, Londres, 489 pp.

- Lai, H. L., Yang, L. C., Lin, P. T., Lai, S. Y., y Wang, M. Y. 2020. Phagocytosis activity of three sulfated polysaccharides purified from a marine diatom cultured in a semi-continuous system. *International journal of biological macromolecules*. 155: 951-960.
- Le Costaouëc, T., Unamunzaga, C., Mantecon, L. y Helbert, W. 2017. New structural insights into the cell-wall polysaccharide of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research*. 26: 172-179.
- Lee R.E. 2008. *Phycology*. Cambridge university press. Cuarta edición. Nueva York. 645 pp.
- Li, X., Xie, Q., Huang, S., Shao, P., You, L. y Pedisić, S. 2021. Digestion & fermentation characteristics of sulfated polysaccharides from *Gracilaria chouae* using two extraction methods in vitro and in vivo. *Food Research International*. 145: 110406.
- Lu, L.W.; Chen, J.-H. Seaweeds as Ingredients to Lower Glycemic Potency of Cereal Foods Synergistically—A Perspective. *Foods*. 2022, 11, 714.
- Lobus, N. V., Kulikovskiy, M. S., y Maltsev, Y. I. 2021. Multi-Element Composition of Diatom *Chaetoceros* spp. from Natural Phytoplankton Assemblages of the Russian Arctic Seas. *Biology*. 10(10): 1009.
- López-Elías, J. A., Voltolina, D., Enríquez-Ocaña, F. y Gallegos-Simental, G. 2005. Indoor and outdoor mass production of the diatom *Chaetoceros muelleri* in a mexican commercial hatchery. *Aquacultural Engineering*. 33(3): 181–191.
- Lordan, S., Ross, R. P., y Stanton, C. 2011. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Marine drugs*. 9(6): 1056-1100.
- Malibari, R., Sayegh, F., Elazzazy, A. M., Baeshen, M. N., Dourou, M., y Aggelis, G. 2018. Reuse of shrimp farm wastewater as growth medium for marine microalgae isolated from Red Sea Jeddah. *Journal of Cleaner Production*. 198: 160–169.
- Meyer, D. E. y Chilkoti, A. 2002. Genetically encoded synthesis of protein-based polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive directional ligation: examples from the elastin-like polypeptide system. *Biomacromolecules*. 3(2): 357-367.
- Ntie-Kang, F. y Svozil, D. 2020. An enumeration of natural products from microbial, marine and terrestrial sources. *Physical Sciences Reviews*, 5(8).
- Norton, T. A., Melkonian, M., y Andersen, R. A. 1996. Algal biodiversity. *Phycologia*. 35(4): 308-326.
- OECD (2016), *The Ocean Economy in 2030*, OECD Publishing, Paris. 256 pp.
- O’Sullivan, L., Murphy, B., McLoughlin, P., Duggan, P., Lawlor, P. G., Hughes, H. y Gardiner, G. E. 2010. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. *Marine drugs*. 8(7): 2038-2064.
- Orvain, F., Galois, R., Barnard, C., Sylvestre, A., Blanchard, G., y Sauriau, P. G. 2003. Carbohydrate production in relation to microphytobenthic biofilm development: an integrated approach in a tidal mesocosm. *Microbial ecology*. 45(3): 237-251.
- Pangestuti, R. y Kim, S. K. 2014. Biological Activities of Carrageenan. *Advances in Food and*

Nutrition Research, 72: 113-124.

- Pereira, L., Gheda, S. F., y Ribeiro-Claro, P. J. 2013. Analysis by vibrational spectroscopy of seaweed polysaccharides with potential use in food, pharmaceutical, and cosmetic industries. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2013.
- Pielesz, A. 2014. Temperature-dependent FTIR spectra of collagen and protective effect of partially hydrolysed fucoidan. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 118, 287-293.
- Rahmadi, A., Mulyani, Y. y Lewaru, M. W. 2020. Effect of salinity difference on lipid content from *Chaetoceros muelleri* on continuous reactors. *Advanced Journal of Graduate Research*, 7(1): 3–10.
- Raposo, M. F., De Morais, A. M. B., y De Morais, R. M. S. C. 2015. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine drugs*. 13(5): 2967-3028.
- Raposo, M., De Morais, R. y Bernardo de Morais, A. 2013. Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Marine Drugs*. 11(1): 233-252.
- Rengasamy, K. R., Mahomoodally, M. F., Aumeeruddy, M. Z., Zengin, G., Xiao, J. y Kim, D. H. 2020. Bioactive compounds in seaweeds: An overview of their biological properties and safety. *Food and Chemical Toxicology*. 135: 111013.
- Rengasamy, K. R., Kulkarni, M. G., Stirk, W. A., y Van Staden, J. 2014. Advances in algal drug research with emphasis on enzyme inhibitors. *Biotechnology advances*. 32(8): 1364-1381.
- Saboural, P., Chaubet, F., Rouzet, F., Al-Shoukr, F., Azzouna, R.B., Bouchemal, N., Picton, L., Louedec, L., Maire, M. y Rolland, L. 2014. Purification of a low molecular weight fucoidan for spect molecular imaging of myocardial infarction. *Marine Drugs*. 12: 4851–4867.
- Shao, P., Chen, M., Pei, Y. y Sun, P. 2013. In vitro antioxidant activities of different sulfated polysaccharides from chlorophyta seaweeds *Ulva fasciata*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 59: 295–300.
- Shi, L. 2016. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. *International journal of biological macromolecules*. 92: 37-48.
- Shnyukova, E. I. y Zolotariova, Y. K. 2015. Diatom exopolysaccharides: a review. *International Journal on Algae*. 17(1).
- Singh, J., y Saxena, R. C. 2015. An introduction to microalgae: diversity and significance. In Kim SK (ed) *Handbook of marine microalgae: biotechnology advances*. Academic Press. Amsterdam. 11-24 pp.
- Stehfest, K., Toepel, J. y Wilhelm, C. 2005. The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 717–726.
- Stiger-Pouvreau, V., y Zubia, M. 2020. Macroalgal diversity for sustainable biotechnological development in French tropical overseas territories. *Botanica Marina*. 63(1): 17-41.
- Sun, T., Tao, H., Xie, J., Zhang, S. y Xu, X. 2010. Degradation and antioxidant activity of k-carrageenans. *Journal of Applied Polymer Science*. 117: 194–199.
- Tang, D. Y. Y., Khoo, K. S., Chew, K. W., Tao, Y., Ho, S. H. y Show, P. L. 2020. Potential

utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products. *Bioresource technology*. 304: 122997.

- Tesson, B., Genet, M. J., Fernandez, V., Degand, S., Rouxhet, P. G., y Martin-Jézéquel, V. 2009. Surface chemical composition of diatoms. *ChemBioChem*. 10(12): 2011-2024.
- Tiwari, A., Melchor-Martínez, E. M., Saxena, A., Kapoor, N., Singh, K. J., Saldarriaga-Hernández, S., Parra-Saldívar R., y Iqbal, H. M. 2021. Therapeutic attributes and applied aspects of biological macromolecules (polypeptides, fucoxanthin, sterols, fatty acids, polysaccharides, and polyphenols) from diatoms—a review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 171: 398-413.
- Tseng, C. K. 2001. Algal biotechnology industries and research activities in China. *Journal of Applied Phycology*. 13(4): 375-380.
- Underwood, G. J., y Paterson, D. M. 2003. The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipelagic diatoms. *Advances in botanical research*. 40: 183-240.
- Van den Hoek, C., Mann, D. G. y Jahns, H. M. 1995. *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge University Press. Cambridge. 1995, pp.
- Veciana Galindo, C., Cortés Castell, E., Torro Montell, L., Sirvent Segura, E., Rizo Baeza, M. M., y Gil Guillén, V. 2014. Evaluación de la citotoxicidad y bioseguridad de un extracto de polifenoles de huesos de aceitunas. *Nutrición Hospitalaria*. 29(6): 1388-1393.
- Venugopal, V. 2008. *Marine Products for Healthcare: Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds from the Ocean*, CRC Press and Taylor & Francis Group. Boca Raton, Florida. pp.
- Vuppaladadiyam, A. K., Prinsen, P., Raheem, A., Luque, R. y Zhao, M. 2018. Microalgae cultivation and metabolites production: a comprehensive review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 12(2): 304-324.
- Wang, X., Liang, J., Luo, C., Chen, C. y Gao, Y. 2014. Biomass, total lipid production, and fatty acid composition of the marine diatom *Chaetoceros muelleri* in response to different CO₂ levels. *Bioresource Technology*. 161: 124–130.
- Wijesekara, I., Pangestuti, R. y Kim, S. K., 2011. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*. 84: 14–21.
- Yi, T., Shan, Y., Huang, B., Tang, T., Wei, W. y Quinn, N. W. 2020. An efficient *Chlorella* sp.-*Cupriavidus necator* microcosm for phenol degradation and its cooperation mechanism. *Science of the Total Environment*. 743: 140775.
- Zaporozhets, T. S., Besednova, N. N., Kuznetsova, T. A., Zvyagintseva, T. N., Makarenkova, I. D., Kryzhanovsky, S. P. y Melnikov, V. G. 2014. The prebiotic potential of polysaccharides and extracts of seaweeds. *Russian journal of marine biology*. 40(1): 1-9.