



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

**OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN PARCIAL Y
EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y
ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS LIPÍDICOS DE *Isochrysis*
*galbana***

Por:

Dianelys Ochoa Sicilia

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Dianelys Ochoa Sicilia la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. Maricela Montalvo Corral
Directora de Tesis



Dr. Alexel Jesús Burgara Estrella
Co-director de Tesis



Dra. Silvia Moya Camarena
Integrante del comité de tesis

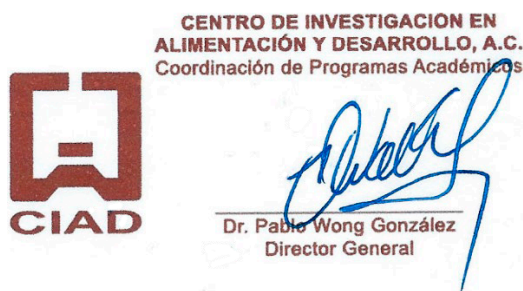


Dra. Araceli Pinelli Saavedra
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Obtención, Caracterización Parcial y Evaluación de Actividad Antiinflamatoria y Antioxidante de Extractos Lipídicos de *Isochrysis galbana*” 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 Dianelys Ochoa Sicilia, 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 manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por permitirme realizar mis estudios de maestría y poder alcanzar una meta importante en mi formación.

A mis directores de tesis la Dra. Maricela Montalvo y el Dr. Alexel Burgara primeramente por aceptarme y por sus sabios y valiosos consejos, por todo el tiempo que me dedicaron y el conocimiento que me transmitieron. A los miembros de mi comité las doctoras Silvia Moya y Araceli Pinelli por sus correcciones y sus consejos y al Dr. Héctor Parra por su apoyo y sus consejos.

A la Dra. Miriam Gracida Valdepeña, Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta, M.B. Edgar Sandoval del laboratorio de Biología Celular del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) por las facilidades de acceso a instalaciones y su apoyo incondicional y asesorías. A la Dra. Carmen María López Saiz del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora (DIPA) por abrirme las puertas de su laboratorio y asesorarme en análisis de capacidad antioxidante. A sus estudiantes Carolina, Dania y Martín por su valioso apoyo. A mis compañeros del laboratorio de Biofísica Médica del Departamento de Investigación en Física de la Universidad de Sonora (DIFUS), especialmente a Nayelly y Kevin por su tiempo y ayuda; y a la Dra. Osiris Álvarez Bajo por su apoyo en el análisis estadístico.

A toda mi familia y amigos, los que están cerca y lejos por sus palabras de ánimo. A mi esposo José Carlos por su ayuda incondicional y por el ser el impulsor de mi vida. A mi princesa Isabel por toda la paciencia que tuvo para que mamá estudiara. A mi madre Rosa Midelmis por ser mi fuente de inspiración y mi padre Eduardo por su confianza en mí. A mi hermano Omar por demostrarme que se puede. A mis pastores Luis y Verónica y a Raquel y Rebeca por abrirme sus puertas, por darme su apoyo. A mi amiga Gretel, por ser mi compañera en esta travesía, por escucharme y animarme. Por último, pero más importante, a mi Señor y Salvador Jesucristo por traerme hasta aquí, puedo decir, Ebenezer.

DEDICATORIA

A todos los colaboradores, mis asesores y maestros

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA.....	5
CONTENIDO.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE CUADROS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
ANTECEDENTES.....	13
2.1. Respuesta Inflamatoria.....	13
2.1.1 Generalidades de la Respuesta Inflamatoria	14
2.1.2 Características Fenotípicas de los Macrófagos.....	15
2.1.3 Principales Componentes Moleculares de la Respuesta Inflamatoria	16
2.2 Estrés Oxidativo.....	17
2.2.2 Agentes Oxidantes.....	17
2.2.3 Regulación Redox.....	19
2.3 Relación entre los Mecanismos Antioxidantes y Antiinflamatorios.....	20
2.4 Beneficio de Moléculas Antioxidantes y Antiinflamatorias.....	21
2.5 Microalgas como Fuente de Productos Bioactivos	22
2.5.1 Compuestos Lipídicos Provenientes de Microalgas	23
2.5.1.1 Carotenoides.....	24
2.5.1.2 Ácidos Grasos Poliinsaturados (PUFA).....	24
2.6 <i>Isochrysis galbana</i>	27
2.6.1. Efecto Antiinflamatorio de Extractos y Fracciones	27
3. HIPÓTESIS.....	30
4. OBJETIVOS.....	31
4.1. General.....	31
4.2. Particulares.....	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
5.1 Cultivo y Curva de Crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i>	32
5.2 Obtención de Biomasa.....	32
5.3 Obtención de Extractos.....	33
5.4 Caracterización del Extracto de Hexano	33
5.5 Evaluación de la Actividad Antioxidante.....	34

CONTENIDO (continuación)

5.5.1. Determinación Actividad de Atrapamiento con el Ensayo de Radicales de Ácido 2,2'-Azino-bis (3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico (ABTS)	35
5.5.2. Actividad de Atrapamiento de Radicales Libres por el Ensayo de Radicales 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil(DPPH).....	35
5.6. Cultivo y Mantenimiento de la Línea RAW 264.7.....	35
5.7. Ensayo de Actividad Metabólica (MTT) Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-Difeniltetrazol	36
5.8. Evaluación de la Producción de Óxido Nítrico.....	36
5.9. Análisis Estadístico.....	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
6.1. Cultivo y curva de crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i>	37
6.2. Obtención de la biomasa.....	40
6.3. Obtención de los extractos lipídicos.....	41
6.4. Caracterización del perfil de ácidos grasos del extracto de hexano.....	43
6.5. Evaluación de la actividad antioxidante.....	46
6.5.1 Determinación actividad de Atrapamiento con el Ensayo de Radicales de Acido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS).....	46
6.5.2 Actividad de Atrapamiento de Radicales Libres por el Ensayo de Radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).....	48
6.6 Evaluación de la Citotoxicidad de los Extractos con el Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).....	49
6.7. Evaluación de la producción de Óxido Nítrico.....	52
7. CONCLUSIÓN.....	54
8. RECOMENDACIONES.....	55
9. REFERENCIAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Curva de crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i>	38
2	Escalado del cultivo para obtención de biomasa	41
3	Obtención de extractos	43
4	Evaluación de la actividad antioxidante mediante la técnica ABTS.....	47
5	Evaluación de la actividad antioxidante mediante la técnica DPPH.....	49
6	Ensayo de Actividad citotóxica.....	50
7	Inhibición de la producción de Óxido nítrico.....	53

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Efecto antiinflamatorio y antioxidante de extractos en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS	22
2	Condiciones del cromatógrafo de gases para la determinación de ácidos grasos	34
3	Composición de ácidos grasos de la fracción obtenida con hexano	44

RESUMEN

Las microalgas son una fuente importante de moléculas de interés biomédico y nutricional como los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). En la búsqueda de compuestos con actividad antiinflamatoria y antioxidante, el interés en ellas ha aumentado. *Isochrysis galbana* es conocida por su alto contenido de PUFAs y otras sustancias bioactivas por lo que es considerada como fuente de productos nutracéuticos y alimento funcional. En este trabajo se obtuvieron extractos de *I. galbana* ricos en compuestos lipídicos y evaluó su composición y actividad biológica. Para ello, se realizó la curva de crecimiento de *I. galbana*, para identificar sus etapas de crecimiento. A partir de la biomasa se realizó la extracción de lípidos con solventes, obteniendo los extractos de hexano (Ext H) y acetato de etilo (Ext A). La composición de ácidos grasos se determinó mediante cromatografía de gases. Se determinó la actividad antioxidante mediante los ensayos de radicales libres ABTS y DPPH. El efecto citotóxico fue evaluado en macrófagos RAW 264.7 mediante el ensayo de actividad metabólica (MTT). La capacidad antiinflamatoria se midió determinando el efecto de los extractos sobre la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. Se obtuvieron 6,98 g de biomasa para un rendimiento de 0.99 g/L. El rendimiento del Ext H fue 472 mg (15%) de lípidos y el Ext A de 142.1 mg (4.75%) de lípidos. Del total de ácidos grasos el 31.76 % fueron saturados, 22.5 % monoinsaturados y el 35 % PUFAs, de estos el 12.78% fueron n-3 y el 22.95% n-6 para una relación n-6/n-3 de 1.8. El potencial antioxidante del Ext A fue mayor que el Ext H mediante las dos técnicas siendo 219.3 $\mu\text{mol/g}$ Trolox y 65 $\mu\text{mol/g}$ Trolox a 500 $\mu\text{g/mL}$ por ABTS y DPPH, respectivamente. El extracto H tuvo mayor efecto citotóxico con un 61.5 ± 4.1 % de viabilidad, mientras que con el extracto A se obtuvo 98.6 ± 1.7 % a 1.25 $\mu\text{g/mL}$. El extracto A no tuvo efecto sobre la producción de NO en macrófagos estimulados con LPS, mientras que el extracto H provocó un aumento en la producción de NO de 7.5 ± 4.2 $\mu\text{M/mL}$ hasta 26.04 ± 2.56 $\mu\text{M/mL}$. No se comprobó la actividad antiinflamatoria de los extractos, sino un efecto inmunoestimulante. Estos hallazgos pudieran relacionarse a la relación n-6/n-3 y otras moléculas presentes en los extractos que pueden ser de interés y requieren mayor estudio.

Palabras claves: *Isochrysis galbana*, PUFAs, actividad antioxidante, capacidad antiinflamatoria

ABSTRACT

Microalgae are an important source of molecules of biomedical and nutritional interest such as polyunsaturated fatty acids (PUFAs). In the search for compounds with anti-inflammatory and antioxidant activity, interest in them has increased. *Isochrysis galbana* is known for its high content of PUFAs and other bioactive substances, which is why it is considered a source of nutraceutical products and functional food. The aim of this work was to obtain extracts of *I. galbana* rich in lipid compounds were obtained and their composition and biological activity were evaluated. The growth curve of *I. galbana* was made, to identify its growth stages. Solvent extraction of lipids was carried out from the biomass, obtaining the extracts of hexane (Ext H) and ethyl acetate (Ext A). The fatty acid composition was determined by gas chromatography. Antioxidant activity was determined by ABTS and DPPH free radical assays. The cytotoxic effect was evaluated in RAW 264.7 macrophages by the metabolic activity assay (MTT). The anti-inflammatory capacity was measured by determining the effect of the extracts on the production of nitric oxide (NO) in RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS. 6.98 g of biomass were obtained for a yield of 0.99 g / L. The yield of Ext H was 472 mg (15%) of lipids and Ext A 142.1 mg (4.75%) of lipids. Of the total fatty acids, 31.76% were saturated, 22.5% monounsaturated and 35% PUFAs, of these 12.78% were n-3 and 22.95% were n-6 for a n-6 / n-3 ratio of 1.8. The antioxidant potential of Ext A was higher than Ext H by the two techniques, being 219.3 $\mu\text{mol} / \text{g}$ Trolox and 65 $\mu\text{mol} / \text{g}$ Trolox at 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ by ABTS and DPPH, respectively. Extract H had a greater cytotoxic effect with $61.5 \pm 4.1\%$ viability, while extract A obtained $98.6 \pm 1.7\%$ at 1.25 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Extract A had no effect on NO production in macrophages stimulated with LPS, while extract H caused an increase in NO production from $7.5 \pm 4.2 \mu\text{M} / \text{mL}$ to $26.04 \pm 2.56 \mu\text{M} / \text{mL}$. The anti-inflammatory activity of the extracts was not verified, but an immunostimulating effect. These findings could be related to the n-6 / n-3 ratio and other molecules present in the extracts that may be of interest and require further study.

Keywords: *Isochrysis galbana*, PUFAs, antioxidant capacity, anti-inflammatory capacity

1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas representan una excelente fuente de nuevos productos naturales pues tienen una enorme diversidad genética y bioquímica (Keewan y Naser, 2020). En específico, *Isochrysis galbana* es producida industrialmente como una importante fuente de alimento y aditivos para piensos en la acuicultura (Bonfanti *et al.* 2018). Además, su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, proteínas, carbohidratos, vitaminas y otros componentes, la sitúa como una excelente opción para la dieta humana (Heo *et al.* 2012). Aunado a la calidad nutricional, algunas fracciones y compuestos de esta microalga han mostrado actividad biológica como antioxidante, antimicrobiana e inmunomoduladora (Hafsa *et al.* 2017; Matos *et al.* 2019; Riccio *et al.*, 2020), lo que podría convertirla en un alimento funcional.

La inflamación y el estrés oxidativo son parte esencial de la respuesta inmune. Sin embargo, aunque ambos son esenciales para la protección, su desregulación puede ser nociva para el organismo. La inflamación prolongada y descontrolada, también conocida como crónica, se asocia al envejecimiento y a enfermedades neurodegenerativas, coronarias, intestinales, vasculares, artritis reumatoide, obesidad (Hafsa *et al.* 2017; Sanz *et al.* 2017) y cáncer (Krausgruber *et al.* 2011). Por otro lado, el estrés oxidativo crónico, afecta a una amplia variedad de funciones fisiológicas y participan en el desarrollo de enfermedades de tipo crónico-degenerativas (Sies *et al.* 2017). La pandemia actual causada por el virus SARS-CoV-2 muestra el riesgo de estas enfermedades pre-existentes y el desenlace en las infecciones (Jordan *et al.* 2020). Por ello, es fundamental la búsqueda de nuevos compuestos que activen las vías antiinflamatorias y antioxidantes, que puedan prevenir o tratar estas patologías.

El empleo de nutraceuticos y alimentos funcionales es una estrategia cada vez más abordada en la literatura y la evidencia de que estas modificaciones dietarias pueden disminuir considerablemente la inflamación crónica *in vitro* y en modelos animales y humanos va en aumento (Marcos *et al.* 2003; Giugliano *et al.* 2006). En este contexto, en este trabajo se analizaron extractos de *Isochrysis galbana* con el objetivo de evaluar el efecto antioxidante y antiinflamatorio en macrófagos RAW 264.7.

2. ANTECEDENTES

2.1. Respuesta Inflamatoria

El sistema inmune cuenta con un complejo sistema de moléculas, células y órganos que actúan coordinadamente para montar una respuesta contra agentes extraños detectados por el mismo. Dentro de las funciones del sistema inmune destacan la defensa contra agentes infecciosos, la inmunovigilancia contra la emergencia de tumores y de enfermedades autoinmunes y alérgicas (Toche, 2012). Para la mejor comprensión del sistema inmune se divide en dos grandes grupos: la respuesta innata y la respuesta adaptativa. El tiempo de respuesta, la especificidad de reconocimiento, la presencia de recombinación genética, tipos de receptores y la presencia o no de memoria marca la diferencia entre una y otra. Sin embargo, ambas actúan de forma integrada para conformar la respuesta inmune donde la inmunidad innata es la primera línea de defensa, reconociendo y eliminando agentes patógenos, al mismo tiempo que se procesa y presentan antígenos para la activación de la inmunidad adaptativa. De este modo, se trabaja en conjunto para orquestar una respuesta más contundente y específica (Abbas *et al.* 2012).

Dentro del sistema inmune se encuentra la respuesta inflamatoria, la cual consiste en eventos organizados y dinámicos que se activan ante la presencia de patógenos o daño tisular (Abdulkhaleq *et al.* 2018). El primer paso para desencadenar una respuesta inflamatoria es el reconocimiento de un antígeno lo suficientemente inmunogénico para activarla. Las células de la inmunidad innata residentes en los tejidos reconocen los antígenos mediante los receptores de reconocimiento de patógenos y daño (PRRs) que las mismas expresan y detectan los patrones moleculares asociados a patógenos y daño (PAMPs y DAMPs respectivamente) de los antígenos. Entre las moléculas que reconocen se encuentran ácidos nucleicos, lipoproteínas y carbohidratos. Células como los macrófagos residentes en tejidos y mastocitos producen una variedad de mediadores inflamatorios tales como quimiocinas, citocinas, aminas vasoactivas, eicosanoides y productos de cascadas proteolíticas que promueven la inflamación (Newton y Dixit, 2012).

Las alteraciones vasculares son esenciales para la liberación de líquidos desde los vasos sanguíneos hacia los tejidos causando inflamación y aislando al antígeno del contacto posterior con tejidos

corporales, ya que las células del tejido dañado producen histamina, prostaglandinas, óxido nítrico que promueve vasodilatación. Con esto aumenta el flujo sanguíneo, lo cual favorece la llegada de leucocitos y mediadores inflamatorios que a su vez actúan a nivel de las membranas de las células endoteliales para aumentar la vascularidad y permitir así la entrada de proteínas plasmáticas (Sanz *et al.* 2017). Estos eventos de movilización están mediados por moléculas de adhesión celular (CAMs, por sus siglas en inglés), entre ellas ICAM-1 y 2, integrinas y selectinas. La unión de éstas y sus ligandos entre las células endoteliales e inmunes hace que éstas últimas disminuyan su velocidad de tránsito facilitando su llegada al sitio de infección o daño (Sugimoto *et al.* 2019).

Aunque la confluencia de células y moléculas producto de la inflamación es esencial para la protección, su llegada y función excesiva e incontrolada puede ser nociva provocando lesiones tisulares e incluso disfunción orgánica. Para evitar esto, el inicio de la inflamación es paralela a una serie de eventos destinados a equilibrar y controlar la respuesta inflamatoria, que idealmente conduce a la resolución de la misma. Uno de estos es la expresión de receptores co-inhibitorios entre ellos el gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3), proteína 1 de muerte celular programada (PD-1) y la proteína 4 asociada a linfocitos citotóxicos (CTLA-4) (Serhan y Savill, 2005). Sin embargo, el estrés, la dieta o las enfermedades crónicas, causan que esta movilización de células y moléculas se mantenga en el tiempo, al proveer estímulos que mantienen activos los mecanismos de respuesta inflamatoria.

2.1.1. Generalidades de la Respuesta Inflamatoria

La respuesta inflamatoria se compone de células como los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y mastocitos), monocitos, macrófagos, subpoblaciones de células dendríticas, células de Langerhans y las células citotóxicas naturales (NK). Estas se distribuyen en el organismo de tal forma que aumenta la eficiencia defensiva. De esta forma, los mastocitos, macrófagos y células dendríticas se encuentran en forma de células centinela detectando antígenos de la dermis, las mucosas, entre otros. Los neutrófilos, eosinófilos y basófilos circulan en el torrente sanguíneo, los cuales son llamados al sitio de infección mediante la producción de citocinas y quimiocinas lo que permite su migración al sitio de interés. Al reconocer antígenos mediante los PRRs, este tipo de células se

activan y como consecuencia producen especies reactivas del oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), prostaglandinas y más citocinas proinflamatorias (Sanz *et al.*, 2017).

Los macrófagos juegan un papel fundamental tanto en la respuesta innata como en la adaptativa. Son células versátiles cuya función no es sólo la defensa del organismo sino también la homeostasis tisular. Expresan una alta densidad de PRRs y responden rápidamente a la presencia de patógenos y estímulos variables para iniciar la inmunidad innata. También presentan el antígeno a linfocitos T para iniciar los mecanismos de la inmunidad adaptativa. Además, secretan alrededor de 100 tipos de proteínas (enzimas, citocinas, quimiocinas, receptores y factores de crecimiento y transcripción) que median la defensa y la inflamación del huésped. También participan en la regulación de la inflamación recurriendo al reemplazo y remodelado de tejidos mediante la eliminación de los cuerpos apoptóticos, de los neutrófilos muertos o daños en los tejidos (Davanzo *et al.* 2020; Gordon *et al.*, 2014).

2.1.2. Características Fenotípicas de los Macrófagos

Los macrófagos se encuentran en la mayoría de los tejidos y su número aumenta durante la inflamación, enfermedades autoinmunitarias y el cáncer (Gordon *et al.*, 2014). Sus células progenitoras son las CD34⁺ en la médula ósea, que se diferencian en monoblastos y luego en promonocitos, y finalmente en monocitos que se liberan en el torrente sanguíneo. Los monocitos se diferencian a macrófagos en presencia del factor estimulante de colonias de macrófagos y las señales ambientales (Hume, 2008).

Los macrófagos pueden adquirir distintos fenotipos funcionales en respuesta a diversas señales ambientales (productos microbianos, células dañadas, linfocitos activados) o bajo diferentes condiciones fisiopatológicas. Estos fenotipos son: el M1 (clásicamente activado) y el M2 (alternativamente activado). Productos microbianos como el lipopolisacárido (LPS) o citocinas proinflamatorias como el interferón IFN- γ o el factor de necrosis tumoral (TNF) estimulan el fenotipo M1, que es característico de una alta presentación de antígenos, una alta producción de citocinas IL-12 e IL-23 y una alta producción de óxido nítrico (NO) y ROS. Los macrófagos de tipo M1 están involucrados en la eliminación de patógenos intracelulares y la resistencia a los

tumores. La activación crónica de macrófagos M1 pueden causar daño tisular, especialmente en condiciones asépticas. Por su parte, los macrófagos M2 activados son efectores de resistencia a los parásitos, tienen propiedades inmunorreguladoras y orquestan la reparación y remodelación de tejidos. Si bien el fenotipo M1 es importante para la resolución de las infecciones y daño tisular, si el fenotipo no cambia de M1 a M2, la producción excesiva de los mediadores proinflamatorios puede causar el desarrollo de enfermedades inflamatorias (Krausgruber *et al.*, 2011).

2.1.3. Principales Componentes Moleculares de la Respuesta Inflamatoria

Las citocinas tienen múltiples efectos sobre las células endoteliales vasculares, los leucocitos y la médula ósea. Dentro de las principales citocinas proinflamatorias se encuentran el TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12, producidas principalmente por macrófagos y mastocitos. Estas aumentan la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas, así como la producción de neutrófilos, incrementando así las células que pueden ser reclutadas. También promueven la síntesis de otras citocinas como el IFN- γ , la cual es muy importante para la activación de las células citotóxicas que eliminan el patógeno (Abdulkhaleq *et al.*, 2018).

El efecto de estas citocinas puede ser endocrino, paracrino y autocrino, lo que significa que van a actuar a nivel de órganos como la médula ósea y el hígado, en otras células circundantes como las del endotelio y en las mismas células productoras. De esta forma la respuesta inmune se potencia y coordina, por lo tanto, los niveles de estas citocinas en el organismo están altamente regulados. Una vez eliminado el antígeno, los receptores de patógenos ya no tienen el estímulo del mismo lo que conlleva a la inactivación de las vías de señalización que promueve la producción de citocinas pro inflamatorias. Sin embargo, se promueve la síntesis de citocinas con efecto antiinflamatorio. El balance entre ambas es muy importante. No obstante, este balance puede verse afectado debido a patologías, la dieta y el estilo de vida. De este modo, es necesario encontrar formas alternativas de reestablecer este balance mediante productos o alimentos, por lo que existe interés científico en manipular ya sea potenciando, inhibiendo o dirigiendo la respuesta inmune (Giugliano *et al.*, 2006).

Dentro de los componentes moleculares de la respuesta inflamatoria también se encuentran las

enzimas. Estas tienen un papel fundamental, ya que sintetizan moléculas y regulan vías de señalización fundamentales en la inflamación y su regulación. Entre las enzimas claves involucradas en la respuesta inmune se encuentra la ciclooxigenasa 2 (COX 2). Esta enzima sintetiza importantes mediadores biológicos llamados prostanoideos (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos) a partir de derivados del metabolismo del ácido araquidónico que causan dolor, hinchazón y rigidez. Es producida por macrófagos activados y otras células en el sitio de la inflamación (Sarkar *et al.* 2008). La inhibición de la COX-2 puede aliviar los síntomas de la inflamación y dolor. Es un blanco para la regulación a nivel farmacológico y se ha demostrado en estudios *in vitro* que el efecto antiinflamatorio de compuestos de origen natural pasa por la inhibición de esta enzima (Attiq *et al.* 2018).

Otra familia de enzimas importantes durante la inflamación son las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK, por sus siglas en inglés). La regulación de rutas de señalización y el metabolismo en general depende de la activación o inhibición de sus enzimas mediante su fosforilación o desfosforilación de ahí que estas enzimas sean tan importantes. Por ejemplo, la activación del factor de transcripción NF- κ B, que termina en la expresión moléculas y citocinas proinflamatorias, depende de la fosforilación de la proteína inhibitoria I κ B-a por la IKKb. La vía de señalización de las MAPK en los macrófagos es una de las cascadas de señalización intracelular más investigadas involucrada en respuestas proinflamatorias inducidas por LPS, convirtiéndolas así en blancos para la generación de respuestas antiinflamatorias (Mo *et al.*, 2014).

2.2. Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo (EO) es una alteración en el equilibrio entre los radicales libres generados como resultado de reacciones metabólicas y la capacidad antioxidante en los sistemas vivos con capacidad de oxidar biomoléculas (lípidos, proteínas, ADN) provocando modificaciones en su estructura e inhibiendo su función normal. El establecimiento del EO afecta a una amplia variedad de funciones fisiológicas y participa en el envejecimiento y en el desarrollo de enfermedades de tipo crónico-degenerativas con impacto epidemiológico. Entre estas enfermedades se encuentran las generadas por pro-oxidantes que modifican el estado redox y alteran la tolerancia a la glucosa,

favoreciendo el EO mitocondrial en enfermedades como el cáncer y la diabetes mellitus (Forbes-Hernández *et al.* 2014). Por otro lado, se encuentran las que se deben a EO de tipo inflamatorio y una mayor actividad de la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidasa (NADPH_{ox}) que conducen a la aterosclerosis e inflamación crónica (Sies *et al.*; 2017).

2.2.1. Agentes Oxidantes

Un radical libre es un átomo o molécula con uno o más electrones no apareados en el último orbital capaz de reaccionar con múltiples biomoléculas oxidándolas. Son producto del metabolismo celular y se pueden generar por fuentes exógenas como la exposición a rayos X, rayos UV, humo de tabaco y contaminación. Pueden tener efecto benéfico o perjudicial dependiendo fundamentalmente de la cantidad y del sitio donde son generados. Los efectos benéficos de las ROS se presentan a bajas concentraciones, participando en diferentes funciones fisiológicas de la célula como la defensa contra agentes infecciosos y la señalización celular. En estos casos, su generación está regulada además por el sistema de compartimentalización celular que permite que sean generados y actúen en un único sitio normalmente delimitado, como por ejemplo, los fagolisosomas. Por otra parte, el efecto nocivo se produce cuando se encuentran en cantidades elevadas generando el EO. Debido a esto, es importante resaltar que el equilibrio entre los efectos benéficos y perjudiciales de los radicales libres es un aspecto muy importante para los organismos vivos, el cual se logra mediante mecanismos de “regulación redox” a través de los sistemas de defensa y atrapadores de radicales libres (Valko *et al.*, 2007).

Las ROS provienen en gran parte del metabolismo energético, donde el O_2 debe aceptar 4 electrones para ser reducido totalmente a H_2O , sin embargo, se plantea que hasta el 2% de esta reacción puede ser incompleta. La incorporación de un solo electrón origina el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), que presenta un electrón desapareado y puede formarse además en cualquier sistema capaz de generar electrones libres y que cuente con la presencia de oxígeno como por ejemplo macrófagos, neutrófilos, leucocitos, fibroblastos y células del endotelio vascular. El radical hidropéroxido ($\text{HO}^{\cdot 2}$), es mucho más reactivo frente a biomoléculas y puede iniciar la peroxidación lipídica. El $\text{HO}^{\cdot 2}$ puede formar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), especie reactiva

generada por una reacción de dismutación catalizada por la enzima superóxido dismutasa. El H_2O_2 es transformado en el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), una especie mucho más reactiva en presencia de metales como hierro (Fe), cobre (Cu), cobalto (Co) y níquel (Ni) (Halliwell, 2007).

Entre las especies reactivas de nitrógeno (RNS), que pueden o no ser radicales libres, se encuentran los radicales óxido nítrico (NO) y dióxido de nitrógeno (NO_2) y los no radicales como el catión nitronio (NO^{2+}) y el peroxinitrito (ONOO^-). Dentro de las RNS, el NO es de gran importancia debido a que es una molécula de señalización que está involucrada en numerosos procesos biológicos como la inflamación, el control de la presión sanguínea, la inhibición de la agregación plaquetaria y en procesos de neurotransmisión. El NO se sintetiza enzimáticamente por medio de la óxido nítrico sintasa (NOS), una familia de enzimas con tres isoformas producto de tres genes distintos. La tipo I o neuronal (nNOS) y la tipo III o endotelial (eNOS) son constitutivas y su actividad está regulada por concentraciones intracelulares de calcio. La actividad de la isoforma tipo II o inducible (iNOS) es independiente de calcio y está regulada transcripcionalmente por citocinas como interferón γ o productos bacterianos como el LPS (Pedraza *et al.*; 2006).

2.2.2. Regulación Redox

Estos mecanismos de defensa son conocidos como sistema antioxidante, encargado de mantener el equilibrio de las reacciones de óxido-reducción y sobrevivencia celular. El sistema antioxidante incluye enzimas, secuestrantes de electrones y nutrientes, encargados de eliminar y reducir los efectos de las ROS. En el organismo existe un equilibrio entre las ROS y los sistemas de defensa, cuando éste se descompensa a favor de las ROS se establece en la célula el estrés oxidativo, considerado el componente central de diversas patologías humanas (Poljsak, 2011).

Para contrarrestar el efecto nocivo de los radicales libres, los organismos aerobios cuentan con sistemas de defensa antioxidante, que incluyen moléculas, enzimas y secuestradores químicos que previenen el daño oxidativo. Entre las enzimas se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx). Entre las moléculas secuestradoras se encuentran aquellas que se unen a los iniciadores del proceso oxidativo como el Fe y Cu que aceleran la formación de ROS, tal es el caso de las glicoproteínas que se unen al Fe transportándolo en el

torrente sanguíneo. También encontramos las que se unen a las especies reactivas e inhiben la cadena de reacción y propagación en la formación de radicales libres. Tal es el caso del ácido úrico, un producto del metabolismo de las purinas capaz de atrapar radicales peroxilo, alcoxilo, ROS e iones de Cu^+ y Fe^+ . Además, la bilirrubina es un producto secundario del metabolismo del grupo hemo con actividad antioxidante que inhibe la peroxidación lipídica en los sistemas celulares (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2018).

Los antioxidantes exógenos tienen un papel importante ya que pueden prevenir el EO o disminuirlo una vez establecido. La dieta es la mayor fuente de antioxidantes exógenos y microelementos para la síntesis de enzimas antioxidantes. En este sentido, varios metales (Cu, Zn, Se, Mn y Fe) participan como componentes o cofactores de enzimas, al igual que las vitaminas, ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, ácido fólico y PUFA's los cuales actúan como atrapadores de las ROS (Shalaby y Shanab, 2013).

2.3. Relación entre los Mecanismos Antioxidantes y Antiinflamatorios

La liberación de ROS y RNS por las células de la inmunidad innata como un mecanismo de eliminación de patógenos determina que los eventos moleculares durante la respuesta inflamatoria siempre están relacionados con el balance redox. De hecho, la respuesta inmune en general depende considerablemente de la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo (Lauridsen, 2019). Así por ejemplo el lipopolisacárido (LPS), componente principal de la membrana externa de bacterias Gram negativas y ligando del receptor de tipo Toll 4 (TLR4) aumenta considerablemente los niveles de ROS en varios tipos celulares, lo que resulta en una respuesta proinflamatoria. Los moduladores para el balance redox, aquí toman un papel importante como reguladores de la respuesta inflamatoria, ya que la disminución en la producción de ROS es una forma de suprimir las señales intracelulares proinflamatorias, por lo que las vías de señalización que llevan al aumento o disminución de ROS se han convertido en blancos de investigación (Dyson *et al.* 2011).

La relación entre los mecanismos de la respuesta inflamatoria y antioxidante se da a nivel transcripcional mediante la regulación cruzada entre las señales proinflamatorias con la activación del factor de transcripción nuclear κB (NF- κB por sus siglas en inglés) y señales antiinflamatorias

como la activación del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2 por sus siglas en inglés). La vía del NF- κ B promueve la producción de ROS y citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 α y β , TNF α y otras. Por otro lado, Nrf2 protege de la inflamación activando cascadas antioxidantes, mediante la unión a la secuencia elemento de respuesta antioxidante (ARE por sus siglas en inglés) (Mo *et al.*, 2014). Esta se localiza en la región del promotor de genes que codifican para enzimas destoxificantes y antioxidantes, relacionadas con la respuesta al estrés oxidativo. Entre ellas la flavoproteína NADPH:quinona oxidorreductasa 1 (NQO1), la glutatión S-transferasa (GST), la γ -glutamyl cisteina sintetasa (γ -GCS) y la hemo oxigenasa 1 (HO-1) entre otras (Fainstein, 2007).

2.4. Beneficio de Moléculas Exógenas como Antioxidantes y Antiinflamatorias

La dieta es fundamental para la incorporación de compuestos bioactivos, ya que una pobre alimentación puede comprometer la respuesta inmune provocando susceptibilidad a infecciones, también la composición de la misma puede favorecer un estado inflamatorio en el organismo (Marcos y Montero, 2003). Los casos de enfermedades inflamatorias debido a malnutrición son cada vez más comunes, llegando incluso a proporciones alarmantes, pero al mismo tiempo crece la evidencia de que modificaciones en la alimentación pueden disminuir considerablemente la inflamación crónica. Por ejemplo, los componentes antioxidantes de las frutas y verduras pueden tener efecto antiinflamatorio. Estudios observacionales han mostrado una asociación inversa entre la capacidad antioxidante dietaria, carotenoides séricos y vitaminas y marcadores de inflamación (Giugliano *et al.* 2006; Davanzo *et al.* 2020; Brighenti *et al.* 2005).

Dada la importancia de potenciar la respuesta antinflamatoria y antioxidante para la salud, existe una búsqueda activa e intensa de compuestos con esta capacidad. Existen múltiples reportes de compuestos con capacidad antioxidante y antiinflamatoria (Cuadro 1). En estos estudios, el efecto se mide con la disminución significativa de marcadores como IL-1 β , IL-6, NO, iNOS, TNF α , PGE2, COX-2, ROS y cinasas de la vía NF- κ B en macrófagos que previamente son estimulados con LPS y, por tanto, han tenido un aumento en estos marcadores. Uno de los modelos usados para estudiar la inflamación y el estrés oxidativo es la línea celular RAW 264.7. Estas son células del tipo monocito/macrófago murinas que fueron transformadas o immortalizadas por el virus de

leucemia Abelson (Taciak *et al.* 2018).

Cuadro 1. Efecto antiinflamatorio y antioxidante de moléculas exógenas en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS

Compuesto	Marcadores	Referencia
Extracto de fresa	↓ROS, ↓iNOS, ↓TNFα, ↓IL-6	Gasparrini <i>et al.</i> 2017
Extracto de semillas y raíces de <i>Platycodon grandiflorum</i>	↓NO, ↓TNFα, ↓PGE2, ↓COX-2, ↓IL-1β, ↓IL-6, ↓NF-κβ	Kim <i>et al.</i> 2020
Resveratrol (polifenol)	↓NO, ↓iNOS, ↓TNFα, ↓PGE2, ↓COX-2, ↓IL-1β	Zong <i>et al.</i> 2020
Ácido ursodeoxycólico	↓NO, ↓IL-1α y β, ↓IL-6, ↓NF-κβ, ↑IL-10	Ko <i>et al.</i> 2017
Ácido α-linolénico	↓ROS, ↓iNOS, ↓COX-2, ↓TNFα, ↓NF-κβ, ↓pMAPKs	Ren y Chung, 2007
Ácido Eicosapentanoico, Ácido Docosahexaenoico	↓COX-2, ↓iNOS, ↓IL-1β, ↓IL-6, ↓TNFα, ↑Nrf2	Wang <i>et al.</i> 2010
Berberina	↓NO, ↓COX-2, ↓ROS, ↓TNFα, ↓IL-6	Mo <i>et al.</i> 2014
Ácido Araquidónico, Ácido linoleico, Ácido α-Linolénico, Ácido Docosahexaenoico	↓ROS, ↓NO, ↓iNOS,	Ambrozova <i>et al.</i> 2010
Extracto etanólico de <i>Aurantiochytrium limacinum</i>	↓IL-1β, ↓IL-6, ↓TNFα, ↓NO	Takahashi <i>et al.</i> 2019

2.5. Microalgas como Fuentes de Productos Bioactivos

Las microalgas son un grupo muy diverso de microorganismos fotosintéticos con gran potencial biotecnológico debido a la variedad y cantidad de biomoléculas que pueden sintetizar. Pueden ser fácilmente cultivables independientemente de la escala, se han adaptado a vivir en agua dulce y salada y su productividad no está marcada por las estaciones o el clima (Priyadarshani y Rath, 2012). Por estas características, se han empleado en la industria química como fuente de sustancias bactericidas (Al-Saif *et al.* 2014). En la industria cosmética, en el desarrollo de cremas y cosméticos que suministran nutrientes a la piel y aumentan la tasa de regeneración epidérmica (Ariede *et al.* 2017). Debido a su capacidad para eliminar contaminantes orgánicos, metales pesados y metabolizar el nitrógeno se han usado en la limpieza del medio ambiente y el tratamiento de aguas residuales (Ścieszka y Klewicka, 2019). Por el rápido crecimiento de su biomasa y absorción de CO₂ se consideran una fuente de energía renovable y biocombustibles (Zhu *et al.* 2017). Además,

se ha demostrado que producen un amplio espectro de metabolitos secundarios y sustancias bioactivas valiosas.

Los compuestos bioactivos se definen como un grupo heterogéneo de moléculas que pueden ser esenciales o no, presentes en pequeñas concentraciones en plantas y en alimentos en general con comprobados efectos beneficiosos en la salud. Entre ellos se encuentran proteínas, carbohidratos, y lípidos como los PUFAs, incluyendo los de la serie omega 3, además de polisacáridos, polifenoles, esteroides y pigmentos (Borowitzka, 2013). Por lo que, en la industria de piensos, se han usado como aditivo en animales de granja y en acuicultura. También se usan como suplementos nutricionales (de Moraes *et al.* 2015) y anualmente se producen toneladas de *Spirulina* y *Chlorella* como fuente de PUFAs (Ibañez y Cifuentes, 2013). Además, han sido incorporadas en alimentos tales como pastas, galletas, panes, caramelos, yogures o refrescos (García, 2013).

Al mismo tiempo, se ha demostrado con extractos y compuestos purificados de microalgas que presentan propiedades anticancerígena, antiviral, antimicrobiana, antifúngica y antiinflamatoria (Kim *et al.* 2013; Wu *et al.* 2016; Hafsa *et al.* 2017; Russo *et al.* 2017; Takahashi *et al.* 2019; El-Baz *et al.* 2020; Kim *et al.* 2020). En estos estudios, se ha comprobado que actúan inhibiendo la producción mediadores inflamatorios como NO, iNOS, COX2, IL-1 β , TNF α , IL-6 y PGE2 de macrófagos y linfocitos T, convirtiéndolos en fármacos potenciales para el tratamiento de enfermedades no transmisibles (Serra *et al.* 2016). Especies como *Isochrysis galbana* (Matos *et al.* 2019), *Spirulina* spp (Wu *et al.* 2016), *Platycodon grandiflorum* (Kim *et al.* 2020), *Dunaliella salina* (El-Baz *et al.* 2020), *Aurantiochytrium limacinum* (Takahashi *et al.* 2019), *Phaeodactylum tricornutum* (Kim *et al.* 2013), *Euglena gracilis* (Russo *et al.* 2017), solo por citar algunos ejemplos, han mostrado potencial inmunomodulador y antioxidante.

2.5.1. Compuestos Lipídicos Provenientes de Microalgas

Los lípidos son los compuestos extraídos de microalgas con mayor potencial de comercialización (Michalak *et al.*; 2017). La capacidad de las microalgas para almacenarlos es fundamental para satisfacer la creciente demanda de alimentos y materias primas. Debido a su diversidad genética y bioquímica, las microalgas tienen una gama excepcionalmente amplia de patrones lipídicos que se

plantea son el resultado de su adaptación al medio (Guschina y Harwood; 2006). La actividad antiinflamatoria y antioxidante de las microalgas se ha reportado principalmente en las fracciones lipídicas, donde se encuentran componentes como los PUFAs, pigmentos, esteroides, glicolípidos como los mono- y di-galactosildiacilglicerol (MGDG y DGDG) y cerebrosidos (Riccio *et al.* 2020). Extractos lipídicos de *Porphyra dioica*, *Palmaria palmata*, *Chondrus crispus* y *Pavlova lutheri* inhiben la expresión de IL-6, IL-8, así como varios genes que codifican para receptores y enzimas como los TLR y MAP3K1 (Robertson *et al.* 2015).

2.5.1.1 Carotenoides. Los carotenoides son una familia amplia de moléculas de tipo isoprenoide presentes en los pigmentos de los fotosistemas en las microalgas. Tienen propiedades antioxidantes debido a su estructura con dobles enlaces conjugados que les permite captar electrones. Se ha visto su efecto positivo en enfermedades neurodegenerativas y propiedades anticancerígenas (El-Baz *et al.* 2020; Mularczyk *et al.* 2020).

Se clasifican en carotenos y xantofilas. El β -caroteno es de las principales moléculas en este grupo en cuanto a abundancia y actividad al ser precursor de la vitamina A. Las xantofilas tienen grupos funcionales con oxígeno como por ejemplo el hidroxilo (luteína), carboxilo (cantaxantina) o ambos (astaxantina) (Ru *et al.* 2020). La violaxantina, principal carotenoide de *Chlorella ellipsoidea*, inhibe la producción de NO y PGE2 en macrófagos RAW 264.7, lo cual se plantea sea mediante la inhibición de la ruta del NF- κ B (Soontornchaiboon *et al.* 2012). El efecto antiinflamatorio de derivados de fucoxantina aislados de *Sargassum siliquastrum* fue evaluado a través de su habilidad para inhibir el efecto proinflamatorio en macrófagos RAW 264.7. Se observó una disminución de ARN mensajero para los genes de las enzimas iNOS y COX2, así como para los genes de las citocinas TNF- α , IL-6 y PGE2 (Neumann *et al.* 2018). Estas propiedades antiinflamatorias están relacionadas con su efecto antioxidante, pues se sabe que la disminución de ROS y RNS es un fenotipo característico en efectos antiinflamatorios (Zong *et al.* 2012; Mo *et al.* 2014; Ko *et al.* 2017).

2.5.1.2. Ácidos grasos poliinsaturados Los ácidos grasos son biomoléculas formadas por una cadena larga de carbonos y un extremo carboxilo. Por la longitud de su cadena carbonada, pueden

ser de cadena corta, media, larga y muy larga. También pueden presentarse una o varias insaturaciones o dobles enlaces, clasificándose en saturados, mono- o polinsaturados. Por la posición de los dobles enlaces encontramos ácidos grasos de la familia omega 3 (n-3 u ω -3) como el ácido alfa linolénico (ALN) y los de la familia omega 6 (n-6 u ω -6) como el ácido linoleico (AL). El AL y ALN se les denomina esenciales al tener que incorporarlos en la dieta pues el organismo no posee las desaturasas que incorporen insaturaciones a partir del carbono 9. El AL y ALN son precursores de otros PUFAs, de esta forma, el ácido araquidónico (AA), principal producto de la familia n-6, se sintetiza a partir del AL mientras que, el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) son los principales productos de la familia n-3 y se sintetizan a partir del ALN (Rodríguez-Cruz *et al.*; 2005).

Las microalgas producen mayor cantidad de PUFAs, que fuentes convencionales como los aceites de pescado y plantas (Baker *et al.* 2020). *Isochrysis galbana* y *Phaeodactylum tricornutum* producen casi el doble de EPA y *Cryptothecodinium cohnii* produce cerca de seis veces más DHA que una fuente convencional (Robertson *et al.* 2015). Al comparar el contenido de PUFAs de una mezcla de dos aceites de pescado con el de la microalga *Schizochytrium sp.*, se obtuvieron 36,4 % y 60,6 % de los lípidos totales, respectivamente, es decir que el contenido en la microalga fue el doble que en el aceite de pescado (Conchillo *et al.* 2006). Especies como *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Schizochytrium sp.*, *Cryptothecodinium cohnii*, *Cadophora fracta*, *Isochrysis galbana*, *Cadophora fracta*, *Aurantiochytrium sp.*, *Ulkenia*, *Schizochytrium*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Odontella*, *Cryptothecodinium cohnii* y *Thraustochytrids* son reconocidas por tener gran cantidad de PUFAs sintetizados naturalmente, por lo cual se utilizan en la acuicultura y las industrias de piensos (Katiyar y Arora, 2020).

Los PUFAs se encuentran en las células formando otras biomoléculas mediante la esterificación de su grupo carboxilo. De esta forma, pueden unirse al glicerol formando los triacilglicéridos (TAG), principal sustrato energético de las células, siendo en algunas microalgas hasta el 80% de los lípidos totales (Hu *et al.*; 2008). Los TAG se clasifican como lípidos neutros al tener comprometidos sus grupos carboxilos e hidroxilo y expuestos sus colas hidrofóbicas. Por otro lado, los glicolípidos y fosfolípidos son lípidos polares al tener dos posiciones esterificadas y en la tercera un carbohidrato o un grupo fosfato, respectivamente. El contenido de estos lípidos en algunas microalgas puede ser de hasta el 90% de los lípidos totales. Los lípidos polares son

componentes de las membranas y tienen un efecto directo en las propiedades de estas (Williams y Laurents, 2010).

Sin embargo, la función de los ácidos grasos va más allá de la energética y estructural, sino que son importantes reguladores metabólicos y de la respuesta inmune (Simopoulos, 2002). Además, son precursores o intermediarios en la señalización celular (Sharma *et al.*; 2012). Los PUFAs modulan la expresión de citocinas y moléculas de superficie, la proliferación de linfocitos, fagocitosis y la actividad de las células NK (Nair, 2018). Se han propuesto varios mecanismos moleculares para explicar esto, los cuales no son excluyentes. De esta forma se plantea que la expresión de genes, metabolismo de eicosanoides, señalización celular y organización de las membranas son los mecanismos por los cuales los PUFAs ejercen su función reguladora (Di Nunzio *et al.* 2016; Lauritano, 2020).

Los PUFAs son precursores de los eicosanoides. Estos compuestos, tienen una función similar a las hormonas, induciendo respuestas de diversos tipos en el organismo, entre ellas la inflamación. Los derivados de eicosanoides pueden ser anti- o proinflamatorios dependiendo si provienen de la serie n-3 o n-6, respectivamente, por lo que la relación n-6/n-3 puede determinar el tipo de respuesta que se induzca. Los llamados “cuerpos lipídicos” son un cúmulo de compuestos lipídicos y donde además se encuentran las enzimas para la síntesis de eicosanoides. Esta estructura se encuentra en el citosol y se cree que desde ahí los PUFAs pueden ejercer su función reguladora determinando qué tipo de eicosanoide se sintetiza en mayor proporción. Se pensaba que estas estructuras solo eran importantes en los adipocitos, sin embargo, son particularmente importante en las células del sistema inmune (Yaqoob, 2003).

Otro nivel al cual los PUFAs ejercen su función reguladora es el estructural, en las membranas biológicas. Al ser precursor de los fosfolípidos, esfingolípidos y otros componentes de la membrana pueden afectar la fluidez de esta, lo cual es muy importante para la célula. La composición de PUFAs de la membrana, particularmente de los microdominios conocidos como balsas lipídicas afecta los mecanismos de reconocimiento, adhesión celular, transporte de proteínas y señalización celular. La función de las balsas lipídicas depende de su composición, por lo que su alteración lleva a la modulación de muchas vías de señalización de la respuesta inmune, lo cual se ha visto particularmente en el receptor de células T (Shaikh y Edidin, 2006).

2.6. *Isochrysis galbana*

Isochrysis galbana es un fitoflagelado unicelular marino del orden *Chrysomonadales*. Como otros miembros de este orden, es rico en PUFAs (Kaplan *et al.*; 1986). Naturalmente, se encuentra formando parte del fitoplancton, es decir en la base de la cadena alimenticia de los organismos marinos. Por este motivo, desde la década del 50 del siglo pasado se ha empleado como suplemento en el cultivo artificial de peces y moluscos (Ewart y Pruder, 1981). Desde entonces, se han realizado múltiples estudios con el objetivo de encontrar condiciones óptimas de cultivo para potenciar la producción del contenido lipídico y valor nutricional en general, evaluando la intensidad y duración de la luz, el pH, temperatura, salinidad y la concentración de nutrientes (Fabregas *et al.* 1986).

Debido a su alto contenido lipídico y específicamente de ácidos grasos *Isochrysis galbana* ha sido considerada como una fuente para la obtención de biocombustibles de tercera generación. Este consiste en una mezcla de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga. Es una energía atractiva por diferentes razones: es renovable y podría ser abastecido de manera sostenible y altamente biodegradable (Sánchez *et al.* 2013, Sukarni *et al.* 2018). En este sentido también se ha evaluado su potencial en el cuidado del medio ambiente en la biorremediación, específicamente en el tratamiento de aguas residuales, siendo capaz de eliminar contaminantes como fenoles (Li *et al.* 2020).

Isochrysis galbana es conocida por su calidad nutricional al tener un alto contenido de PUFAs, específicamente EPA y DHA, por lo que podría ser un buen sustituto del aceite de pescado en la dieta humana, cubriendo así las necesidades de cada vez más población. También suministra esteroides, tocoferoles, pigmentos colorantes, y otras sustancias bioactivas por lo que es considerada para su uso como fuente de productos nutracéuticos y alimento funcional (Pernet *et al.* 2003). Por estos motivos se ha estudiado su composición y la actividad biológica de sus extractos.

2.6.1 Efecto Antiinflamatorio y Antioxidantes de *Isochrysis galbana*

Dado el efecto nocivo para la salud de la inflamación crónica y estrés oxidativo es importante la

búsqueda de compuestos de origen natural que puedan prevenir o tratar las patologías resultantes de estas alteraciones. Si bien *Isochrysis galbana* es conocida por su abundancia de lípidos, también se han estudiado sus extractos polares. El extracto acuoso de esta microalga fue caracterizado con el objetivo de encontrar potenciales aplicaciones encontrando que los azúcares representaban el 22.8% del peso seco. La actividad antioxidante se evaluó mediante la inhibición del radical DPPH encontrándose un 15.71% de inhibición. El extracto tuvo actividad antimicrobiana contra las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis* y antifúngica contra *Candida krusei*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis*. También tuvo actividad citotóxica en células HeLa inhibiendo totalmente la proliferación a la concentración de 1 mg/mL y un 40 % a 0.031 mg/mL (Hafsa *et al.* 2017).

Esta microalga también es rica en cuanto a la abundancia de pigmentos. La composición de β -caroteno, fucoxantina, así como actividad antioxidante y citotóxica fue evaluada para el extracto acuoso, etanólico y para la biomasa seca. Se encontró una cantidad elevada de β -caroteno en la biomasa total en comparación con los extractos, mientras que la fucoxantina se encontró en el extracto etanólico. Ambos extractos tuvieron actividad antioxidante, alrededor de 50 μ M equivalentes Trolox. Tanto la biomasa total como el extracto etanólico tuvieron efecto citotóxico sobre células HeLa a 1mg/mL (0% de viabilidad), mientras que para el extracto acuoso se obtuvo un 80% de viabilidad (Matos *et al.* 2019).

Los mono- y digalactosildiacilgliceroles (MGDG y DGDG) de *I. galbana*, tanto en fracciones como purificados, tuvieron actividad antiinflamatoria al inhibir la producción de TNF- α en macrófagos THP-1 estimulados con LPS (Riccio *et al.*, 2020). De igual forma tuvieron efecto antiinflamatorio en un modelo de hiperplasia epidérmica en ratones (Rodríguez-Luna *et al.*, 2018). En cuanto a los PUFAs, en otro estudio se determinó el contenido de lípidos siendo de 25.3% de los cuales el 27.8 % eran saturados, 23 % monoinsaturados y 46.2 % polinsaturados. De estos el 33.6 % eran de la serie ω -3 y 12.1 % de la serie ω -6 para una relación ω -3/ ω -6 de 2.8, lo cual es beneficioso ya que prevalecen las propiedades antiinflamatorias de éstos. De hecho, se reportó actividad antiinflamatoria con un 79% de inhibición de la enzima COX2 sólo en el extracto lipídico, no así en el extracto acuoso (Bonfanti *et al.* 2018). Este resultado es interesante ya que se ha reportado actividad proinflamatoria en el extracto acuoso. Por ejemplo, los polisacáridos extraídos de *I. galbana* indujeron un aumento en el precursor de la citocina IL-1 β en macrófagos J774A.1

(Yu *et al.* 2010). Los extractos de hexano, éter, acetona y agua fueron evaluados encontrando una mayor actividad antioxidante y citotóxica en el extracto de acetona (Custódio *et al.* 2014).

Por las cualidades que muestra *Isochrysis galbana* en cuanto a la abundancia lipídica y la actividad biológica que estos han tenido, en este trabajo se obtuvieron extractos de esta microalga ricos en compuestos lipídicos para evaluar su composición y actividad biológica.

3. HIPÓTESIS

Los extractos lipídicos proveniente de *Isochrysis galbana* tienen actividad antioxidante y antiinflamatoria provocando la inhibición de radicales libres y de la generación de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto antioxidante y antiinflamatorio de extractos lipídicos provenientes de *Isochrysis galbana* en macrófagos RAW 264.7.

4.2 Objetivos Particulares

1. Establecer las condiciones de cultivo y obtención de la biomasa de *Isochrysis galbana*.
2. Obtener los extractos lipídicos por separación con solventes y determinar el perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases.
3. Evaluar la actividad antioxidante mediante las técnicas de ABTS y DPPH
4. Evaluar la actividad antiinflamatoria mediante la inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7 activados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cultivo y Curva de Crecimiento de *Isochrysis galbana*

La cepa de *Isochrysis galbana* que se utilizó en este trabajo fue amablemente facilitada por el Laboratorio de Acuicultura del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) y se mantuvo en cultivo bajo condiciones controladas en el Laboratorio de Cultivos de Células de Cáncer. Se realizaron cultivos no axénicos y estáticos sin recambio (Stein 1973), en medio de cultivo “f/2” (Guillard y Ryther 1962) disuelto en agua de mar que fue proporcionada por DICTUS Unidad Bahía Kino. La misma provino de una toma directa a través de un sistema de filtración mecánica con un filtro tipo esfera con arena de sílica, pasando posteriormente a un filtro tipo bolsa de algodón, con tamaño de poro de 1 μm . Los medios de cultivo y el material para realizar las siembras fueron previamente esterilizados en una autoclave a 121 ° C y 1.05 kg cm^{-2} de presión durante 20 minutos. La iluminación continua fue provista por lámparas de luz fluorescente de 17 Watts, ($100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$). La temperatura del laboratorio se monitoreó diariamente, siendo de $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Para la obtención de la curva de crecimiento se inoculó a *Isochrysis galbana* en matraces Erlenmeyer por triplicado a una densidad celular inicial de 1×10^5 células/mL en un volumen total de 150 mL. Se realizaron conteos celulares diarios utilizando un microscopio compuesto (MicroscOptics, IV900 series) y una cámara Neubauer (Paniagua *et al...* 1989).

5.2. Obtención de la Biomasa

Se realizaron cultivos escalonados por triplicado desde tubos de ensayo (2 mL) a matraces Erlenmeyer (150 mL), posteriormente a matraces Fernbach (1,5 L) y finalmente a garrafones (15 L) de medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962). Se cosecharon en total 70 L de cultivos durante la fase estacionaria de crecimiento y se centrifugó a 7000 rpm durante 15 min y a una temperatura de 4

°C (Beckman Coulter, Avanti J-26S XPI). Los concentrados de la biomasa celular se depositaron en tubos Falcon previamente pesados en una balanza analítica. Estas muestras fueron liofilizadas (Labcono FreeZone 6 plus) a una temperatura de -48 a -50 °C y a una presión máxima de 0.80 milibares y se evaluó la cantidad de muestra obtenida. Los concentrados de biomasa liofilizada fueron conservados en un ultracongelador a -80 °C (Thermo Scientific, 900 series).

5.3. Obtención de Extractos

Para la obtención de los extractos se utilizó la técnica de solventes asistida con ultrasonido (Esparza-Espinoza *et al.* 2021). Se utilizaron dos solventes: el hexano, de naturaleza más hidrofóbica, donde potencialmente se disuelven los lípidos más apolares o neutros y el acetato de etilo, de polaridad intermedia. Para ello se tomaron 3 g de biomasa liofilizada a la cual se añadieron 50 mL de hexano y se lisaron las células por sonicación durante 30 minutos (Branson 2800). El material disuelto en hexano se filtró al vacío con papel Whatman No 1, obteniendo así el extracto de hexano (Ext H). Con la masa no disuelta se repitió el proceso con acetato de etilo, obteniéndose de esta forma el extracto de acetato de etilo (Ext A). Los solventes fueron eliminados por evaporación bajo presión reducida a 40 °C (Yamato RE601 Scientific Co, LTd Tokyo). La masa obtenida de los extractos se colocó en frascos previamente pesados para la determinación del rendimiento en peso seco.

5.4. Caracterización del extracto de hexano

Se realizó la caracterización del extracto de hexano en cuanto a su composición de ácidos grasos. Para ello, los ácidos grasos fueron esterificados según la técnica de Christie *et al...* (1982) y Chouinard *et al...* (1999). La cuantificación de ácidos grasos se realizó en un cromatógrafo de gases (Thermo Scientific TRACE 1310 GC) con una columna capilar DB-23 de 30 m de longitud, con un diámetro interno de 0.25 mm y 0.25 µm de espesor. Se utilizó helio como gas acarreador. Para

la separación de los ésteres metílicos de ácidos grasos se programó una rampa con diferentes temperaturas (Cuadro 2). Para identificar el perfil de ácidos grasos se utilizó un estándar externo compuesto por 37 ácidos grasos (FAME Mix C4-C24, Supelco). Los ácidos grasos fueron calculados como porcentaje de los ácidos grasos metilados.

Cuadro 2. Condiciones del cromatógrafo de gases para la determinación de ácidos grasos.

Tiempo (min)	Incremento (°C/min)	Temperatura (°C)
0	1	50
1	3	175
2	16	230

Tiempo de corrida: 45 minutos

5.5. Evaluación de la Actividad Antioxidante

Para establecer la actividad antioxidante de las fracciones aisladas, se realizaron dos ensayos de actividad de atrapamiento, el ensayo de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y el ensayo de radicales de ácido 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) según el método publicado por Osuna-Ruiz *et al.* (2016). Cada experimento se realizó al menos por triplicado con cinco réplicas por condición experimental. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración con el análogo de la vitamina E, Trolox. Se obtuvo el porcentaje de inhibición a concentraciones conocidas mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{1-A_m}{A_c} \times 100 \quad (1)$$

donde Ac es la absorbancia del control y Am la absorbancia de la muestra.

5.5.1. Determinación actividad de Atrapamiento con el Ensayo de Radicales de Acido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS))

Se preparó una solución con 8 mg del radical ABTS en 1 mL de H₂O destilada, se mezcló con persulfato de potasio (K₂S₂O₈) (1.3 mg/mL) a una relación 1:1 y se almacenó durante 16 h en oscuridad a temperatura ambiente. Se evaluaron los extractos a 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 µg/mL. En cada tubo se adicionaron 900 µL del reactivo y 100 µl de la muestra incubando 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 734 nm (GENESYS 10S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Finalmente, la capacidad antioxidante fue reportada como promedio de micromoles equivalentes de Trolox (µmol/g) para cada extracto a cada concentración.

5.5.2. Actividad de Atrapamiento de Radicales Libres por el Ensayo de Radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Se evaluaron los extractos a 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 µg/mL. En cada tubo se adicionaron 900 µl del reactivo DPPH a 3mM preparado en hexano: metanol 1:1 (v:v) y 100 µl de la muestra dejándose 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 540 nm (GENESYS 10S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). La capacidad antioxidante fue reportada como promedio de micromoles equivalentes de Trolox (µmol/g) y % de inhibición.

5.6. Cultivo y Mantenimiento de la Línea RAW 264.7

Las células RAW 264.7 fueron mantenidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Glutamax, Gibco) suplementado con estreptomicina (1%), glutamina (1%) y suero fetal bovino al 10% (Gibco). Fueron incubadas y mantenidas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %, haciendo pases cada 2 a 3 días, siendo utilizadas siempre en su fase exponencial de crecimiento.

5.7. Ensayo de actividad Metabólica (MTT)

Para determinar la concentración de extractos a usar como tratamientos en los cultivos, se evaluó el efecto citotóxico de los extractos H y A sobre las células RAW 264.7 mediante el ensayo MTT. Para ello, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos (Costar 3596, Corning Incorporated) a una densidad de 5×10^3 células/pocillo en 100 μ L DMEM. Después de 24 h de incubación en condiciones de cultivo, se retiró el medio y se lavaron las células en cada pocillo con solución salina fisiológica. A continuación, se añadió por separado cada tratamiento, el extracto H y extracto A, ácido linoleico conjugado (CLA) (Stepan-Nutrition), el isómero 9 cis -11 trans-CLA (Stepan-Nutrition) a diferentes concentraciones 200, 100, 50 y 20, 10, 5, 2.5 y 1.25 μ g/mL, se incluyó además el DMSO (Sigma-Aldrich) como control de vehículo y medio de cultivo como control negativo de estímulo, y se incubaron durante 24 h. Después de la incubación, se retiró el medio con los tratamientos y se añadieron 100 μ L de reactivo MTT Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (Sigma Life Science) (250 μ g) y se incubaron durante 4 h. El reactivo fue retirado y el formazán cristalizado se disolvió con 100 μ L de DMSO. Se leyó la absorbancia a 570 nm usando un lector de placas ELISA (Multiskan GO Reader Thermo Scientific). Los resultados se reportaron en % de viabilidad según la fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{Am}{Ac} \times 100$$

5.8. Evaluación de la Producción de Óxido Nítrico

Para determinar el efecto antiinflamatorio de los tratamientos, se evaluó la concentración de NO inducida sobre las células RAW 264.7. Para ello, las células fueron sembradas en placas de 48 pocillos a una densidad de 2.5×10^5 células/pocillo en 500 μ L de DMEM, después de 24 h de incubación se añadieron los tratamientos con el extracto H, extracto A, CLA y el isómero 9 cis -11 trans-CLA a 50, 20, 10 y 5 μ g/mL, se evaluó un grupo con el estímulo de LPS y otro sin el estímulo

a fin de comprobar si la respuesta se debía también a los extractos. Después de 24 h de incubación se recolectó el sobrenadante y se analizó de inmediato. Se tomaron 100 μ L de sobrenadante y 100 μ L del reactivo de Griess (dihidrocloreuro de N-(1-Naftil) etilenediamina; ácido sulfanílico en 5% H_3PO_4) y se colocaron en placa de 96 pocillos (Costar, 9018 Corning Incorporated). Después de mezclar se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad para medir la absorbancia a 545 nm en un lector de placas ELISA (Multiskan GO Reader Thermo Scientific). Previamente se realizó una curva estándar de soluciones de nitrito de sodio con concentraciones entre 0 y 24 μ M.

5.9. Análisis Estadístico

Se realizó un diseño completamente al azar. Se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Cuando los datos fueron normales, se realizó un ANOVA de una vía y prueba de Tukey para la comparación de medias usando un nivel de significancia de $p < 0.05$. Con los datos que no cumplieron la normalidad realizó un ANOVA de dos vías con el método de Welch y la prueba no paramétricas de Kruskal-Wallis usando un nivel de significancia de $p < 0.05$. Estas pruebas se realizaron con el paquete estadístico Minitab 17.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Cultivo y Curva de Crecimiento de *Isochrysis galbana*

La producción de lípidos de *Isochrysis galbana* varía dependiendo de la fase de crecimiento, así como de las condiciones de cultivo. Por este motivo, con el objetivo de caracterizar el cultivo y determinar el día óptimo de cosecha se obtuvo la curva de crecimiento de *I. galbana* con el conteo celular por día durante 10 días (Figura 1). Se observó la fase exponencial desde el día 1 triplicando su número de 10^5 a 3×10^5 células/mL, sin fase de latencia, con un rápido aumento de biomasa llegando hasta 3.6×10^6 células al día 5 de cultivo.

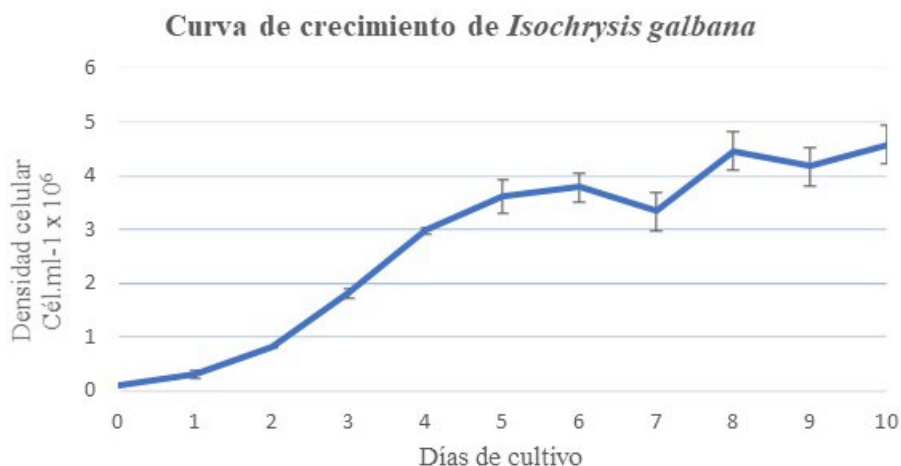


Figura 1. Curva de crecimiento de *I. galbana*. El cultivo se mantuvo en condiciones de fotoperiodo con iluminación continua de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura y medio estándar. Se observa fase estacionaria temprana al día 5. Los valores corresponden al promedio $\pm$ DE ($n=3$).

Este comportamiento puede atribuirse al uso de la iluminación continua y a la disponibilidad de los nutrientes, ya que se ha reportado una fase de latencia mayor al disminuir el tiempo de iluminación o la concentración de nutrientes como nitrógeno y fósforo. Tal es el caso de Roopnarain *et al.* (2014), donde se reporta una prolongada fase de latencia hasta el día 4 y el inicio

de la fase estacionaria hasta el día 14 con un fotoperiodo de menor iluminación con un ciclo de luz/oscuridad de 10:14. En ese estudio, evaluaron el efecto de la concentración de nitrógeno del medio sobre la producción de biomasa y acumulación de lípidos de *Isochrysis galbana* reportando que si bien la biomasa no aumenta en un medio depletado de N, la producción de lípidos sí. El-Din (2019) evaluó el efecto de la concentración de hierro y fósforo en la acumulación de TAG en *I. galbana*, encontrando la duplicación desde el día 1, sin fase de latencia y el inicio de la fase estacionaria el día 8 para el tratamiento control. Sin embargo, en los tratamientos depletados de Fe y P, el crecimiento de biomasa disminuye acortándose la fase exponencial corroborando que la disponibilidad de nutrientes en el medio puede modificar el inicio y la presencia de la fase de latencia y la fase estacionaria.

En nuestro estudio se observó que, a partir del día 5 comenzó la fase estacionaria con aumentos de densidad hasta 4.5×10^6 células/mL, pero sin llegar a duplicar y con fluctuaciones debido a cambios en las condiciones ambientales, específicamente la temperatura el día 7, en el que se registró una disminución hasta 22°C y en consecuencia una disminución en el crecimiento.

Se determinaron parámetros poblacionales como la tasa específica de crecimiento, la cual se define como el incremento en la densidad celular por unidad de tiempo, considerando las densidades de células durante la fase de crecimiento exponencial con la siguiente fórmula:

$$\mu = \log_2 (X_2 - X_1) / t_2 - t_1 \quad (2)$$

Donde, X1 es la densidad celular al tiempo (t1), y X2 es la densidad celular al tiempo final (t2).

A partir de estos datos se calculó el tiempo de generación:

$$t.g = 1/\mu \quad (3)$$

La tasa específica de crecimiento fue de 1.39 divisiones por día y el tiempo de generación de 0.76 días. Este valor de tasa específica de crecimiento es mayor que el reportado por Nogueira y

colaboradores en el 2015 para *I. galbana*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Nannochlorosis oceánica* de 0.84, 0.87 y 0.63 divisiones por día, respectivamente. En ese estudio evaluaron el efecto de la intensidad de la luz en la acumulación de TAG con fotoperiodo menor al utilizado en este trabajo de 12:12 horas. De esta forma se confirma que las condiciones empleadas en este trabajo y el fotoperiodo de 24 horas favorece el crecimiento y por consiguiente la obtención de una mayor biomasa en menos tiempo.

6.2. Obtención de la Biomasa

De acuerdo con los datos obtenidos en la curva de crecimiento de la microalga, se decidió cosechar el total de la biomasa el día 6 del cultivo, correspondiendo a la etapa temprana de la fase estacionaria. De la etapa final de cultivo se obtuvo un volumen de 70 L el cual fue cosechado obteniendo un total de 6.98 g de biomasa para un rendimiento de 0.99 g/L (Figura 2). Nogueira *et al.* (2015), obtuvieron un rendimiento menor de 0.88 g/L en un estudio donde evaluaron el efecto de la intensidad de la luz en la acumulación de TAG, utilizando condiciones de cultivo similares a las nuestras excepto por el fotoperiodo de 12:12 en lugar de 24 h. Mientras que Sánchez *et al.* (2000) obtuvieron 1.92 g/L en un estudio donde evaluaron diferentes medios de cultivo en la obtención de biomasa y composición bioquímica de *Isochrysis galbana*, en este caso utilizaron fotobioreactores con una intensidad lumínica superior a la utilizada en el presente estudio (40-43 W vs. 17W), si bien en este caso el objetivo era obtener mayor biomasa y estudiar su composición, más que potenciar la producción lipídica y evaluar su efecto como en este trabajo.

El inicio de la fase estacionaria coincide con la mayor producción de lípidos, sin embargo, estos pueden ser de diferente clase en la fase estacionaria temprana y tardía (Fidalgo *et al.* 1998). Lin *et al.* (2007) evaluaron el efecto de la fase de crecimiento y la fuente de nutrientes en la composición de ácidos grasos de *Isochrysis galbana*, reportando una mayor proporción de PUFAs en la fase estacionaria temprana (utilizada en este estudio). En la fase estacionaria tardía, aumenta la producción de lípidos no polares como los TAG. Además, a medida que el cultivo envejece el metabolismo de este cambia, produciendo otros compuestos extracelulares que contribuyen al aumento de la biomasa, pero no necesariamente a la fracción lipídica (Sharma *et al.* 2012).



Figura 2. Escalado del medio de cultivo para obtención de biomasa. **A:** 150mL, **B:** 1.5L, **C:** 15L.

6.3. Obtención de los Extractos Lipídicos

La naturaleza química y la polaridad de los solventes utilizados para la extracción determinan en gran medida el rendimiento y la actividad de los extractos (Monteiro *et al.*, 2020). Por otro lado, uno de los puntos más críticos en la extracción de bioactivos de microalgas es la selección de una técnica de extracción adecuada. La pared celular de las microalgas, compuesta generalmente por polisacáridos, glicoproteínas y minerales, debe romperse adecuadamente para recuperar eficazmente compuestos bioactivos intracelulares. Por este motivo, los métodos físicos como, el ultrasonido, son usados eficazmente para extraer los compuestos intracelulares (Señoráns *et al.*, 2020).

En este sentido, para conocer la composición y actividad biológica de los lípidos presentes en *Isochrysis galbana* se realizó la extracción con n-hexano y acetato de etilo, usando el ultrasonido como método de disrupción celular. De esta forma se obtuvieron extractos con un solvente más hidrofóbico (hexano) y otro de polaridad intermedia (acetato de etilo) a fin de conocer mejor las aplicaciones potenciales de sus componentes (Figura 3). El rendimiento de la fracción de hexano (472 mg, 15%) fue más del triple que la de acetato de etilo (142.1 mg, 4.75%). Esta proporción coincide con lo reportado por Custódio *et al.* (2014) donde emplearon solventes con polaridad similar y un método de disrupción, obteniendo un 11% de extracto de hexano de *Isochrysis galbana* mientras que, para los extractos con éter dietílico y acetona fue de un 2.9 % y 3.3%,

respectivamente. Al mismo tiempo, obtuvieron los mismos extractos para *Tetraselmis* sp. and *Scenedesmus* sp reportando rendimientos menores no mayores al 2% para ninguno, lo cual confirma la riqueza lipídica de *Isochrysis galbana*.

Shekarabi *et al...* (2019) obtuvieron 17.89% de rendimiento en un estudio donde evaluaron el efecto de diferentes métodos de secado en los componentes nutricionales de *I. galbana*. En este caso, la extracción se realizó mediante el método de Bligh and Dyer que utiliza una mezcla de solventes en volumen de hexano: metanol en proporción 1:1 lo cual permite extraer más compuestos, pero en un rango de polaridad más amplio, lo que podría explicar el mayor rendimiento. Yu *et al...* (2010) también emplearon mezcla de solventes obteniendo un rendimiento incluso mayor, de 21.7 % con una mezcla de n-hexano: etanol en proporción 1:1 v:v extraídos de *I. galbana*. En este caso la extracción se realizó con el aparato de Soxhlet, a lo cual pudiera deberse el aumento del rendimiento con respecto al usar mezcla de solvente solamente. Soto-León *et al...* (2014) utilizaron el aparato de Soxhlet, pero sin mezcla de solventes, obteniendo 18.52 % de rendimiento extraídos con n-hexano de *Tetraselmis suecica*. Por otra parte, Ebrahimzadeh *et al...* (2018) obtuvieron un 4.54 % de rendimiento, valor cercano al obtenido en este trabajo, para un extracto de acetato de etilo obtenido de *Nannochloropsis oculata*.

Los resultados de rendimiento obtenidos en el presente trabajo se encuentran dentro del rango reportado y son adecuados para los objetivos planteados. Si bien el uso de mezclas de solventes podría aumentar el rendimiento, debe tenerse en cuenta que teniendo como objetivo la evaluación de su actividad biológica la obtención de extractos menos diversos podría facilitar la comprensión de sus efectos biológicos.

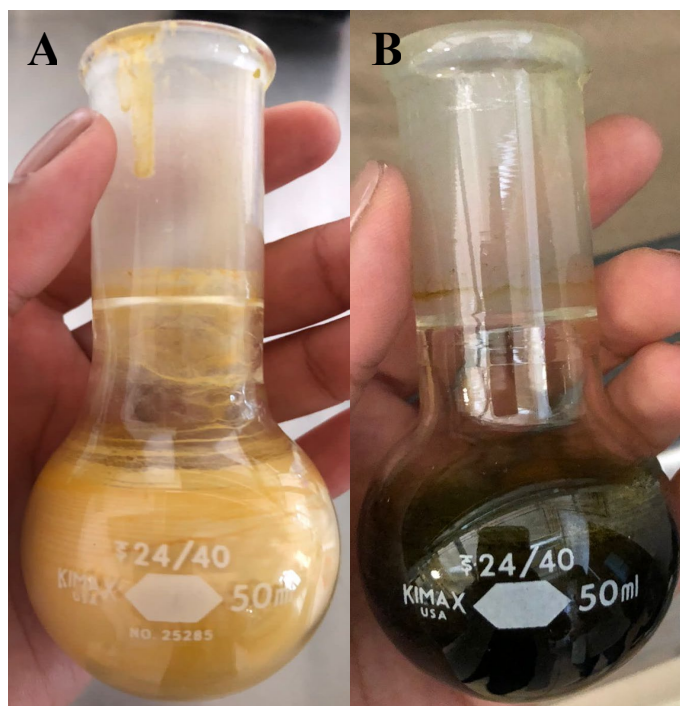


Figura 3. Extractos de hexano (A) y acetato de etilo (B).

6.4. Caracterización del Perfil de Ácidos Grasos de la Fracción de Hexano

Isochrysis galbana es conocida por su alta producción de lípidos, entre ellos los PUFAs, especialmente los de la familia n-3. Para determinar la composición de ácidos grasos se analizó el extracto de hexano mediante cromatografía de gases, pues al obtenerse menor rendimiento del extracto de acetato de etilo, no fue suficiente para el análisis. La composición específica de cada uno de ellos se muestra en la Cuadro 3. Del total de muestra lipídica el 79.71 % fueron ácidos grasos identificados y 9.92% desconocidos, quedando un 10.37% de compuestos lipídicos que pudieran ser carotenoides sintetizados en forma de pigmentos que utilizan para la fotosíntesis (clorofila, fucoxantina, β -caroteno), vitaminas y esteroides (Señoráns *et al.*, 2020).

Cuadro 3. Composición de ácidos grasos (g ácido graso/100g muestra) del extracto de hexano determinada por cromatografía de gases.

Ácido graso	Nombre común	%
C12:0	Ácido Láurico	0.72
C14:0	Ácido Mirístico	7.5
C15:0	Ácido Pentadecanoico	0.33
C16:0	Ácido Palmítico	2.6
C17:0	Ácido Heptadecanoico	0.52
C18:0	Ácido Esteárico	2.9
C20:0	Ácido Araquídico	2.4
C21:0	Ácido Heneicosanoico	1.3
C22:0	Ácido Behénico	2.41
C23:0	Ácido Tricosanoico	1.04
C24:0	Ácido Lignocérico	2.35
ΣSFA		24.07
C18:1 n9 (9c)	Ácido Oleico	15.6
C20:1 n9 (11c)	Ácido Eicosenoico	1.6
C22:1 n9	Ácido Erúcico	1.8
C24:1 n9	Ácido Nervónico	0.91
ΣMUFA		19.91
C18: 2 n6 (n6c)	Ácido Linoleico	4.4
C18:3 n6	Ácido γ-Linolénico	15.1
C20:2 n6 (11, 14c)	Ácido Eicosadienoico	1.2
C20:3 n6 (8,11,14c)	Ácido Eicosatrienoico	0.46
C20:4 n6	Ácido Araquidónico	0.59
C20:3 n3 (11,14,17)	Ácido Eicosatrienoico	0.98
C20:5 n3 (5,8,11,14,17c)	Ácido Eicosapentanoico	1.1
C22:2 n6 (13,16c)	Ácido Docosadienoico	1.2
C22:6 n3 (4,7,10,13,16,19)	Ácido Docosahexaenoico	10.7
ΣPUFA		35.73
Σn3		27.88
Σn6		22.95
n6/n3		1.8

ΣSFA: Total de ácidos grasos saturados, **ΣMUFA:** Total de ácidos grasos monoinsaturados, **ΣPUFA:** Total de ácidos grasos poliinsaturados.

En cuanto a la composición de PUFA, el 12.78% fueron de la familia n-3, siendo el ácido docosahexaenoico (DHA) el de mayor proporción con 10.7 %. Este resultado es consistente con lo anteriormente reportado acerca de que este es el PUFA de la familia n-3 más encontrado en *Isochrysis galbana*. Custódio *et al...* (2014) reportaron 12.68 % de DHA, Señoráns *et al...* (2020)

entre 9 % y 12 % y Bonfanti *et al...* (2018) 9.2 % lo que sitúa los resultados aquí obtenidos dentro del rango de lo reportado con los métodos más usados de extracción (Folch, Bligh and Dyer, hexano). El DHA, al igual que el ácido eicosapentanoico (EPA), del cual se obtuvo un 1.1% del total de ácidos grasos, son conocidos por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. También son conocidos sus efectos beneficiosos en el sistema cardiovascular, la función cognitiva, demencia y en general en el desarrollo cerebral (Rodríguez-Cruz *et al..*; 2005). Teniendo en cuenta que la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria recomienda una ingesta diaria de 250 mg de PUFAs de la familia n-3 y dado que en este estudio se obtuvo un total de 128 mg de estos por gramo de biomasa seca, podría decirse entonces que 2 g son suficientes para cumplir los requerimientos dietarios.

Por otro lado, de la familia n-6 se obtuvo un 22.95% del total de ácidos grasos, siendo el ácido γ -linolénico el de mayor proporción con un 15.1 %, seguido del ácido linoleico (AL) con 4.4 %. Esta cantidad de ácidos grasos de la familia n-6 es mayor que el reportado por otros autores para *Isochrysis galbana* como Bonfanti *et al...* (2018) que reportaron 12.1% de PUFAs de la familia n-6, siendo el AL el de mayor proporción con 9.6 %. Señoráns *et al...* (2020) reportaron entre 5.8% y 7.2% de PUFAs de la familia n-6, siendo el AL y Ácido Araquidónico (AA) con valores entre 2.9 % y 3.5%. Custódio *et al...* (2014) reportaron 13.79 % de n-6, siendo el AL el de mayor proporción con 12.07 %. En estos estudios se realizó la determinación también por cromatografía de gases, sin embargo, no realizaron el cultivo de la microalga, sino que trabajaron a partir de la biomasa. Por lo cual, las condiciones de cultivo y la obtención de biomasa pueden ser los factores determinantes en el aumento de ácidos grasos n-6 en este trabajo.

Se obtuvo una relación n-6/n-3 de 1.8 dado la mayor cantidad de PUFAs n-6. Las familias n-3 y n-6 tienen diferentes funciones, incluso contrapuestas. Los derivados de eicosanoides pueden ser anti- o proinflamatorios dependiendo si provienen de la serie n-3 o n-6, respectivamente. Debido a esto se ha planteado que la relación n-6/n-3 puede determinar el tipo de respuesta que se induzca. Cada vez más evidencia apunta a que la ingestión de productos con valores elevados de esta relación (>1), como muchos de la dieta occidental, promueven el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, autoinmunes y cáncer, mientras que una menor relación n-6/n-3 (<1) puede prevenirlas (Simopoulos, 2002). En este caso, la mayor proporción de PUFAs de la familia n-6 puede indicar un posible efecto proinflamatorio del extracto H.

6.5. Evaluación de la Actividad Antioxidante

6.5.1. Determinación Actividad de Atrapamiento con el Ensayo de Radicales de ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS))

Como se muestra en la Figura 4 ambos extractos tienen el mismo potencial o capacidad antioxidante medidos mediante ABTS a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ con una actividad de 217.8 ± 10.5 y 218.1 ± 12.2 $\mu\text{mol/g}$ equivalentes de Trolox. Sin embargo, a concentraciones más bajas de 250 y 125 $\mu\text{g/mL}$ el extracto de acetato de etilo mantuvo la capacidad mostrando una actividad de 215.7 ± 1.9 y 193.2 ± 26.3 $\mu\text{mol/g}$ equivalentes de Trolox mientras que el extracto de hexano disminuyó a 132.8 ± 5.7 $\mu\text{mol/g}$ equivalentes de Trolox, esta tendencia se mantiene para las concentraciones de 125 y 62.5 $\mu\text{g/mL}$, por lo que se le puede considerar al extracto de acetato de etilo con mayor potencial antioxidante. La concentración a la cual se obtuvo un 50% de inhibición (IC_{50}) fue 72.6 $\mu\text{g/mL}$, 190.4 $\mu\text{g/mL}$ y 72.6 $\mu\text{g/mL}$ para los extractos de acetato de etilo y hexano, respectivamente. El ABTS (ácido 2'-azino-bis -3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) es un radical estable que puede aceptar electrones de moléculas donadoras lo que produce un cambio de color y permite cuantificar este cambio. Moléculas lipídicas como los PUFA, carotenoides y polifenoles poseen estructuras con dobles enlaces conjugados, por lo que son excelentes donadores al poseer varios enlaces conjugados y de ahí su capacidad antioxidante (Yoo *et al.*, 2007).

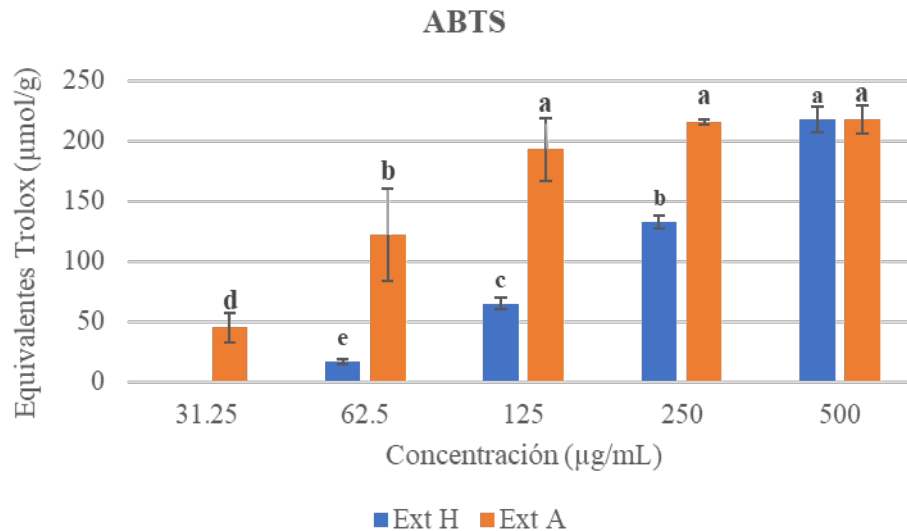


Figura 4. Evaluación de la capacidad antioxidante mediante la técnica de ABTS expresada en equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol/g}$) a diferentes concentraciones de los extractos. Los valores corresponden al promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=3$). Literales diferentes denotan diferencias significativas entre las concentraciones ($p<0.05$).

Osuna-Ruiz *et al.* (2016) evaluaron la actividad antioxidante de extractos de hexano, acetona y metanol de 7 microalgas de Sinaloa encontrando mayor actividad inhibitoria en los extractos de acetona y metanol en comparación con el de hexano en todas. *Codium isabellae* tuvo el extracto de hexano con mayor actividad antioxidante con 15.3 % de inhibición a 100 $\mu\text{g/mL}$, pero en ese caso los autores la correlacionaron con los contenidos de flavonoides y clorofila en el extracto de hexano. La mayor actividad encontrada en el presente trabajo puede deberse a la presencia de los PUFA's y sus dobles enlaces conjugados, además de que el efecto antioxidante de estos ha sido previamente reportado (Giordano y Visioli, 2014; Di Nunzio *et al.* 2016).

Conde *et al.* (2021) evaluaron la actividad antioxidante de los lípidos de *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum amblystomatis*, *Scenedesmus obliquus*, *Tetraselmis chui*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Spirulina sp.* y *Nannochloropsis oceánica* extraídos con una mezcla de diclorometano: metanol. La mayor capacidad antioxidante fue reportada para *S. obliquus* con el menor valor de IC50 ($29.4 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$) y mayor valor en equivalentes Trolox $637.5 \pm 27.4 \mu\text{mol/g}$, estos valores son mayores que los aquí reportados si bien los lípidos no son extraídos con los mismos solventes. Al utilizarse la mezcla y ampliar la polaridad pueden extraerse los compuestos que en este trabajo estarían por separado en hexano y acetato de etilo, lo cual pudiera explicar su mayor actividad. Por otro lado, *N. oceanica* tuvo la menor capacidad con $101.9 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$ de

IC₅₀ y 184.0 ± 3.2 $\mu\text{mol/g}$ equivalentes Trolox, los cuales son menores que los aquí reportados a pesar de la diferencia antes mencionada.

6.5.2. Actividad de Atrapamiento de Radicales Libres por el Ensayo de Radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

La actividad antioxidante mediante esta técnica por su parte arrojó que el extracto de acetato de etilo tiene una actividad 551.9 ± 48.9 $\mu\text{mol/g}$ equivalentes de Trolox a 500 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, ninguna de las concentraciones evaluadas (500-31.25 $\mu\text{g/mL}$) alcanzó el 50% de inhibición, ni tampoco alcanzaron a corresponderse con los equivalentes Trolox, excepto el extracto de acetato de etilo a 500 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 5). Osuna-Ruiz *et al.* reportaron IC₅₀ entre 16.9 mg/mL y 254.5 mg/mL, lo que es mayor que las que encontraron por ABTS (1.56-3.41 mg/mL) en extractos de acetona y metanol y también mayores que las evaluadas en este estudio. Si bien no se pueden comparar los resultados, pues ambos métodos se basan en mecanismos diferentes, algunos autores han encontrado una pequeña correlación entre ambas técnicas (Monteiro *et al.*, 2020). El DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) es un radical estable que acepta protones de un donador (el ABTS acepta electrones). Estos protones pueden venir de los grupos hidroxilo y carboxilos que se encuentran, por ejemplo, en los extremos de los carotenoides y PUFAs. Esto explica por qué la mayoría de los autores reportan mayor porcentaje de inhibición o actividad mediante ABTS ya que mientras que estas moléculas pueden donar hasta dos protones de sus extremos, los electrones que pueden ceder de sus dobles enlaces conjugados pueden ser más (Arnao, 2000).

Hajimahmoodi *et al.* (2010) evaluaron la capacidad antioxidante de los extractos de hexano, acetato de etilo y acuoso de 12 microalgas. En este estudio, el extracto acuoso mostró mayor capacidad antioxidante que los de hexano y acetato de etilo. La mayor capacidad antioxidante para el extracto de hexano se reportó de *Fischerella musicola* con un 26.5 % de inhibición, seguido de *Nostoc sp* con 8.41 % de inhibición. Por otro lado, para los extractos de acetato de etilo la mayor actividad se reportó para *Fischerella ambigua* y *Fischerella musicola* con 10.86 y 10.44 % de inhibición respectivamente. Al igual que en este trabajo no se reportó ningún valor de 50 % de inhibición excepto por el extracto acuoso de *Chlorella vulgaris*.

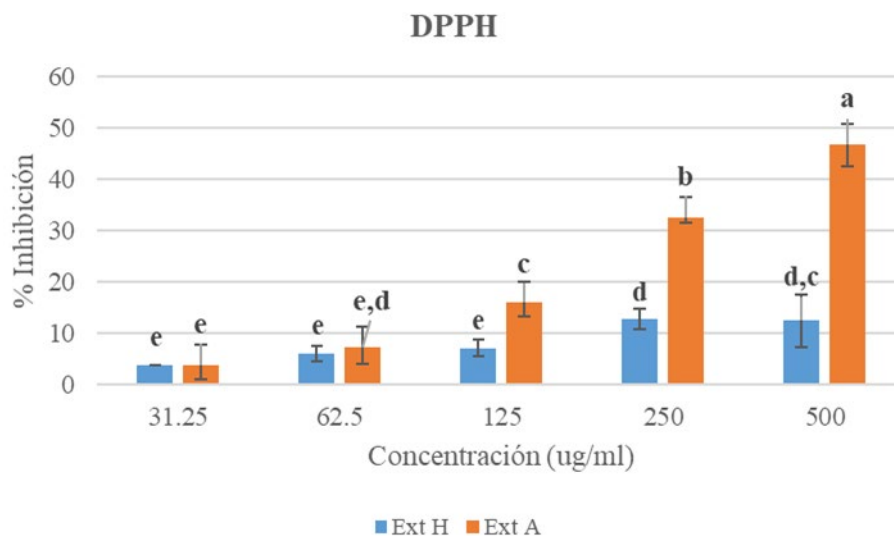


Figura 5. Evaluación de la capacidad antioxidante mediante la técnica de DPPH expresada en % de inhibición a diferentes concentraciones de los extractos. Los valores corresponden al promedio $\pm$ la desviación estándar (n=3). Literales diferentes denotan diferencias significativas entre las concentraciones (p=0.000).

Ebrahimzadeh *et al.* (2018) evaluaron la capacidad antioxidante de extractos de acetato de etilo y metanol de *Nannochloropsis oculata* y *Gracilaria gracilis* obteniendo valores de % de inhibición menores que 50 %, al igual que en este trabajo, siendo el extracto de acetato de etilo el de mayor actividad en ambos casos con valores de 39.03 y 20.48 para *N. oculata* y *G. gracilis*. respectivamente. De igual forma Conde *et al.* reportaron valores menores al 20 de inhibición (IC20) para las 7 microalgas evaluadas por DPPH. Dentro de ellas, *C. vulgaris* tuvo mayor capacidad con un IC20 de $50.5 \pm 12.3 \mu\text{g/mL}$ y $191.8 \pm 40.0 \mu\text{mol/g}$ equivalentes de Trolox.

6.6. Evaluación de la Citotoxicidad de los Extractos con el Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

Para evaluar el efecto antiinflamatorio de los extractos de hexano y acetato de etilo, es importante determinar la concentración a usar, de forma tal que sea suficiente para inducir una respuesta antiinflamatoria pero que no sea nociva para las células. Con este objetivo, se realizó el ensayo de citotoxicidad con el 3(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) en un

modelo de macrófago con la línea celular RAW 264.7 como una forma de determinar la mayor concentración a la cual los extractos no afectan la viabilidad celular.

El extracto de hexano tuvo efecto citotóxico, obteniéndose 49 ± 5 % de viabilidad a 200 $\mu\text{g/mL}$. Nótese que a pesar de disminuir la concentración más de 100 veces la viabilidad no aumentó significativamente hasta 2.5 $\mu\text{g/mL}$ con 61.6 ± 3.5 %, todavía por debajo del 90% deseado (Figura 6). Este resultado es interesante ya que en este caso el efecto no es dependiente de la concentración en el rango evaluado, sin embargo, varios autores lo han reportado como dependiente de la concentración. Por ejemplo, Sibi y Rabina (2016) reportaron que la fracción de hexano de *Clorella vulgaris* tuvo efecto citotóxico a 250 $\mu\text{g/mL}$ obteniéndose 50% de viabilidad en macrófagos RAW 264.7, sin embargo, esta fue aumentando a 60, 80, 90 y 100% a 125, 64, 32 y 16 $\mu\text{g/mL}$. Jo y colaboradores en 2010 evaluaron el efecto antiinflamatorio del extracto metanólico y las fracciones de hexano y acetato de etilo de *Tetraselmis suecica* encontrando efecto citotóxico en células RAW 264.7 con valores muy bajos de viabilidad (cercanos a 5%) a 2000 $\mu\text{g/mL}$ que fueron subiendo hasta casi 100 % a 16 $\mu\text{g/mL}$.

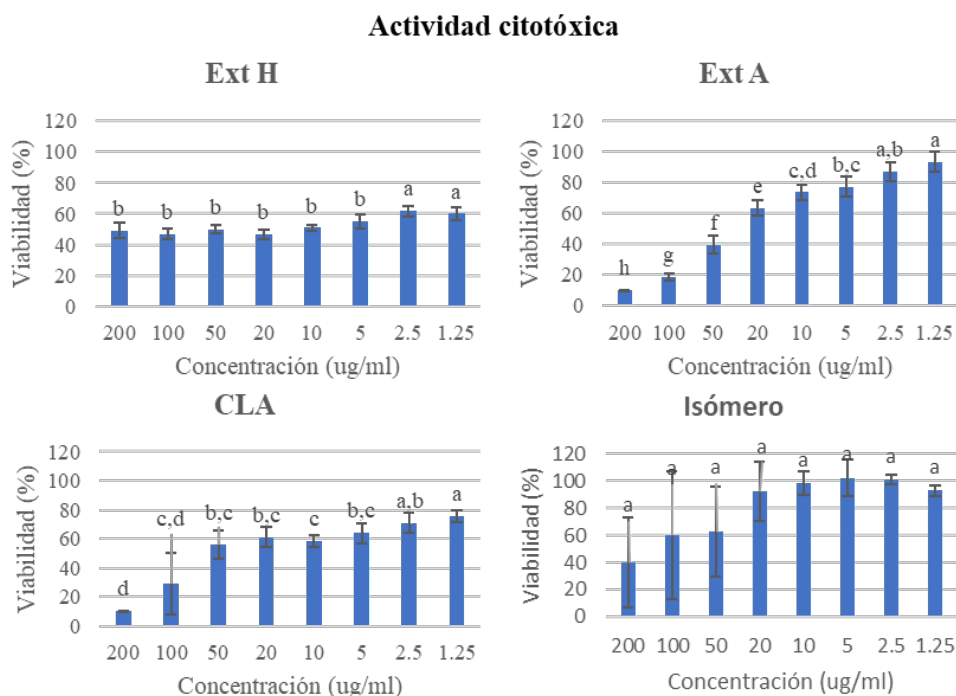


Figura 6 Actividad citotóxica de los extractos a diferentes concentraciones en macrófagos RAW 264.7. **Extracto H** ($p=0.003$), **Extracto A** ($p=0.001$), **CLA 50:50** ($p=0.006$), **Isómero 9c11t** ($p=0.051$). Los valores corresponden al promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=3$). Literales diferentes denotan diferencias significativas entre las concentraciones.

El extracto de acetato de etilo también tuvo efecto citotóxico obteniéndose 9.9 ± 0.6 % de viabilidad a 200 $\mu\text{g/mL}$ y fue dependiente de la concentración, obteniéndose valores crecientes con 77.5 ± 6.7 % a 5 $\mu\text{g/mL}$, 87.2 ± 5.9 a 2.5 $\mu\text{g/mL}$ y 93.5 ± 6.7 % a 1.25 $\mu\text{g/mL}$. Este comportamiento fue similar al del CLA, con el cual se obtuvo 10.2 ± 0.5 % a 200 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, al disminuir la concentración los valores se mantienen entre 50 y 60 % de viabilidad hasta 5 $\mu\text{g/mL}$ donde se obtiene 70.7 ± 6.9 % y 75.7 ± 4.1 % a 1.25 $\mu\text{g/mL}$. La citotoxicidad de la fracción de acetato de etilo de 14 especies de microalgas del mar de Korea fue evaluada en macrófagos RAW 264.7 obteniéndose más del 80% de viabilidad celular a 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de forma dependiente de la concentración llegando a obtener valores mayores del 100% de hasta 132 y 118 %.

El isómero 9c,11t-CLA por su parte tuvo efecto citotóxico desde 50 $\mu\text{g/mL}$ hasta 200 $\mu\text{g/mL}$, observándose valores promedio de los porcentajes de viabilidad por debajo del 70%, sin embargo, desde 1.25 hasta 20 $\mu\text{g/mL}$ se mantuvieron por encima del 90 %. No obstante, las diferencias no alcanzaron significancia estadística ($p=0.051$) probablemente por la alta desviación dada en parte por el tipo de ensayo biológico donde la variabilidad aumenta y también por el número de muestras. Ambrozova *et al.* (2010) no encontraron efecto citotóxico de PUFAs entre ellos el CLA en células RAW 264.7 en concentraciones de 0.1 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, de Lima y colaboradores en 2009 reportaron efecto citotóxico de varios PUFAs entre ellos el CLA en un efecto dependiente de la concentración de manera inversa (1-200 $\mu\text{g/mL}$), encontrando efecto citotóxico a bajas concentraciones y mayor viabilidad a altas concentraciones. Por otro lado, también se ha reportado que los extractos de microalgas no afectan la viabilidad. Yu *et al.* (2010) evaluaron la citotoxicidad de los polisacáridos de *I. galbana* de 800-50 $\mu\text{g/mL}$ no encontrando efecto en macrófagos J774A.1. Park *et al.* (2008) evaluaron los lípidos de *Nostoc commune* extraídos con el método de Bligh-Dyer no encontrando efecto citotóxico entre 25-200 $\mu\text{g/mL}$ en células RAW 264.7.

Varios autores clasifican a los compuestos como citotóxicos si la viabilidad celular es menor al 50%, ligeramente tóxico entre 50-70% y no tóxico con valores superiores al 70% (Gürlek *et al.*; 2020). Teniendo en cuenta esta clasificación el extracto H fue citotóxico a concentraciones superiores a 5 $\mu\text{g/mL}$ y ligeramente tóxico a concentraciones menores. El extracto A se clasifica como citotóxico a concentraciones superiores a 20 $\mu\text{g/mL}$ y no citotóxico a concentraciones menores que 10 $\mu\text{g/mL}$. El CLA en mezcla de isómeros 50:50 fue citotóxico por encima de 100 $\mu\text{g/mL}$, ligeramente tóxico entre 50 y 5 $\mu\text{g/mL}$ y no tóxico a concentraciones menores de 2.5 $\mu\text{g/mL}$. El isómero 9c,11t-CLA por su parte no puede clasificarse pues no se encontraron

diferencias significativas, sin embargo, al ser la probabilidad cercana al 95% ($p=0.051$) puede decirse que existe una tendencia a ser citotóxico a 200 $\mu\text{g/mL}$, ligeramente tóxico entre 100 y 50 $\mu\text{g/mL}$ y no tóxico por debajo de 20 $\mu\text{g/mL}$. Teniendo en cuenta el comportamiento de los tratamientos y debido a la diversidad en su comportamiento para evaluar su efecto antiinflamatorio se evaluó en el rango de 50 a 5 $\mu\text{g/mL}$.

6.7. Evaluación de la Producción de Óxido Nítrico

La producción de óxido nítrico (NO) por la acción de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) aumenta en condiciones de estrés oxidativo, así como por la presencia del LPS, el factor de necrosis tumoral (TNF- α) o la interleucina 1 β . Esto provoca la activación del factor de transcripción NF- κB y la producción de citocinas proinflamatorias, desarrollándose así una respuesta inflamatoria. Por este motivo, la inhibición de la producción de NO por células en cultivo se ha utilizado ampliamente como un biomarcador para evaluar la capacidad antiinflamatoria (Aktan; 2004).

Para la determinación de la producción de NO las células RAW 164.7 fueron estimuladas y tratadas con los extractos en las concentraciones de 50, 20, 10 y 5 $\mu\text{g/mL}$. Los valores obtenidos se muestran en la Figura 7. La estimulación de las células RAW 264.7 con el LPS provocó el aumento de NO, hasta $7.5 \pm 4.2 \mu\text{M/mL}$. El extracto A, así como los controles de CLA y el isómero 9c,11t-CLA no disminuyeron ni promovieron la producción de NO, manteniendo los valores obtenidos con el estímulo de LPS. Esto debido a los altos valores de desviación en los ensayos, los cuales si bien no permiten encontrar diferencias en los tratamientos también son propios de ensayos biológicos. El extracto H por su parte se comporta como un estimulador tanto en presencia del LPS como sin el mismo, aumentando la concentración hasta $26.04 \pm 2.56 \mu\text{M/mL}$ y $20.31 \pm 7.23 \mu\text{M/mL}$, respectivamente. Este es un comportamiento esperado dado los resultados en su composición de PUFAs donde se obtuvo una relación n-6/n-3 de 1.8, con lo cual se favorece el comportamiento proinflamatorio de los PUFAs de la familia n-6.

Salazar-López *et al.* (2016) obtuvieron valores de NO entre 25 y 30 $\mu\text{M/mL}$ al estimular células RAW 264.7 a 2.5×10^5 células/mL con LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) en un estudio donde evaluaron el potencial de extractos de salvado de sorgo, donde se observó una disminución de NO hasta 10 $\mu\text{M/mL}$, si

bien fueron evaluadas concentraciones mayores (4-10 mg/mL). Soontornchaiboon *et al.* (2012) reportaron valores alrededor de los 15 $\mu\text{M/mL}$ al estimular células RAW 264.7 a una densidad de 10^6 células/mL con LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), disminuyendo este con tratamientos de 30 y 60 $\mu\text{g/mL}$ de violaxantina aislada de *Chlorella ellipsoidea* hasta 12 y 8 $\mu\text{M/mL}$ respectivamente. Por su parte, Jo *et al.* (2010) evaluaron el efecto antiinflamatorio del extracto metanólico y las fracciones de hexano y acetato de etilo de *Tetraselmis suecica* encontrando que al estimular RAW 264.7 a una densidad de 2×10^5 células/mL con 500 ng/mL de LPS la concentración de NO llega hasta 16 $\mu\text{M/mL}$. Ambas fracciones inhiben la producción de NO de forma dependiente de la concentración, llegando hasta 12 $\mu\text{M/mL}$ y 6 $\mu\text{M/mL}$ para hexano y acetato de etilo, respectivamente.

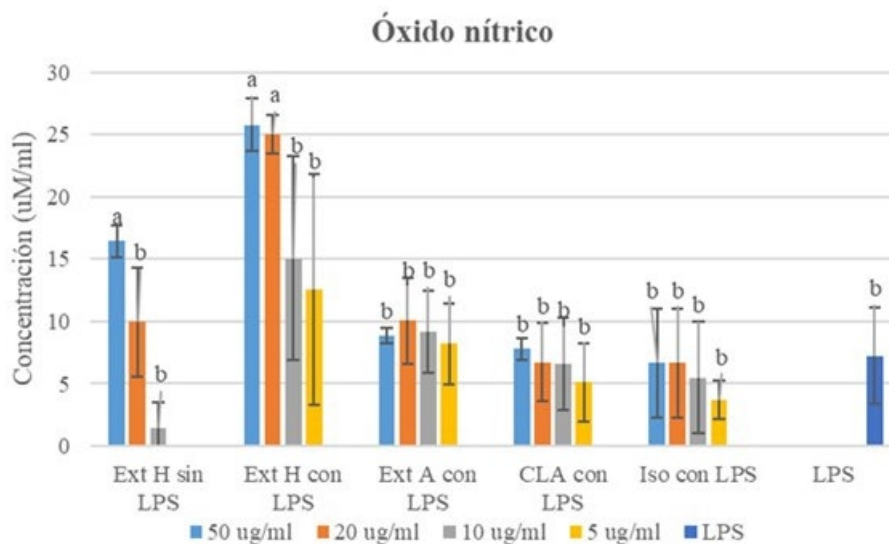


Figura 7. Inhibición de la producción de NO por células RAW 264.7 estimuladas y tratadas con los extractos lipídicos de *Isochrysis galabana*. Los valores corresponden al promedio $\pm$ la desviación estándar (n=3). Literales diferentes denotan diferencias significativas entre las concentraciones (p=0.023).

En este contexto se puede comprobar que los valores de concentración de NO obtenidos en este trabajo al estimular las células RAW 264.7 fueron menores a las reportadas por estos trabajos aun utilizando el doble de estímulo, siendo mayor el efecto del extracto H en cuanto a la producción de NO, si bien fue evaluado a mayor concentración que el LPS.

7. CONCLUSIONES

Los extractos lipídicos provenientes de *Isochrysis galbana* tuvieron una composición de ácidos grasos mayoritarios como ácido oleico (15.6 %), ácido γ -linolénico (15.1 %) y el ácido docosahexaenoico (10.7 %), y una relación n-6/n-3 de 1.8. Ambos extractos tuvieron actividad antioxidante, siendo el de acetato de etilo el de mayor actividad. Sin embargo, aunque se observó una producción de NO dependiente de la concentración de las fracciones en macrófagos RAW 264.7 activados con LPS, no se comprobó la actividad inhibitoria de óxido nítrico, más bien un efecto inmunoestimulante para el extracto H. Estos hallazgos pudieran relacionarse a la composición lipídica y a la presencia de otras moléculas en los extractos que pueden ser de interés y que requieren mayor estudio.

8. RECOMENDACIONES

- Probar otros métodos de extracción de lípidos con mezcla de solventes y la obtención de fracciones a partir de estos extractos.
- Obtener la biomasa en la fase estacionaria tardía para comparar la composición de ácidos grasos.
- Probar otras condiciones del medio de cultivo para inducir el estrés y aumentar la producción de ácidos grasos.
- Caracterizar los extractos en cuanto a la composición de carotenoides.
- Evaluar el efecto de los extractos en la expresión de citocinas como IL-1, IL-6 y enzimas como la COX2.

9. REFERENCIAS

- Abbas A.K., Lichtman A.H.H., and Pillai S. 2012. *Inmunología celular y molecular + Student Consult*: Elsevier Health Sciences Spain. Séptima edición. Madrid. 560 pp.
- Abdulkhaleq, L. A., Assi, M. A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y. H., & Hezmee, M. N. M. (2018). The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary world*, 11(5): 627-635.
- Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life sciences*, 75(6): 639-653.
- Ambrozova, G., Pekarova, M., & Lojek, A. (2010). Effect of polyunsaturated fatty acids on the reactive oxygen and nitrogen species production by raw 264.7 macrophages. *European journal of nutrition*, 49(3): 133-139.
- Ariede, M. B., Candido, T. M., Jacome, A. L. M., Velasco, M. V. R., de Carvalho, J. C. M., & Baby, A. R. (2017). Cosmetic attributes of algae-A review. *Algal research*, 25: 483-487.
- Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 11(11): 419-421.
- Attiq, A., Jalil, J., Husain, K., & Ahmad, W. (2018). Raging the war against inflammation with natural products. *Frontiers in pharmacology*, 9: 976-1003.
- Baker, E. J., Valenzuela, C. A., De Souza, C. O., Yaqoob, P., Miles, E. A., & Calder, P. C. (2020). Comparative anti-inflammatory effects of plant- and marine-derived omega-3 fatty acids explored in an endothelial cell line. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular and Cell Biology of Lipids*, 158662.
- Bonfanti, C., Cardoso, C., Afonso, C., Matos, J., Garcia, T., Tanni, S., & Bandarra, N. M. (2018). Potential of microalga *Isochrysis galbana*: Bioactivity and bioaccessibility. *Algal research*, 29: 242-248.
- Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae: their development and commercialisation. *Journal of applied phycology*, 25(3): 743-756.
- Brighenti, F., Valtuena, S., Pellegrini, N., Ardigo, D., Del Rio, D., Salvatore, S., Piatti, P. M., Serafini, M., & Zavaroni, I. (2005). Total antioxidant capacity of the diet is inversely and independently related to plasma concentration of high-sensitivity C-reactive protein in adult Italian subjects. *British Journal of Nutrition*, 93(5), 619-625.
- Conchillo, A., Valencia, I., Puente, A., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2006). Componentes funcionales en aceites de pescado y de alga. *Nutrición Hospitalaria*, 21(3): 369-373.
- Conde, T. A., Neves, B. F., Couto, D., Melo, T., Neves, B., Costa, M., ... & Domingues, M. R. (2021). Microalgae as Sustainable Bio-Factories of Healthy Lipids: Evaluating Fatty Acid Content and Antioxidant Activity. *Marine drugs*, 19(7): 357.
- Custódio, L., Soares, F., Pereira, H., Barreira, L., Vizetto-Duarte, C., Rodrigues, M. J., ... & Varela,

- J. (2014). Fatty acid composition and biological activities of *Isochrysis galbana* T-ISO, *Tetraselmis* sp. and *Scenedesmus* sp: possible application in the pharmaceutical and functional food industries. *Journal of applied phycology*, 26(1): 151-161.
- Davanzo, M. R., Crisma, A. R., Murata, G., Newsholme, P., & Curi, R. (2020). Impact of dietary fatty acids on macrophage lipid metabolism, signaling and function. *Immunometabolism*, 2(1): e200008.
- de Lima, T. M., de Sa Lima, L., Scavone, C., & Curi, R. (2006). Fatty acid control of nitric oxide production by macrophages. *FEBS letters*, 580(13): 3287-3295.
- de Los Reyes, C., Ortega, M. J., Rodríguez-Luna, A., Talero, E., Motilva, V., & Zubía, E. (2016). Molecular characterization and anti-inflammatory activity of galactosylglycerides and galactosylceramides from the microalga *Isochrysis galbana*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(46): 8783-8794.
- de Moraes, M. G., Vaz, B. D. S., de Moraes, E. G., & Costa, J. A. V. (2015). Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *BioMed research international*. 2015: 1-15. 835671.
- Di Nunzio, M., Valli, V., & Bordoni, A. (2016). PUFA and oxidative stress. Differential modulation of the cell response by DHA. *International journal of food sciences and nutrition*, 67(7): 834-843.
- Toche, P. P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4): 446-457.
- Dyson, A., Bryan, N. S., Fernandez, B. O., Garcia-Saura, M. F., Saijo, F., Mongardon, N., ... & Feelisch, M. (2011). An integrated approach to assessing nitroso-redox balance in systemic inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(6): 1137-1145.
- Ebrahimzadeh, M. A., Khalili, M., & Dehpour, A. A. (2018). Antioxidant activity of ethyl acetate and methanolic extracts of two marine algae, *Nannochloropsis oculata* and *Gracilaria gracilis*-an in vitro assay. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54.
- El-Baz, F. K., Aly, H. F., & Abd-Alla, H. I. (2020). The ameliorating effect of carotenoid rich fraction extracted from *Dunaliella salina* microalga against inflammation-associated cardiac dysfunction in obese rats. *Toxicology Reports*. 7: 118-124.
- El-Din, S. M. M. (2019). Accumulation of lipids and triglycerides in *Isochrysis galbana* under nutrient stress. *Applied biochemistry and biotechnology*. 189(2): 359-373.
- Esparza-Espinoza, D. M., Santacruz-Ortega, H. D. C., Chan-Higuera, J. E., Cárdenas-López, J. L., Burgos-Hernández, A., Carbonell-Barrachina, Á. A., & Ezquerro-Brauer, J. M. (2021). Chemical structure and antioxidant activity of cephalopod skin ommochrome pigment extracts. *Food Science and Technology*. 2021: 1-8.
- Ewart, J. W., & Pruder, G. D. (1981). Comparative growth of *Isochrysis galbana* Parke and *Isochrysis aff. galbana*, clone T-ISO at four temperatures and three light intensities. *Journal of the World Mariculture Society*, 12(1): 333-339.
- Fabregas, J., Herrero, C., Cabezas, B., & Abalde, J. (1986). Biomass production and biochemical composition in mass cultures of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke at varying nutrient concentrations. *Aquaculture*, 53(2): 101-113.
- Fainstein, M. K. (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés

oxidativo. Revista de Educación Bioquímica, 26(1): 18-25.

- Fidalgo, J. P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A., & Herrero, C. (1998). Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 166(1-2): 105-116.
- Forbes-Hernández, T. Y., Giampieri, F., Gasparrini, M., Mazzoni, L., Quiles, J. L., Alvarez-Suarez, J. M., & Battino, M. (2014). The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 68: 154-182.
- García, MC. (2013). Producción de microalgas con aplicaciones nutricionales para humanos y animales. *Cuadernos de estudios agroalimentarios*, (5): 83-101.
- Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Giampieri, F., Afrin, S., Alvarez-Suarez, J. M., Mazzoni, L., ... & Battino, M. (2017). Anti-inflammatory effect of strawberry extract against LPS-induced stress in RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 102: 1-10.
- Giordano, E., & Visioli, F. (2014). Long-chain omega 3 fatty acids: molecular bases of potential antioxidant actions. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 90(1): 1-4.
- Giugliano, D., Ceriello, A., & Esposito, K. (2006). The effects of diet on inflammation: emphasis on the metabolic syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*, 48(4): 677-685.
- Gordon, S., Plüddemann, A., & Martinez Estrada, F. (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunological reviews*, 262(1): 36-55.
- Guillard, R.R.L. y Ryther, J.H. (1962). Studies on Marine Planktonic Diatoms I. *Journal Microbiology*. 8: 229-239.
- Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in lipid research*, 45(2): 160-186.
- Gürlek, C., Yarkent, Ç., Köse, A., Tuğcu, B., Gebeloğlu, I. K., Öncel, S. Ş., & Elibol, M. (2020). Screening of antioxidant and cytotoxic activities of several microalgal extracts with pharmaceutical potential. *Health and Technology*, 10(1): 111-117.
- Hafsa, M. B., Ismail, M. B., Garrab, M., Aly, R., Gagnon, J., & Naghmouchi, K. (2017). Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic and anticholinesterase activities of water-soluble polysaccharides extracted from microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 82(5): 509-522.
- Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M. A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M. R., & Nafissi-Varcheh, N. (2010). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 22(1): 43-50.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical society transactions*, 35(5): 1147-1150.
- Harwood, J. L. (2019). Algae: critical sources of very long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biomolecules*, 9(11): 708-722.
- Heo, S. J., Yoon, W. J., Kim, K. N., Oh, C., Choi, Y. U., Yoon, K. T., ... & Jung, W. K. (2012). Anti-inflammatory effect of fucoxanthin derivatives isolated from *Sargassum siliquastrum* in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage. *Food and chemical toxicology*,

50(9): 3336-3342.

- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal*, 54(4): 621-639.
- Hume, D. A. (2008). Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system. *Mucosal immunology*, 1(6): 432-441.
- Ibañez, E., & Cifuentes, A. (2013). Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4): 703-709.
- Jo, W. S., Choi, Y. J., Kim, H. J., Nam, B. H., Hong, S. H., Lee, G. A., ... & Jeong, M. H. (2010). Anti-inflammatory effect of microalgal extracts from *Tetraselmis suecica*. *Food Science and Biotechnology*, 19(6): 1519-1528.
- Jordan, R. E., Adab, P., & Cheng, K. (2020). Covid-19: risk factors for severe disease and death.
- Kaplan, D., Cohen, Z., & Abeliovich, A. (1986). Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass*, 9(1): 37-48.
- Katiyar, R., & Arora, A. (2020). Health promoting functional lipids from microalgae pool: A review. *Algal Research*. 46 (2020): 1-15.
- Keewan, E., & Naser, S. A. (2020). The role of Notch signaling in macrophages during inflammation and infection: implication in rheumatoid arthritis?. *Cells*, 9(1): 111-123.
- Kim, J. H., Kim, S. M., Pan, C. H., Choi, J. K., & Lee, J. K. (2013). Evaluation of anti-inflammatory activities and mechanisms of microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 56(2): 61-67.
- Kim, M., Hwang, I. G., Kim, S. B., & Choi, A. J. (2020). Chemical characterization of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) sprout extracts and their regulation of inflammatory activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells. *Food science & nutrition*, 8(1): 246-256.
- Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., ... & Udalova, I. A. (2011). IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH 1-TH 17 responses. *Nature immunology*, 12(3): 231-238.
- Ko, W. K., Lee, S. H., Kim, S. J., Jo, M. J., Kumar, H., Han, I. B., & Sohn, S. (2017). Anti-inflammatory effects of ursodeoxycholic acid by lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses in RAW 264.7 macrophages. *PLoS One*, 12(6): 1-12.
- Lauridsen, C. (2019). From oxidative stress to inflammation: redox balance and immune system. *Poultry science*, 98(10): 4240-4246.
- Li, H., Meng, F., Wang, Y., & Lin, Y. (2020). Removal of phenol by *Isochrysis galbana* in seawater under varying temperature and light intensity. *Journal of Oceanology and Limnology*, 38(3): 773-782.
- Lin, Y. H., Chang, F. L., Tsao, C. Y., & Leu, J. Y. (2007). Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of *Isochrysis galbana* CCMP 1324 in a batch photoreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 37(2): 166-176.
- Marcos, A., Nova, E., & Montero, A. (2003). Changes in the immune system are conditioned by

- nutrition. European journal of clinical nutrition, 57(1): S66-S69.
- Matos, J., Cardoso, C., Gomes, A., Campos, A. M., Falé, P., Afonso, C., & Bandarra, N. M. (2019). Bioprospection of *Isochrysis galbana* and its potential as a nutraceutical. Food & Function, 10(11): 7333-7342.
- Michalak, I., Chojnacka, K., & Saeid, A. (2017). Plant growth biostimulants, dietary feed supplements and cosmetics formulated with supercritical CO₂ algal extracts. Molecules. 22(1): 66-82.
- Mo, C., Wang, L., Zhang, J., Numazawa, S., Tang, H., Tang, X., ... & Wei, D. (2014). The crosstalk between Nrf2 and AMPK signal pathways is important for the anti-inflammatory effect of berberine in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice. Antioxidants & redox signaling, 20(4): 574-588.
- Monteiro, M., Santos, R. A., Iglesias, P., Couto, A., Serra, C. R., Gouveinhas, I., ... & Díaz-Rosales, P. (2020). Effect of extraction method and solvent system on the phenolic content and antioxidant activity of selected macro-and microalgae extracts. Journal of Applied Phycology, 32(1): 349-362.
- Mularczyk, M., Michalak, I., & Marycz, K. (2020). Astaxanthin and other Nutrients from *Haematococcus pluvialis*: Multifunctional Applications. Marine Drugs, 18(9): 459-481.
- Nair, P V. (2018). Marine n-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation. ICAR-Central Institute of Fisheries Technology, Cochin. 2018: 50-59.
- Neumann, U., Louis, S., Gille, A., Derwenskus, F., Schmid-Staiger, U., Briviba, K., & Bischoff, S. C. (2018). Anti-inflammatory effects of *Phaeodactylum tricornutum* extracts on human blood mononuclear cells and murine macrophages. Journal of Applied Phycology, 30(5): 2837-2846.
- Newton, K., & Dixit, V. M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 4(3): 1-20.
- Nogueira, D. P. K., Silva, A. F., Araújo, O. Q., & Chaloub, R. M. (2015). Impact of temperature and light intensity on triacylglycerol accumulation in marine microalgae. biomass and bioenergy, 72: 280-287.
- Osuna-Ruiz, I., López-Saiz, C. M., Burgos-Hernández, A., Velázquez, C., Nieves-Soto, M., & Hurtado-Oliva, M. A. (2016). Antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweed species from Sinaloa, Mexico. Pharmaceutical biology, 54(10): 2196-2210.
- Paniagua-Michel J, Bückle-Ramírez LF, Granados-Machuca C, Loya-Salinas DH (1989) Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. Revisado por D. Voltolina Lobina, L. F. Bückle Ramírez y E. R. Morales Guerrero. Publicaciones del CICESE. Ensenada, Baja California, México. 61 pp.
- Park, Y. K., Rasmussen, H. E., Ehlers, S. J., Blobaum, K. R., Lu, F., Schlegel, V. L., ... & Lee, J. Y. (2008). Repression of proinflammatory gene expression by lipid extract of *Nostoc commune* var *sphaeroides* Kützinger, a blue-green alga, via inhibition of nuclear factor- κ B in RAW 264.7 macrophages. Nutrition research, 28(2): 83-91.
- Pedraza Chaverri, J., Cárdenas Rodríguez, N., & Chirino, Y. I. (2006). El óxido nítrico y las especies reactivas de nitrógeno. Aspectos básicos e importancia biológica. Educación

Química, 17(4): 443-451.

- Pernet, F., Tremblay, R., Demers, E., & Roussy, M. (2003). Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis sp.* grown in a semicontinuous system. *Aquaculture*, 221(1-4): 393-406.
- Poljsak, B. (2011). Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2011: 1-12.
- Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae: A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(4): 89-100.
- Ren, J., & Chung, S. H. (2007). Anti-inflammatory effect of α -linolenic acid and its mode of action through the inhibition of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression via NF- κ B and mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(13): 5073-5080.
- Riccio, G., & Lauritano, C. (2020). Microalgae with Immunomodulatory Activities. *Marine Drugs*, 18(1): 2-20.
- Riccio, G., De Luca, D., & Lauritano, C. (2020). Monogalactosyldiacylglycerol and sulfolipid synthesis in microalgae. *Marine Drugs*, 18(5): 237-255.
- Robertson, R. C., Guihéneuf, F., Bahar, B., Schmid, M., Stengel, D. B., Fitzgerald, G. F., ... & Stanton, C. (2015). The anti-inflammatory effect of algae-derived lipid extracts on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human THP-1 macrophages. *Marine Drugs*, 13(8): 5402-5424.
- Rodríguez-Cruz, M., Tovar, A. R., del Prado, M., & Torres, N. (2005). Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Revista de investigación clínica*, 57(3): 457-472.
- Rodríguez-Luna, A., Talero, E., Terencio, M. D. C., González-Rodríguez, M. L., Rabasco, A. M., De los Reyes, C., ... & Ávila-Román, J. (2018). Topical Application of Glycolipids from *Isochrysis galbana* prevents epidermal hyperplasia in mice. *Marine drugs*. 16(1): 2-21.
- Roopnarain, A., Gray, V. M., & Sym, S. D. (2014). Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production. *Bioresource technology*. 156: 408-411.
- Russo, R., Barsanti, L., Evangelista, V., Frassanito, A. M., Longo, V., Pucci, L., ... & Gualtieri, P. (2017). *Euglena gracilis* paramylon activates human lymphocytes by upregulating pro-inflammatory factors. *Food science & nutrition*, 5(2): 205-214.
- Salazar-Lopez, N. J., Loarca-Piña, G., Campos-Vega, R., Gaytán Martínez, M., Morales Sánchez, E., Esquerro-Brauer, J. M., ... & Robles Sánchez, M. (2016). The extrusion process as an alternative for improving the biological potential of sorghum bran: phenolic compounds and antiradical and anti-inflammatory capacity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016: 1-8.
- Sánchez, Á., Maceiras, R., Cancela, Á., & Pérez, A. (2013). Culture aspects of *Isochrysis galbana* for biodiesel production. *Applied Energy*. 101: 192-197.
- Sánchez, S., Martínez, M., & Espinola, F. (2000). Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical*

Engineering Journal, 6(1): 13-18.

- Sánchez-Valle, V., & Méndez-Sánchez, N. (2018). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Médica Sur*, 20(3): 161-168.
- Sanz, J. M., Lahoz, A. G., Reina, M. S., & Martín, A. P. (2017). Introducción al sistema inmune. Componentes celulares del sistema inmune innato. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 12(24): 1369-1378.
- Sarkar, D., Saha, P., Gamre, S., Bhattacharjee, S., Hariharan, C., Ganguly, S., Sen, R., Mandal, G., Chattopadhyay, C., Majumdar, S., & Chatterjee, M. (2008). Anti-inflammatory effect of allylpyrocatechol in LPS-induced macrophages is mediated by suppression of iNOS and COX-2 via the NF- κ B pathway. *International immunopharmacology*, 8(9): 1264-1271.
- Ścieszka, S., & Klewicka, E. (2019). Algae in food: A general review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(21): 3538-3547.
- Señoráns, M., Castejón, N., & Señoráns, F. J. (2020). Advanced extraction of lipids with DHA from *Isochrysis galbana* with enzymatic pre-treatment combined with pressurized liquids and ultrasound assisted extractions. *Molecules*, 25(14): 3310.
- Serhan, C. N., & Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology*, 6(12): 1191-1197.
- Serra, D., Almeida, L. M., & Dinis, T. C. (2016). Anti-inflammatory protection afforded by cyanidin-3-glucoside and resveratrol in human intestinal cells via Nrf2 and PPAR- γ : Comparison with 5-aminosalicylic acid. *Chemico-Biological Interactions*. 260: 102-109.
- Shaikh, S. R., & Edidin, M. (2006). Polyunsaturated fatty acids, membrane organization, T cells, and antigen presentation. *The American journal of clinical nutrition*. 84(6): 1277-1289.
- Shalaby, E. A., & Shanab, S. M. (2013). Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African journal of pharmacy and pharmacology*, 7(10): 528-539.
- Sharma, K. K., Schuhmann, H., & Schenk, P. M. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5(5): 1532-1553.
- Shekarabi, S. P. H., Mehrgan, M. S., Razi, N., & Sabzi, S. (2019). Biochemical composition and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana* dried with different methods. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 20,9 (3): 521-524.
- Sibi, G., & Rabina, S. (2016). Inhibition of pro-inflammatory mediators and cytokines by *Chlorella vulgaris* extracts. *Pharmacognosy research*. 8(2): 118-122.
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*. 86: 715-748.
- Simopoulos AP. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr*; 21:495–505.
- Soontornchaiboon, W., Joo, S. S., & Kim, S. M. (2012). Anti-inflammatory effects of violaxanthin isolated from microalga *Chlorella ellipsoidea* in RAW 264.7 macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(7): 1137-1144.
- Soto-León, S., Zazueta-Patrón, I. E., Piña-Valdez, P., Nieves-Soto, M., Reyes-Moreno, C., & Contreras-Andrade, I. (2014). Extracción de lípidos de *Tetraselmis suecica*: Proceso asistido

- por ultrasonido y solventes. *Revista mexicana de ingeniería química*, 13(3): 723-737.
- Sugimoto, M. A., Vago, J. P., Perretti, M., & Teixeira, M. M. (2019). Mediators of the resolution of the inflammatory response. *Trends in immunology*. 40(3): 212-227.
- Sukarni, S., Sumarli, S., Nauri, I. M., Purnami, P., al Mufid, A., & Yanuhar, U. (2018). Exploring the prospect of marine microalgae *Isochrysis galbana* as sustainable solid biofuel feedstock. *Journal of applied research and technology*, 16(1): 53-66.
- Stein, J.R. (1973). *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurement*. Cambridge University Press, New York. 448 pp.
- Taciak, B., Białasek, M., Braniewska, A., Sas, Z., Sawicka, P., Kiraga, Ł., Rygiel, T., & Król, M. (2018). Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PloS one*, 13(6): e0198943.
- Takahashi, S., Yoshida, M., Watanabe, M. M., & Isoda, H. (2019). Anti-inflammatory effects of *Aurantiochytrium limacinum* 4W-1b ethanol extract on murine macrophage RAW264 Cells. *BioMed research international*. 2019: 1-7.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1): 44-84.
- Wang, H., Khor, T. O., Saw, C. L. L., Lin, W., Wu, T., Huang, Y., & Kong, A. N. T. (2010). Role of Nrf2 in suppressing LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages by polyunsaturated fatty acids docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid. *Molecular pharmaceutics*, 7(6): 2185-2193.
- Williams, P. J. L. B., & Laurens, L. M. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, 3(5): 554-590.
- Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., & Kuča, K. (2016). The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. *Archives of toxicology*. 90(8): 1817-1840.
- Yaqoob, P. (2003). Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation. *Trends in immunology*. 24(12): 639-645
- Yoo, K. M., Kim, D. O., & Lee, C. Y. (2007). Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food science and biotechnology*. 16(2): 177-182.
- Yu, C. C., Chen, H. W., Chen, M. J., Chang, Y. C., Chien, S. C., Kuo, Y. H., ... & Chao, L. K. P. (2010). Chemical composition and bioactivities of the marine alga *Isochrysis galbana* from Taiwan. *Natural product communications*, 5(12): 1941-1944.
- Zong, Y., Sun, L., Liu, B., Deng, Y. S., Zhan, D., Chen, Y. L., ... & Lu, D. (2012). Resveratrol inhibits LPS-induced MAPKs activation via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in murine RAW 264.7 macrophage cells. *PloS one*, 7(8), e44107.
- Zhu, L., Nugroho, Y. K., Shakeel, S. R., Li, Z., Martinkauppi, B., & Hiltunen, E. (2017). Using microalgae to produce liquid transportation biodiesel: what is next?. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 78: 391-400.