



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS.

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE “BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO”.

“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIBACTERIANO EN EXTRACTOS
LIPOFÍLICOS DE CIANOBACTERIAS Y MICROALGAS CULTIVADAS A PARTIR
DE MUESTRAS DE AGUA RECOLECTADAS EN EL SECTOR EL CAJAS”

AUTOR:

JACINTO RODRIGO SOLANO SOLANO.

C.I.: 0105325302

DIRECTOR:

Dr. FABIÁN LEÓN TAMARIZ, PhD.

C.I.: 0102311610

ASESORAS:

Dra. SILVIA JOHANA ORTIZ ULLOA, PhD.

C.I.: 0301082897

Dra. MARÍA DE LOURDES JERVES ANDRADE, Mgt.

C.I.: 0101660579

CUENCA – ECUADOR

2017



RESUMEN

Actualmente, se conoce que existen más de 30.000 especies de cianobacterias y microalgas caracterizadas taxonómicamente, de éstas muy pocas han sido estudiadas química y farmacológicamente. Esta falta de información incluso es más crítica cuando se considera a especies de agua dulce provenientes de lagos andinos tropicales; por ende, es importante evaluar la presencia o ausencia del potencial biológico en organismos provenientes de esta región. En esta investigación se evaluó el posible efecto antibacteriano de seis extractos lipofílicos de cianobacterias y microalgas, obtenidos por maceración repetida con diclorometano a partir de especies cultivadas en el Laboratorio de Microalgas del Proyecto VLIR y previamente recolectadas desde pequeños cuerpos de agua en el sector de “El Cajas” de la ciudad de Cuenca-Ecuador (cuatro cianobacterias, una microalga dulceacuícola y un inóculo existente, proveniente del Laboratorio de Ecología Acuática, Evolución y Conservación de la Universidad de Lovaina-Bélgica (microalga marina)) frente a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Esta investigación tuvo 3 fases: la primera fue de cultivo y cosecha de cada especie en su medio específico bajo el control de ciertos parámetros físicos y químicos hasta obtener biomasa suficiente. La segunda fase, denominada de extracción incluyó procesos como la liofilización de la biomasa, maceración repetida con aplicación de ultrasonido y finalmente la eliminación del solvente al vacío del extracto y su conservación. La última fase consistió en la evaluación del potencial antibacteriano frente a cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) mediante el método modificado de microdilución en placa (disolución directa del extracto en caldo tripticasa soya con tween 80). Los resultados indicaron que las cuatro cianobacterias denominadas *Flores #1*, *Koenraad #10*, *Tamariz #5* y *Tamariz #6* y la microalga marina *Tamariz #12* no poseen un potencial antibacteriano contra *S. aureus* (ATCC 25923) mientras que la microalga dulceacuícola *Tamariz #11* posee un ligero potencial activo (CI50: 7.13 µg/mL) manifestando un mecanismo bacteriostático. Sin embargo, las dificultades presentadas en la realización de una disolución completa de los extractos lipofílicos de cianobacterias y microalgas, previo al desarrollo de la medición de actividad biológica, sugiere la necesidad de investigar sobre métodos que permitan garantizar la completa disolución de los extractos y por ende la veracidad de los resultados en este tipo de productos.

Palabras claves: Cianobacterias; Extractos lipofílicos; Microalgas; Técnica de Microdilución modificada; Potencial antibacteriano, *Staphylococcus aureus*.

Por: Jacinto Solano



ABSTRACT

Currently, it is known that there are more than 30,000 species of cyanobacteria and microalgae taxonomically characterized. Very few of them have been studied chemically and pharmacologically. This lack of information is even more critical when it is considered to freshwater species from tropical Andean lakes; therefore, it is important to evaluate the presence or absence of the biological potential in organisms from this region. In this research, the possible antibacterial effect of six lipophilic extracts of cyanobacteria and microalgae obtained by maceration with dichloromethane from cultivated species were evaluated against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Those organisms were cultivated at the Laboratory of Microalgae from the VLIR Project from samples previously collected in small bodies of water in the sector of "El Cajas" of the city of Cuenca - Ecuador (four cyanobacteria, one fresh water microalgae and an existing inoculum from the Laboratory of Aquatic Ecology, Evolution and Conservation of the University of Leuven - Belgium (marine microalgae)). This research had 3 phases: the first one was the culture of each species in its specific medium under the adjust at some physical and chemical parameters until collecting sufficient biomass. The second phase, named extraction included processes such as lyophilization of the biomass, maceration with repeated ultrasound application and finally the removal of the solvent from the extract under vacuum and its preservation. The last one consisted in the evaluation of the antibacterial potential against the strains of *S. aureus* (ATCC 25923) by modifying the plate microdilution method (direct dissolution of the lipophilic extract in trypticase soy broth with tween 80). The results indicated that the four cyanobacteria codified as *Flores #1*, *Koenraad #10*, *Tamariz #5* and *Tamariz #6* and the marine microalgae *Tamariz #12* do not possess an antibacterial potential against *S. aureus* (ATCC 25923), while the sweet water microalgae *Tamariz #11* possesses a slight active potential (IC 50: 7.13 µg/mL) manifesting a bacteriostatic mechanism. However, the presented difficulties in achieving a complete dissolution of cyanobacteria's and microalgae's lipophilic extracts prior to the development of the biological activity measurement, it suggests the necessity to develop a deeper research about methodologies that allows the complete solubilization of them in order to completely trust on results coming from this type of products.

Key words: Antibacterial potential; Cyanobacteria; Lipophilic extracts; Microalgae; modified Microdilution Technique; *Staphylococcus aureus*.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN	14
OBJETIVOS	16
Objetivo General:.....	16
Objetivos Específicos:	16
HIPÓTESIS.....	16
JUSTIFICACIÓN.....	17
CAPÍTULO I.....	18
1. MARCO TEÓRICO	18
1.1 GENERALIDADES DE LA INVESTIGACIÓN	18
1.2 MICROALGAS	18
1.2.1 Generalidades.....	18
1.2.2 Tipos de microalgas.....	20
1.2.3 Estructura y composición.....	21
1.2.4 Reproducción	22
1.2.5 Cinética de crecimiento.	23
1.2.6 Importancia y funciones biológicas.	24
1.2.7 Parámetros a considerar en cultivos de microalgas.	24
1.3 CIANOBACTERIAS.....	25
1.3.1 Generalidades.....	25
1.3.2 Clasificación.	26
1.3.3 Estructura y composición.....	27
1.3.4 Reproducción.	28



1.3.5 Importancia y funciones biológicas.....	29
1.3.6 Parámetros a considerar en cultivos de cianobacterias.....	30
1.4 POTENCIALES BIOLÓGICOS Y BIOTECNOLOGÍA.....	30
1.4.1 Generalidades.....	30
1.5 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	33
1.5.1 Generalidades.....	33
1.5.2 Epidemiología.....	34
1.5.3 Patogenia.....	35
1.5.4 Enfermedades estafilocócicas.....	37
1.5.5 Tratamiento.....	38
1.5.6 Resistencia a antibióticos.....	38
CAPÍTULO II.....	39
2. METODOLOGÍA.....	39
2.1 DESCRIPCIÓN GENERAL.....	39
2.2 ETAPA I o FASE DE CULTIVO.....	40
2.2.1 Descripción	40
2.2.2 Fundamento de los procesos	40
2.2.2.1 Cultivo de microalgas o cianobacterias	40
2.2.2.2 Medios específicos de cianobacterias y microalgas	42
2.2.2.3 Cosecha de biomasa.....	42
2.2.3 Procedimiento	43
2.2.3.1 Cultivo de especies	43
2.2.3.2 Cosecha de biomasa.....	44
2.3 ETAPA II o FASE DE EXTRACCIÓN.....	44
2.3.1 Descripción	44



2.3.2 Fundamento de los procesos	44
2.3.2.1 Secado de biomasa.....	44
2.3.2.2 Extracción de biomasa.....	44
2.3.2.3 Concentración de extracto	45
2.3.3 Procedimientos.....	46
2.3.3.1 Secado de biomasa.....	46
2.3.3.2 Extracción de biomasa.....	46
2.3.3.3 Concentración de extracto	47
2.4 ETAPA III o FASE DE EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIBACTERIANO	47
2.4.1 Descripción.	47
2.4.2 Fundamento de los procesos.	47
2.4.2.1 Preparación del cryostock.....	47
2.4.2.2 Controles antimicrobianos (Ampicilina)	48
2.4.2.3 Preparación del inóculo y placa test	48
2.4.3 Procedimientos:	49
2.4.3.1 Preparación del cryostock.....	49
2.4.3.2 Preparación de controles del antimicrobiano (Ampicilina)	50
2.4.3.3 Preparación del inóculo y placa test	50
CAPÍTULO III.....	52
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
3.1 RESULTADOS DEL RENDIMIENTO DE BIOMASA LIOFILIZADA	52
3.2 RESULTADOS DE LA RELACIÓN ENTRE EXTRACTO Y BIOMASA	52
3.3 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIBACTERIANO	53
3.4 DISCUSIÓN	53



CAPÍTULO IV.....	57
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
4.1 CONCLUSIONES	57
4.2 RECOMENDACIONES.....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS.....	69
ANEXO 1. FOTOS Y TABLAS DE LA ETAPA I EN EL LABORATORIO DE MICROALGAS	69
ANEXO 2. FOTOS Y TABLAS DE LA ETAPA II EN EL LABORATORIO DE FITOQUÍMICA	73
ANEXO 3. FOTOS Y TABLAS DE LA ETAPA III EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura de una microalga eucariota.	22
Figura 1.2. Ciclo reproductivo de las microalgas. A. Reproducción asexual. B. Reproducción sexual.....	22
Figura 1.3 Curva representativa de las 5 fases de un cultivo microalgal.....	24
Figura 1.4. Estructura de una cianobacteria.....	27
Figura 1.5 Reproducción cianobacteriana asexual. 1. Hormogonios. 2. Aquinetos. 3. Endosporas. 4. Exosporas.	29
Figura 1.6 Reproducción cianobacteriana sexual. Heterocisto.....	29
Figura 1.7 Porcentajes de las regiones anatómicas colonizadas por <i>S. aureus</i> en adultos.	35
Figura 1.8 Determinantes de patogenicidad de <i>S. aureus</i>	36



ÍNDICE DE TABLAS Y CUADROS

Tabla 1.1 Requerimientos principales para los cultivos de microalgas y sus rangos de valores.....	25
Cuadro 1.1 Componentes químicos de las cianobacterias.....	28
Tabla 1.2 Taxonomía de <i>S. aureus</i>	34
Tabla 1.3 Propiedades de las determinantes de patogenicidad de <i>S. aureus</i>	36
Cuadro 1.2 Resumen de las enfermedades causadas por <i>S. aureus</i>	37
Tabla 2.1 Especificaciones de medios de cultivo-especies y tiempo de cambio/cosecha.	
.....	43
Tabla 2.2 Especificaciones para la preparación del cryostock de <i>S. aureus</i>	49
Tabla 2.3 Especificaciones de filas y columnas para la elaboración de la placa test ...	50
Tabla 3.1 Resultados de rendimiento porcentual de biomasa liofilizada.	52
Tabla 3.2 Resultados de DERnative de extracto cianobacteriano y microalgal	52
Tabla 3.3 Resultados de la IC50 y potencial antibacteriano de los extractos lipofílicos microalgales.	53

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.1 Fotos de las 6 especies de cianobacterias y microalgas investigadas, observadas a 40X.....	69
Anexo 1.2 Foto de los cultivos de las cianobacterias y microalgas en el laboratorio. .	69
Anexo 1.3 Tabla de la composición y preparación del medio BG-11.....	70
Anexo 1.4 Tabla de la composición y preparación del medio WC.	70
Anexo 1.5 Tabla de la composición y preparación del medio F/2.	70
Anexo 1.6 Tabla de la solución stock de traza de metales para el medio BG-11.....	71
Anexo 1.7 Tabla de la solución stock de traza de metales para el medio WC.	71
Anexo 1.8 Tabla de la solución stock de traza de metales para el medio F/2.	72



Anexo 1.9 Tabla de la solución stock de vitaminas para los medios WC y F/2.....	72
Anexo 2.1 Fotos de la congelación, liofilización y biomasa microalgal liofilizada....	73
Anexo 2.2 Fotos de la sección de extracción lipofílica de la biomasa cianobacteriana y microalgal con DCM.	73
Anexo 2.3 Fotos de la sección de concentración de extracto cianobacteriano y microalgal.	74
Anexo 3.1 Fotos de los reactivos utilizados (TSA, ampicilina y resazurina).	74
Anexo 3.2 Fotos del cryostock de <i>S. aureus</i> y extractos microalgales investigados... Anexo 3.3 Foto de la placa test mostrando resultados y controles.	74
Anexo 3.4 Foto de placa test lig. positiva y efecto antibacteriano del extracto microalgal vs <i>S. aureus</i>	75
Anexo 3.5 Foto del equipo de microELISA.	76
Anexo 3.6 Tabla de las diluciones para la preparación del cryostock de <i>S. aureus</i>	76
Anexo 3.7 Tabla de la preparación de controles de antimicrobianos de ampicilina. ... Anexo 3.8 Tabla de porcentajes de inhibición promedio de los extractos microalgales.	76
Anexo 3.9 Tabla y gráfica de los porcentajes de inhibición del control antimicrobiano (Ampicilina).....	77



CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

JACINTO RODRIGO SOLANO SOLANO, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIBACTERIANO EN EXTRACTOS LIPOFÍLICOS DE CIANOBACTERIAS Y MICROALGAS CULTIVADAS A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA RECOLECTADAS EN EL SECTOR EL CAJAS**", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, Diciembre 1 de 2017

Jacinto Rodrigo Solano Solano

C.I: 0105325302

Por: Jacinto Solano



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

JACINTO RODRIGO SOLANO SOLANO, autor del trabajo de titulación “EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIBACTERIANO EN EXTRACTOS LIPOFÍLICOS DE CIANOBACTERIAS Y MICROALGAS CULTIVADAS A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA RECOLECTADAS EN EL SECTOR EL CAJAS”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, Diciembre 1 de 2017.

Jacinto Rodrigo Solano Solano

C.I: 0105325302

Por: Jacinto Solano



DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a Santísima Trinidad y a la Virgen Santísima María por ser una gran luz en mi vida y permitirme alcanzar mis metas y por sus bendiciones recibidas.

A mis padres, abuelos, tíos y familiares, quienes me apoyaron siempre y me enseñaron a luchar y ser constante ante cualquier situación de la vida.

A mis docentes de la Facultad, quienes me otorgaron los mejores conocimientos y experiencias, formándome como persona y como profesional con respeto a la sociedad.

A mis amigos y compañeros, por su apoyo e ideas para salir adelante y demostrar que podemos alcanzar más de lo que soñamos...



AGRADECIMIENTO

Mi sincero agradecimiento a mi Director: *Dr. Fabián León*, por su valiosa orientación, apoyo, comprensión y supervisión constante durante todo el periodo de desarrollo de esta investigación; de igual manera a mis asesoras: Dra. Johana Ortiz y Dra. Lourdes Jerves, y que, gracias a su gran conocimiento y experiencia, se ha logrado los objetivos planteados.

Quiero extender mi profunda gratitud a todos los integrantes que forman parte del proyecto VLIR de Plantas Medicinales, por permitirme el ingreso a sus laboratorios y el uso de sus equipos, materiales y reactivos para el desarrollo de dicha investigación; en especial a las Magísteres Jéssica Calle, Andrea Abril y Diana Morales por su capacitación, comprensión y apoyo en sus áreas representadas y por su confianza depositada en mí; de igual manera un agradecimiento a las Dras. Isabel Wilches y Nancy Cuzco por su valiosa autorización y ayuda en todo lo requerido para la investigación, junto con el señor bodeguero y fiscal que han facilitado la obtención y uso de varios reactivos y materiales.

Al personal del Laboratorio de Sanitaria del Departamento de Ingeniería Civil por permitirme utilizar su laboratorio para la realización de este proyecto.

A todos los docentes de la Facultad de Ciencias Químicas por los conocimientos y experiencias impartidas durante los años académicos, valiosos para toda la vida profesional.

Un agradecimiento especial a mi familia y amigos, que cooperaron de alguna manera para la realización de esta investigación. A todos...

¡MUCHAS GRACIAS!

El Autor.

Por: Jacinto Solano

Pág. 13



INTRODUCCIÓN

Las microalgas y las cianobacterias son microorganismos fotosintéticos, capaces de generar biomasa orgánica a partir de CO₂ y luz, usando al agua como dador de electrones y oxidándola a O₂. Las microalgas y cianobacterias difieren en muchos aspectos, especialmente en que las primeras son unicelulares-eucariotas y las segundas son uni o pluricelulares-procariotas, pero desde el punto de vista de la ingeniería de procesos, lo relevante es que crecen usando luz como fuente de energía y CO₂ como fuente de carbono. Sin embargo, tienen requerimientos nutricionales distintos, especialmente teniendo en cuenta que muchas cianobacterias pueden fijar N₂ atmosférico, mientras que las microalgas necesitan especies nitrogenadas como nitrato, amonio o aminoácidos (Fernández S., 2014).

Hoy en día, la obtención de compuestos terapéuticos (*antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antioxidantes, antiinflamatorios, etc.*) provenientes de los extractos de cianobacterias y microalgas cobran mayor importancia en el campo de la salud; la producción de compuestos químicos específicos de alta pureza como biocombustibles, biofertilizantes, intercambiadores iónicos y carotenos; así como su aplicación en tratamiento de aguas residuales y además como alimento de consumo humano y animal debido a su rendimiento 20 veces mayor que los cereales (trigo, cebada, etc.) han llevado al cultivo masivo de estos microorganismos (Colorado G., Moreno T., & Pérez P., 2013).

En alusión a los compuestos terapéuticos (*antibacterianos*), se conoce que las infecciones bacterianas e intoxicaciones ocasionadas por alimentos han surgido de manera alarmante en la mayoría de los países del mundo, principalmente causadas por *S. aureus*, una especie bacteriana (coco grampositivo) común a nivel mundial y el segundo microorganismo aislado en pacientes hospitalizados. En el 2012, un estudio realizado en América Latina por un grupo de investigadores del Centro para el Control y Prevención de enfermedades de Madrid determinaron que la prevalencia de infecciones por dicho agente en hospitales es del 62% en Perú, 45% en Colombia, 28% en Ecuador y 26% en Venezuela (Pavas, Pérez, & Rodríguez, 2010). Además, se encontró cepas resistentes a la meticilina (SARM) con una prevalencia que oscilaba del 3,2% en Colombia hasta el 74% en Ecuador y a otros antimicrobianos de forma concomitante, causando principalmente infecciones, morbilidad y mortalidad altas en grupos vulnerables como niños y ancianos. Tal situación ha llevado a buscar nuevas fuentes



para su tratamiento debido a la limitación e ineeficacia de las opciones terapéuticas actuales (Barrios L., 2012).

Esta investigación se realizó para evaluar el potencial antibacteriano en extractos lipofílicos de cianobacterias y microalgas contra *S. aureus* a fin de buscar alternativas nuevas de origen natural como antibioticoterapia.



OBJETIVOS

Objetivo General:

- Evaluar el potencial antibacteriano en extractos lipofílicos de cianobacterias y microalgas cultivadas a partir de muestras de agua recolectadas en el sector “El Cajas”

Objetivos Específicos:

1. Obtener extractos lipofílicos de 6 especies de cianobacterias y microalgas cultivadas en el laboratorio de investigación de Microalgas del proyecto VLIR.
2. Evaluar el potencial antibacteriano con extractos de cianobacterias y microalgas obtenidos por extracción lipofílica con diclorometano frente a una concentración determinada de *Staphylococcus aureus* (ATC 25923) por microdilución.

HIPÓTESIS

“Los extractos de carácter lipofílico obtenidos a partir de microalgas y cianobacterias cultivados en condiciones de laboratorio tienen actividad antibacteriana frente a cepas de *S. aureus*”



JUSTIFICACIÓN

Las cianobacterias y microalgas son fuentes de biomoléculas y metabolitos de gran importancia; en los últimos años se han logrado avances importantes sobre su aplicación en diversos campos como su utilización en problemas de salud humana, cosmética, purificación de aguas residuales, prevención de la contaminación acuática, industria farmacéutica, acuicultura, producción de pigmentos y antibióticos, entre otras (Gómez S. & Ortega A., 2014). La obtención de sus extractos ha hecho enormes contribuciones a la salud humana, gracias a los compuestos presentes en los mismos; sin embargo, su exploración y estudio son básicos aún en nuestra región.

El aumento de enfermedades causadas por microorganismos patógenos, principalmente por *S. aureus* y la resistencia del mismo a los antibióticos tradicionales y efectivos, es una preocupación generalizada, lo cual lleva a buscar fuentes nuevas de origen natural; dentro de ellas podrían estar las cianobacterias y microalgas que pueden presentar mayor potencial antibacteriano y, ante todo, seguridad para toda la población (Velázquez-Meza, 2012). Las infecciones bacterianas, principalmente en pacientes pediátricos y geriátricos son causadas en mayor parte por *S. aureus* (Bush, Pérez, & Schmidt, 2017); por tanto, probar el potencial antibacteriano de extractos lipofílicos de cianobacterias y microalgas implica una opción en la búsqueda de nuevas moléculas activas. Además, si consideramos las especiales condiciones medioambientales presentes en cuerpos de agua del sector de “El Cajas”, las especies allí existentes pueden constituir una fuente novedosa de elementos biológicamente activos. La evaluación del posible efecto antibacteriano presente en extractos de naturaleza lipofílica, obtenidos a partir de especies aisladas de esta fuente es un primer paso en la caracterización de estos microorganismos poco analizados en nuestro país.



CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 GENERALIDADES DE LA INVESTIGACIÓN

Las cianobacterias y microalgas representan un recurso natural aun no explotado desde el punto de vista científico e industrial. Se caracterizan por generar biomasa, útil para la obtención de diferentes productos. Esta biomasa está constituida principalmente por metabolitos como carbohidratos, proteínas, lípidos y metabolitos secundarios tales como polifenoles y carotenoides (Campoverde A. & Pomaquiza L., 2014).

En los últimos años, las cianobacterias y microalgas han sido explotadas en todos los campos de aplicación para encontrar usos nuevos y diferentes de las mismas. Actualmente, ya se consideran como otra opción alimentaria y farmacológica, como fuente de energía, biofertilizantes o en el tratamiento de aguas negras. También, se han logrado extraer numerosos compuestos que han servido como antioxidantes, antibióticos e inhibidores del crecimiento de hongos y otras algas patógenas. Por ello, se les considera como una fuente de sustancias con actividad biológica explotable en diversos campos farmacéuticos (Goiris, Muylaert, & Voorspoels, 2014).

No obstante, el empleo de cianobacterias y microalgas presenta grandes desafíos; requieren de equipos e instalaciones especiales, materiales y sustancias químicas específicas y control de parámetros fisicoquímicos para un cultivo óptimo como luz, temperatura, pH, concentraciones adecuadas de macro y micro nutrientes, etc. Por tanto, dichas barreras de índole científica, ambiental y económica limitan la obtención de una biomasa de calidad y la exploración de nuevas especies y cepas (Aden, Laurens, & Pienkos, 2012).

1.2 MICROALGAS

1.2.1 Generalidades.

El término "**microalga**" no tiene definición taxonómica específica, ya que se incluyen organismos con dos tipos celulares distintos: cianobacterias que tienen estructura celular



procariota y las restantes microalgas con estructura celular eucariota (Contreras, Rojas, & Saldías, 2017).

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas fotosintéticos, de fácil captura y digestión por multitud de organismos que se alimentan en forma directa del fitoplancton. Están distribuidas ampliamente en aguas (marinas, dulces, salobres, residuales), en el suelo, en lugares secos y con poca luz como rocas desnudas, en fuentes termales, en nieves y glaciares profundos; se caracterizan por tolerar incluso condiciones medioambientales extremas y por la capacidad de adaptación y sobrevivencia solo con requerimientos óptimos mínimos (Beltrán, Cubides, Ibáñez, & Nieto, 2017).

Son altamente eficientes en la fijación de CO₂ y en la utilización de la energía solar para producir biomasa; por tanto se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta (Lucero & Siavichay, 2016); tienen una eficiencia hasta cuatro veces superior a las plantas y su importancia radica en su papel fundamental como productoras primarias de biomoléculas de la cadena trófica, sintetizadas a partir de la transformación de energía luminosa a energía química que las convierte en las primeras productoras de materia orgánica (González C., 2015).

González (2015) y Contreras et al. (2017) mencionan que, en cuanto a su alimentación, en general son organismos aerobios fotosintetizadores; obtienen la energía de la luz solar y se desarrollan a partir de materia inorgánica pero algunas especies son capaces de crecer empleando materia orgánica como fuente de energía o de carbono, diferenciándose en:

- a) **Fotoautótrofas:** obtienen la energía del sol y su fuente de carbono son los compuestos inorgánicos; algunas especies tienen la capacidad de combinar su obtención de energía, haciéndola también de manera heterotrófica según sus necesidades; alternan la utilización de la energía luminosa y su transformación a la química, utilizando dióxido de carbono como sustancia orgánica; dichas especies han sido llamadas “fotoautótrofas obligadas”.
- b) **Fotoheterótrofas:** obtienen la energía del sol y emplean compuestos orgánicos como fuente de carbono.



- c) **Mixotróficas:** son capaces de crecer bajo procesos tanto autótrofos como heterótrofos, de manera que la fuente de energía es tanto la luz como la materia orgánica. El carbono lo obtienen de compuestos orgánicos y del CO₂.
- d) **Heterótrofas:** los compuestos orgánicos proporcionan la energía y la fuente de carbono; es decir, pueden desarrollarse en ausencia de luz.

Existen hasta el momento más de 40 mil especies microalgales, alrededor de 400 han sido estudiadas totalmente y una fracción de ellas se explotan comercialmente (Beltrán et al., 2017).

1.2.2 Tipos de microalgas.

De acuerdo al tipo de célula en base a su diferencia estructural, se dividen en dos grandes grupos: procariotas (cianobacterias) y las eucariotas; ambos grupos presentan estructuras o compartimientos similares al de las plantas superiores, tales como los cloroplastos, los cuales cumplen un rol fundamental en la fotosíntesis (Contreras et al., 2017); otras diferencias entre ambos grupos son: por el tipo de pigmentos que tienen, la sustancia de reserva que usan y la forma de las células reproductoras (Beltrán et al., 2017).

En el 2016, Lucero & Siavichay y en el 2017, Beltrán et al. mencionan que, de acuerdo con la clasificación sistemática (recomendada y válida), hay nueve grupos que son:

- 1) **Cianofíceas, cianofitas o algas verdes-azuladas:** al igual que las bacterias, son microorganismos procariotas, cuyas células no presentan sistemas de membranas internas que aíslen los orgánulos del citoplasma (ver Sección 1.3).
- 2) **Clorofíceas, clorofitas o algas verdes:** son un grupo importante de microalgas con cloroplastos bien definidos en forma y localización celular diferente; deben su color a la clorofila *a* y *b*, carotenoides y xantófilas presentes en su estructura. Son capaces de provocar florecimientos o 'blooms' y entre las órdenes más destacadas son las volvocales (con flagelos) y las clorococales (sin flagelos).
- 3) **Criptofitas o algas pardas:** de clase *Phaeophyceae*, las células son a menudo unicelulares y flageladas, con plastos generalmente de color marrón, aunque los hay verdes, amarillos o verde azulados. Las células presentan una forma particular, con frecuencia aplazadas y dos flagelos casi iguales.



- 4) Crisofitas o algas doradas:** son individuos unicelulares o coloniales de diversas formas, más raramente filamentosos; presentan plastos de color amarillo, a menudo verdosos o marrones; y su color se debe al enmascaramiento de la clorofila por parte del alto contenido en carotenos.
- 5) Diatomeas:** sus pigmentos fotosintéticos más destacados son la clorofila *a* y *c* y el carotenoide *fucoxantina*; son unicelulares o coloniales, de origen marino, de plastos marrones o amarillos impregnados en sílice formando valvas que suelen situarse a modo de caja y que pueden presentar una ornamentación característica. Producen el 70% del oxígeno para la vida en la Tierra y todo perecería sin ellas.
- 6) Dinofitas o dinoflagelados:** de clase *Pyrrophyceae*, en general son células flageladas móviles, aunque hay especies cocoides inmóviles; las células suelen presentar una hendidura ecuatorial en la que se insertan dos flagelos, uno transversal y otro longitudinalmente como por ejemplo: *Ceratium hirudinella*.
- 7) Euglenofitas:** incluye las formas unicelulares, solitarias, desnudas o loricadas, que nadan libremente, con 1, 2, 3 ó 7 flagelos dispuestos de forma variada.
- 8) Rodofitas o algas rojas:** de clase *Rhodophyceae*, son representativas del medio marino, encontrándose pocas en aguas dulces y sus pigmentos fotosintéticos incluyen tres tipos de ficobilinas que les confieren su color característico.
- 9) Xantofitas o algas verde-amarillentas:** de clase *Chrysophyceae*, poseen xantófilas y existe una amplia variabilidad morfológica que va desde formas unicelulares, móviles e inmóviles hasta formas filamentosas; son de aguas dulces, suelos y algunas de mar.

1.2.3 Estructura y composición.

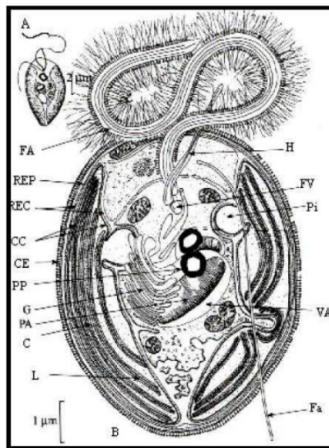
Las microalgas varían en forma y tamaño (2-200 µm); unicelulares, filamentosos que forman cadenas, colonias o cenobios; contienen clorofila y pigmentos carotenoides, y sintetizadoras de ácidos grasos como precursores para la síntesis de varios tipos de lípidos y triglicéridos; la mayoría de los lípidos microalgales son polares y son los componentes de sus membranas mientras que los triglicéridos son reservas de ácidos grasos para la división celular, energía metabólica, mantenimiento de la membrana, síntesis y una amplia variedad de funciones fisiológicas (Lucero & Siavichay, 2016), (AlgaEnergy, 2017) y (Contreras et al., 2017).



Figura 1.1. Estructura de una microalga eucariota.

Estructuras:

- C: Cloroplasto
CC: Cubierta del cloroplasto
CE: Cubierta externa
Fa: Flagelos
FV: Flagelo vestigial
G: Cuerpo de golgi
H: Haptonema
L: Lamela
PA: Paramylon
Pi: Pirenoide
PP: Polifosfatos
REC: Retículo endoplasmático del cloroplasto
REP: Retículo endoplasmático periférico
VA: Vacuola (paramylos y polifosfatos)



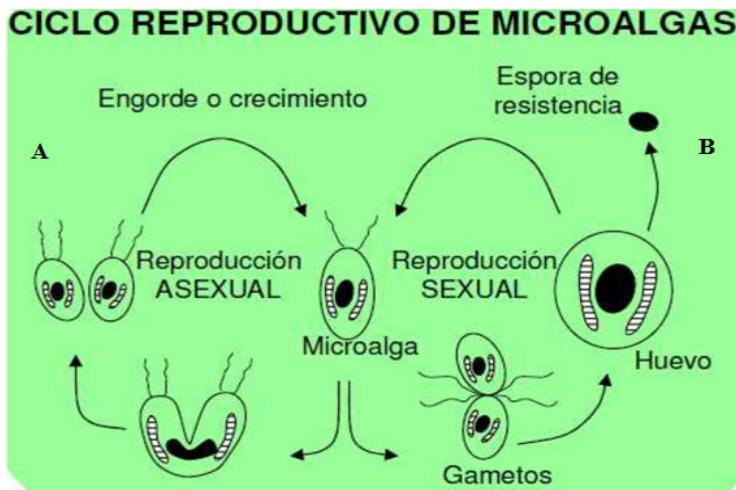
Fuente: (Contreras, Rojas, & Saldias, 2017).

La composición bioquímica puede modificarse fácilmente variando las condiciones ambientales y/o la composición del medio de cultivo, están compuestas por proteínas (65% en base seca), carbohidratos (20-30%), lípidos (10-30%) y cenizas (5-10%) que varían según el género y dentro de una misma especie (AlgaEnergy, 2017).

1.2.4 Reproducción.

Beltrán et al. & Contreras et al. (2017), afirman que, en general se pueden multiplicar vegetativamente o reproducirse sexual y asexualmente (la más común).

Figura 1.2. Ciclo reproductivo de las microalgas. A. Reproducción asexual. B. Reproducción sexual.



Fuente: (Contreras, Rojas, & Saldias, 2017).



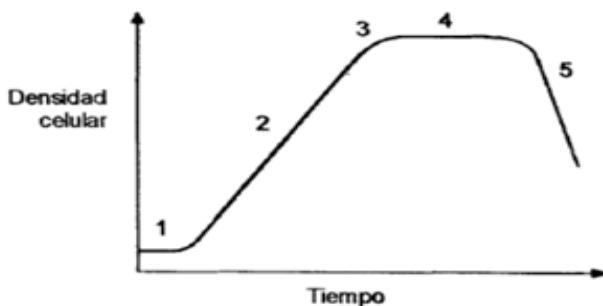
1.2.5 Cinética de crecimiento.

Según Lucero & Siavichay (2016) y Contreras et al. (2017), independientemente de la especie y el volumen cultivado de microalga, se reconoce un patrón estándar de crecimiento (ver Fig. 1.6), dado por las siguientes fases:

- 1. Fase de adaptación, retraso o inducción:** en esta fase no ocurre un incremento visible en el número de células, pueden incluso llegar a disminuir con respecto al inóculo inicial (en algunas especies hay un ligero aumento); esto se debe a la adaptación de las microalgas al medio de cultivo y modificación de su metabolismo, principalmente un aumento en los niveles de enzimas.
- 2. Fase exponencial:** las células comienzan a multiplicarse, se observa un aumento acelerado en forma exponencial de la densidad celular en función del tiempo. No obstante, esta fase de crecimiento depende principalmente de la especie de microalga, la intensidad de la luz y de la temperatura.
- 3. Fase de disminución:** la división celular se ralentiza, debido al desbalance ocasionado por el incremento de la población y, por tanto, disminución de nutrientes, cambios de pH y alteración de otros factores físicos y químicos que comienzan a limitar el crecimiento.
- 4. Fase estacionaria:** el número de células se mantiene constante por cierto período de tiempo debido al balance entre la natalidad y la mortalidad de las mismas.
- 5. Fase de muerte o accidente:** las células pueden durar en la fase anterior semanas e incluso meses, pero cuando se deteriora la cantidad de agua y los nutrientes esenciales se agotan, empiezan a morir, la densidad celular disminuye rápidamente y el cultivo colapsa eventualmente.



Figura 1.3 Curva representativa de las 5 fases de un cultivo microalgal.



Fuente: (Contreras, Rojas, & Saldias, 2017).

1.2.6 Importancia y funciones biológicas.

Principalmente constituyen un recurso nutricional en la naturaleza para otros seres vivos como los hongos, animales, etc. Durante la fotosíntesis liberan oxígeno (O_2), que es utilizado por todos los organismos aerobios y aunque constituyen menos del 1% de la biomasa fotosintetizadora de la tierra, son de especial importancia en el fitoplancton debido a que estos microorganismos son responsables del 45% del total de la producción de materia orgánica del planeta (Lucero & Siavichay, 2016) y (AlgaEnergy, 2017).

Además, entre otras de sus funciones, se destacan las siguientes:

- Reducción de compuestos contaminantes desde aguas residuales.
- Reducción de demanda biológica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO) en el agua.
- Remoción de nitrógeno y fósforo en aguas residuales, por ser los nutrientes esenciales en la formación de biomasa.
- Remoción de metales pesados en aguas tratadas de consumo y laboratorio.
- Remoción de patógenos de aguas residuales y tratadas como: *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella* (bacterias), virus y protozoos (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

1.2.7 Parámetros a considerar en cultivos de microalgas.

La elección de las especies a cultivar depende directamente de la finalidad que se le desea brindar a la biomasa resultante (pigmentos, alimento) y/o fotorremediación. En un cultivo



para fícorremediación, se debe cumplir con 3 condiciones: alta tasa de crecimiento, alta tolerancia a la variación estacional y diurna si es un sistema abierto y buena capacidad para formar agregados en una cosecha por simple gravedad (Colorado et al., 2013).

Los parámetros físicos y químicos requeridos para un cultivo se resumen en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1 Requerimientos principales para los cultivos de microalgas y sus rangos de valores.

	REQUERIMIENTO	COMPUESTOS QUÍMICOS	VALORES
Físicos	Luz		2,000 – 4,000 lux
	Temperatura		15 – 22°C
	Salinidad		0.37‰
	pH		7 – 9
	Redox		
Nutritivos	C	CO ₂ CO ₃ ≈	g/100 ml
	O, H	O ₂ H ₂ O	g/100 ml
	N	N ₂ NH ₄ ⁺ NO ₃	g/100 ml
	P	PO ₄ ≈	g/100 ml
	S	SO ₄ ≈	g/100 ml
	Na, K, Ca, Mg	Sales	g/100 ml
	Fe, Zn, Mn, B, Br, Si	Sales	mg/100 ml
	Cu, Co, Cl, I, Sr, Rb, Al, et	Sales	μg/100 ml
	Vitaminas	B ₁₂ , tiamina, biotina	μg/100 ml

Fuente: (Dpto. de Pesca FAO, 2017)

1.3 CIANOBACTERIAS

1.3.1 Generalidades.

Las cianobacterias también llamadas cianofitas, cianoficeas o algas verdeazuladas poseen sustancias fotosintéticas del tipo de la clorofila y ficocianina (pigmento de color azulado); son un grupo de microalgas del filo mónera, microorganismos procarióticos, puesto que carecen de membrana nuclear; de la división Cyanophyta, clase Cyanophyceae; son microorganismos uni o pluricelulares, autótrofos, fotosintéticos y similares al grupo de las bacterias grampositivas (Dpto. Biología General UNPSJB, 2016).

Distintos especialistas (tanto microbiólogos como fícologos) consideran que las algas verdeazuladas no pertenecen al grupo de las algas, a pesar de compartir una gran cantidad de caracteres con éstas, sino que debido a que su organización celular es procariótica, deben ser clasificadas como bacterias (Dreckmann, Sentíes, & Núñez, 2013).



Según el Departamento de Biología General de Universidad Nacional de La Patagonia San Juan Bosco (2016), las algas cianofíceas son cosmopolitas y ubiquistas, predominan en ambientes acuáticos con un amplio rango de salinidad y temperatura, pero mayormente en agua dulce (aguas continentales), aunque hay muchas especies marinas; en algunos casos viven sobre suelo, rocas y partes vegetales húmedas en forma de manchas incrustadas o como almohadillas viscosas verde azulosas, oliváceas, pardas o casi negras y también hay las que habitan en aguas termales (hasta 80 °C), en desiertos y lugares helados, soportando temperaturas de hasta 90 °C y otras condiciones ambientales más extremas que cualquier otro organismo fotosintético (Grupo Investigación UCM, 2012); pueden vivir en simbiosis con hongos, protozoos y plantas. Poseen estromatolitos (estructuras nodulares irregulares ramificadas con frecuencia, más normalmente cilíndrica), de configuración lamelico-concéntrica (Duiops.net, 2009).

Las cianobacterias realizan fotosíntesis y desprenden oxígeno, generalmente tienen solo una forma de clorofila “a” y todas poseen pigmentos biliproteicos como las ficobilinas, que funcionan como pigmentos accesorios de la fotosíntesis. Las ficocianinas (una clase de ficobilinas) son azules y tienen el máximo de absorción de la luz a unos 625 nm y junto con la clorofila a (verde) dan a éstas su característico color verdeazulado. (Posada P., 2014) Se caracterizan por la fijación de nitrógeno y producción de geosmina y toxinas (Sánchez, 2017).

1.3.2 Clasificación.

El número de especies conocidas de cianobacterias ronda las 2.000; la ordenación sistemática de las cianobacterias está basada en su aspecto morfológico que no coincide con los estudios genéticos. En las cianobacterias se distingue una sola división Cyanophyta y una sola clase *Cyanophyceae*; las diferencias existen entre las cianobacterias con clorofila a y b y con/sin ficobiliproteínas (Grupo Investigación UCM, 2012).

La clasificación en órdenes de la cianobacterias atiende a su morfología; las unicelulares de vida independiente o colonial constituyen el orden Chroococcales, los filamentos simples desprovistos de heterociste las Oscillatoriales, los filamentos simples con heterociste las Nostocales, las formas más complejas están incluidas en el orden Stigonematales (Grupo Investigación UCM, 2012).

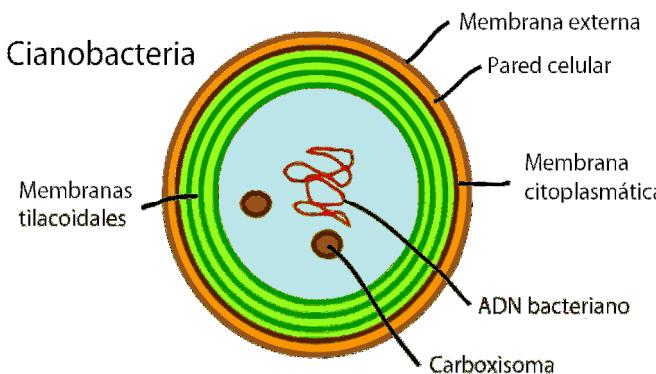


Según la forma de reproducirse, se dividen en cinco grupos: *unicelulares*, *pleurocapsaleanos*, *oscilatorias*, *nostocaleanos* y *ramificadas* (Sánchez, 2017).

1.3.3 Estructura y composición

El tamaño celular de las cianobacterias está comprendido entre los 5-20 μm , son de mayor tamaño que las bacterias, pero menores que las células eucarióticas, ninguna posee flagelos y poseen el aparato fotosintético denominado ficobilisoma ya que carecen de cloroplasto. Pueden presentarse aisladas o agrupadas en colonias (*Schizothrix*), cuando las colonias se agrupan pueden observarse como manchas o puntos cafés en rocas sumergidas (Grupo Investigación UCM, 2012).

Figura 1.4. Estructura de una cianobacteria.



Fuente: (Herrero & Flores, 2008)

Presentan gran variedad de niveles de organización, desde la más simple y poco común en unicelulares, pues generalmente se encuentran a partir de dos células unidas por la vaina hasta cenobios, colonias, filamentos simples (conformados por el tricoma más la vaina) y multisierados que pueden presentar ramificaciones verdaderas o falsas y el nivel más complejo como de los eucarióticos (Dreckmann, Sentíes, & Núñez, 2013).

Están compuestas por pared celular de mureína, formada por peptidoglucanos; frecuentemente las cianobacterias producen mucílagos que se depositan externamente en una o varias capas. En el interior celular se distingue una zona central incolora que contiene ADN y su periferia coloreada donde se sitúan los ribosomas de manera dispersa y los tilacoides, en los cuales se encuentran las clorofilas y los demás pigmentos fotosintéticos (carotenos y xantofilas); las ficobiliproteínas se encuentran en corpúsculos dispuestos sobre los tilacoides.



En el citoplasma se observan gránulos de cianoficina y volutina, y a veces vesículas con gas (Dpto. Biología General UNPSJB, 2016). Poseen movimiento bien sea hacia delante y atrás o en forma pendular. Estos movimientos son afectados por la luz y la temperatura en forma directa y parecen deberse a la excreción de mucílago a través de los diminutos poros de la pared celular (Posada P., 2014).

Otra de las estructuras presentes en las cianobacterias son las vacuolas de gas que les ayudan a la flotación y se encuentran en especies de muy diferentes géneros, también todas las especies que forman filamentos verdaderos presentan hormogonios, filamentos modificados relacionados con la reproducción y la dispersión del microorganismo y que contienen altos niveles de nitrógeno, fósforo y otros nutrientes. Además, presentan 2 tipos de células especializadas, los acinetos que generan una capa externa protectora ante condiciones adversas y el heterociste, especializada en la asimilación del N₂ atmosférico (Dpto. Biología General UNPSJB, 2016).

Cuadro 1.1 Componentes químicos de las cianobacterias.

Pigmentos relacionados con la fotosíntesis	Productos de reserva
<i>Clorofila a</i> (<i>clorofila a</i> y <i>b</i> en algunas)	<i>Cianoficina</i> : constituye una reserva nitrogenada
<i>Ficobilinas</i> (<i>Ficoeritrina</i> y <i>Ficocianina</i>)	<i>Volutina</i> : constituye una reserva fosfatada
<i>Alloficocianina</i>	<i>Almidón</i>
<i>β-caroteno</i>	
<i>Xantofilas</i>	

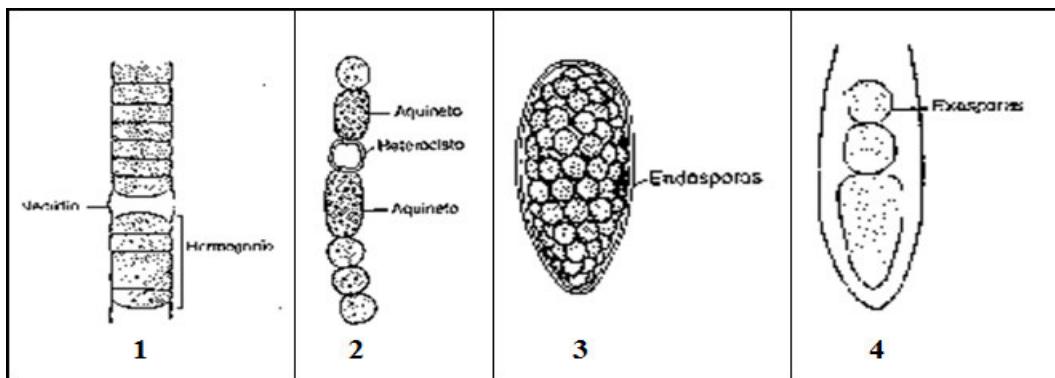
Fuente: (Dpto. Biología General UNPSJB, 2016).

1.3.4 Reproducción.

La reproducción celular más común es la asexual por fisión binaria o múltiple con heteroquistes (hormogonios) y acinetos (esporas) que originan los hormogonios, los cuales dan lugar a una nueva célula al separarse de los filamentos originales mientras que la reproducción sexual es poco conocida; se originan mediante células especializadas llamadas heterocistos, también representan un punto débil en el tricoma ante la agitación del medio y sirven para la fijación de nitrógeno molecular (N₂) (Dreckmann, Sentíes, & Núñez, 2013).

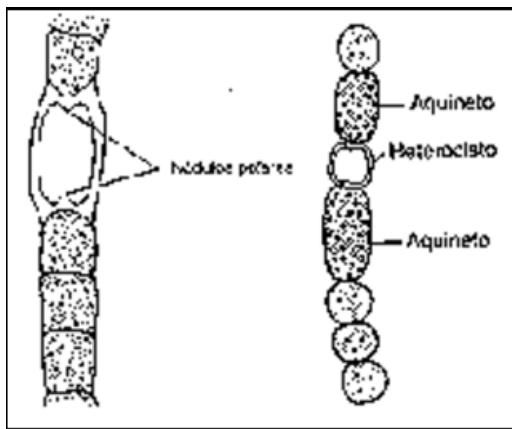


Figura 1.5 Reproducción cianobacteriana asexual. 1. Hormogonios. 2. Aquinetos. 3. Endosporas. 4. Exosporas.



Fuente: (Posada P., 2014).

Figura 1.6 Reproducción cianobacteriana sexual. Heterocisto.



Fuente: (Posada P., 2014).

1.3.5 Importancia y funciones biológicas.

Tienen la capacidad de efectuar el complejo de reacciones químicas (fotosíntesis), por el cual una molécula de agua en presencia de luz solar es desdoblada originando el desprendimiento de dos átomos de oxígeno y un átomo de hidrógeno que es utilizado junto con moléculas de CO₂ atmosférico para producir azúcares, compuestos que son la base fundamental de todos los organismos vivos. Durante las horas de oscuridad las cianobacterias se encuentran involucradas en el proceso conocido como respiración celular por medio del cual obtienen energía al quemar moléculas de azúcar en presencia de oxígeno; en este proceso se liberan moléculas de CO₂ y agua (Grupo Investigación UCM, 2012).



Intervienen como formadoras primarias del plancton, su capacidad de fijar N₂ confiere a las cianofitas que la poseen un significado especial en el medio acuático, pues regulan la relación entre el fósforo y el nitrógeno de las aguas (Posada P., 2014).

Algunas cianobacterias tienen la capacidad de la diazotrofia, la conversión del nitrógeno gaseoso (N₂) en amonio en el suelo, contribuyen a la formación de arrecifes coralinos segregando carbonatos de calcio y magnesio. También pueden ser utilizadas como indicadores biológicos de la contaminación porque muchas especies restringen su hábitat a aguas polucionadas (Dpto. Biología General UNPSJB, 2016).

Además, se debe tener cuidado con algunas especies de cianofitas fijadoras de N₂ ya que contienen lipopolisacáridos y alcaloides, productos tóxicos que han provocado envenenamientos frecuentes en las poblaciones acuáticas luego de la formación de florecimientos densos y en el hombre se han producido diarreas, daños cutáneos y hepáticos (Posada P., 2014).

1.3.6 Parámetros a considerar en cultivos de cianobacterias.

Las cianobacterias requieren la mayoría de las mismas condiciones de las microalgas eucariotas; las variaciones están en la temperatura óptima que oscila entre 35 y 40 °C, aunque algunas especies pueden crecer en efluentes de aguas termales hasta 85 °C. Requieren nitratos o amonio y crecen normalmente en medios alcalinos, en los cuales se desarrollan mejor por cuanto utilizan el ion bicarbonato como fuente de carbono para la fotosíntesis; algunas especies toleran y prosperan en aguas ácidas. Todo cambio en la concentración de nitrógeno y de fósforo acaba manifestándose en un avance o en un retroceso de su desarrollo (Posada P., 2014).

1.4 POTENCIALES BIOLÓGICOS Y BIOTECNOLOGÍA

1.4.1 Generalidades.

Se han propuesto y desarrollado numerosas aplicaciones de las cianobacterias y microalgas eucariotas en diversos campos tecnológicos, en cultivo masivo o continuo, libres o inmovilizadas, vivas o procesadas (Gómez L., 2007). Sus potenciales biológicos



(antimicrobianos, antiinflamatorios, antioxidantes, vitamínicos, etc.) encontrados en su biomasa con la aplicación integrada de los conocimientos de la bioquímica, la microbiología, la genética, la ingeniería química y las técnicas y equipos adecuados de la biotecnología actual han permitido avanzar en las investigaciones y han logrado la síntesis de nuevos productos selectos en:

- a) Alimentación humana:** pocas especies microalgales (alrededor del 10%) son utilizadas para el consumo humano en la dieta, debido al estricto control sobre seguridad alimentaria, factores comerciales, demanda del mercado y preparación específica. Se consideran fuente de proteínas y posibles aplicaciones en nutrición humana por su alto contenido de sales minerales de yodo y potasio, y por poseer sustancias viscosas o coloidales inertes que permiten dar una consistencia gelatinosa a alimentos y preparados industriales (Contreras et al., 2017).
- b) Alimentación animal:** el 30% de la producción mundial de microalgas está destinada al consumo animal; se utilizan en la alimentación de mascotas, peces de acuario, aves ornamentales, ganado y animales machos reproductores, pero no debe darse en exceso ya que podría presentar toxicidad. En acuicultura, las microalgas son la principal fuente de alimentación de moluscos, rotíferos y estados larvarios de peces y crustáceos. Algunas especies de microalgas, tales como los géneros *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Spirulina*, que son consumidas vivas, tienen aspectos beneficiosos para la salud de los animales (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Además, son utilizadas como complemento en las dietas de ciertos peces o para mantener la calidad de su agua (Contreras et al., 2017).
- c) Agricultura:** la biomasa microalgal es utilizada como biofertilizantes ya que mejoran las características nutritivas del suelo, impiden el crecimiento de malas hierbas y aumentan la resistencia de los cultivos a las heladas y plagas (Contreras et al., 2017).
- d) Biomedicina y farmacología:** actualmente hay muchas aplicaciones de sus hidrolizados proteicos y otras aún en investigación, pero se utiliza en dietas de adelgazamiento y tratamientos de heridas; algunas microalgas presentan efectos hipcolesterolémicos, antibacterianos, antifúngicos, inmunoreguladores,



antioxidantes, regeneradoras de células nerviosas y antitumorales (Colorado et al., 2013) y (Contreras et al., 2017).

La actividad antimicrobiana de las microalgas se ha atribuido a compuestos pertenecientes a varias clases químicas, incluyendo: indoles, terpenos, taninos, acetogeninas, sustancias fenólicas como bromofenoles, ácidos grasos, polisacáridos, alcoholes, glicolípidos, péptidos, hidrocarburos volátiles halogenados y enzimas inhibidoras (Cepeda P., 2017).

El 2011, el Centro de Investigación Científica y de Educación de Superior de Ensenada (CICESE) afirma: los ácidos grasos son componentes comunes y no son considerados tóxicos; sin embargo, en especies marinas se ha observado actividad antibacterial frente a diversos patógenos mientras que su ácido graso poliinsaturado docosahexaenoico (DHA) se ha utilizado esencialmente en el desarrollo y fisiología humana (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

Bromofenoles: los halógenos contienen fenoles que funcionan como antisépticos y desinfectantes, por lo tanto, presentan actividad antibacterial (CICESE, 2011).

Terpenoides: se ha observado que inhiben el crecimiento de bacterias y de hongos (CICESE, 2011).

Floroglucinol y taninos: presentan actividad antibacterial y coagulación de proteínas (CICESE, 2011).

Otros antibióticos: tenemos acetonas halogenadas y butonas, estas cetonas son fuertemente inhibidoras del crecimiento de bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Vibrio* (CICESE, 2011).

Estos compuestos se han encontrado en diferentes grupos de microalgas principalmente en las cianobacterias, diatomeas, clorofitas y en menor proporción en otras especies. También se ha encontrado compuestos con actividad fungicida y antiviral. Sin embargo, debido a la estructura compleja de las microalgas y a la falta de estudios o registros previos, aun no se ha logrado aislar dichas sustancias (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada BJ, 2011).



- e) Cosmética:** algunas especies son utilizadas para la elaboración de productos del cuidado de la piel como cremas anti edad, productos refrescantes o regenerantes de piel, emolientes y anti irritantes, debido a sus capacidades de estimular la síntesis de colágeno y de reparar y regenerar los tejidos (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).
- f) Industria química:** en la producción de vitaminas, de colorantes naturales para alimentos humanos y animales por sus pigmentos (β -caroteno, astaxantina, luteína, zeaxantina y bixina) (Hernández-Pérez & Labbé, 2014), fitol, aminoácidos, polisacáridos, glicerol, enzimas, ceras, biosurfactantes, fosfolípidos y lecitinas, ácidos grasos esenciales y prostaglandinas (Contreras et al., 2017).
- g) Producción de biocombustibles:** podrían proporcionar aproximadamente 25% de las necesidades energéticas mundiales en la actualidad. La generación de biodiesel, a partir de sus aceites se presenta como una solución eficiente ante los problemas de contaminación medioambiental; sus altas tasas de crecimiento y producción de lípidos transesterificables; pueden reducir hasta un 78% en emisión de CO₂. La producción de biodiesel podría alcanzar hasta 58.700 L. aceite/ha y se puede obtener: por conversión termoquímica y por conversión bioquímica (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Además, el empleo de las mismas para generar energía termoeléctrica, producción de papel y biopetróleo está en investigaciones debido a que contienen celulosa y otros carbohidratos complejos (Beltrán et al., 2017).

1.5 *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

1.5.1 Generalidades.

S. aureus es conocido también como estafilococo dorado, es un coco grampositivo; su tamaño oscila entre 0,5 a 1,5 μm . de diámetro, es inmóvil, no esporulado y algunas cepas producen una cápsula externa mucoide que aumenta su capacidad para producir infecciones sistémicas; típicamente están agrupados en racimos, aunque en muestras clínicas pueden verse aislados, en diplo o en cadenas (Chans, 2002) y (Cervantes-García, García-González, & Salazar-Schettino, 2014).



Tabla 1.2 Taxonomía de *S. aureus*.

Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>

Fuente: (Flores & Ríos, 2016).

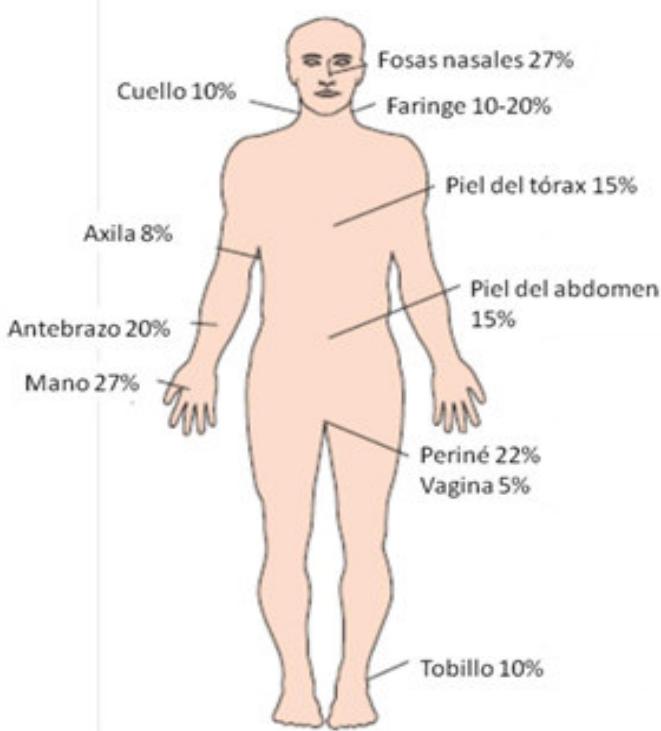
En el 2002 Chans y en el 2012 el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) afirman que, en relación con su *metabolismo*, es generalmente fermentativo, siendo coagulasa y catalasa positivo; es capaz de fermentar la glucosa y manitol en anaerobiosis, posee ácidos teicoicos en su pared, es sensible a la enzima lisostafina y oxidasa negativa. Es un lipocromo, soluble en cloroformo y solventes orgánicos (alcohol, éter, acetona) e insoluble en agua.

1.5.2 Epidemiología.

S. aureus está distribuido a nivel mundial, es una bacteria oportunista que forma parte de la microflora humana; los neonatos son colonizados poco después del nacimiento y los sitios de colonización incluyen: el muñón del cordón umbilical, el área perineal, la piel y a veces, el tracto gastrointestinal (INSHT, 2012) y (Organización de Especialistas en Información de Teratología, 2015).



Figura 1.7 Porcentajes de las regiones anatómicas colonizadas por *S. aureus* en adultos.



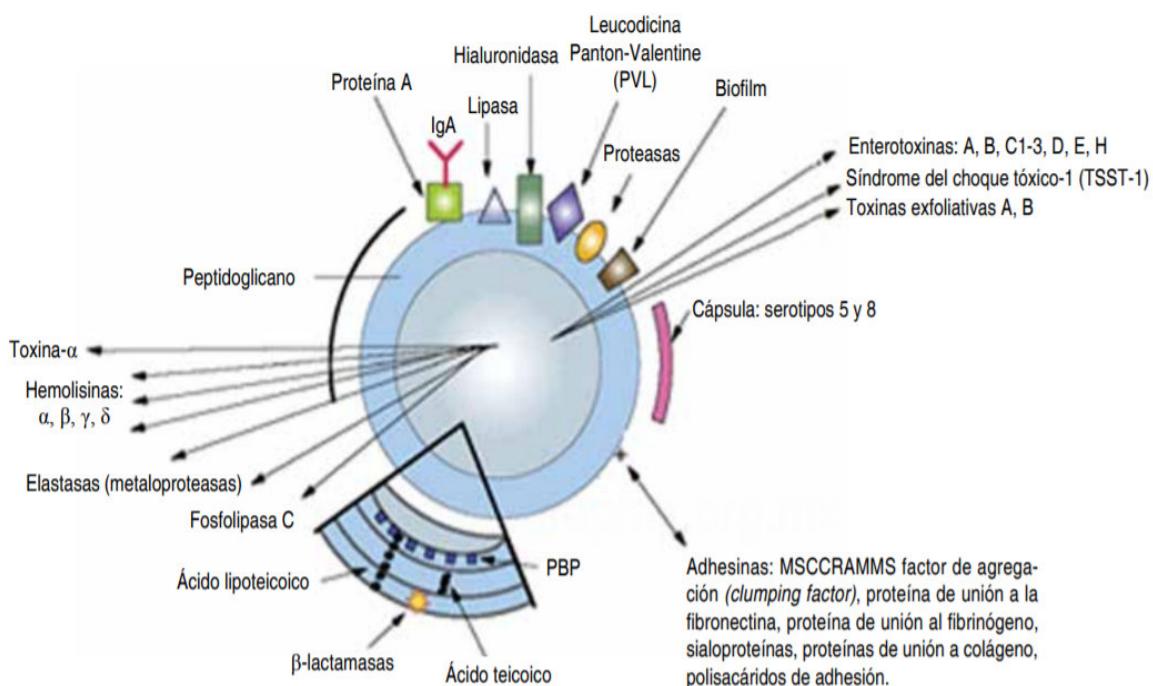
Fuente: (Barrios L., 2012).

1.5.3 Patogenia.

S. aureus posee en su superficie proteínas conocidas por inhibir la fagocitosis y la opsonización por el sistema del complemento debido a la acción de sus determinantes de patogenicidad (cápsula mucoide polisacárida, componentes antigénicos de la pared, producción de enzimas o la secreción de diversas toxinas); produce infecciones por su capacidad de interaccionar con múltiples receptores del huésped a través de diversos componentes de superficie (Cervantes-García et al., 014) y (Flores & Ríos, 2016).



Figura 1.8 Determinantes de patogenicidad de *S. aureus*.



Fuente: (Cervantes-García, García-González, & Salazar-Schettino, 2014).

Tabla 1.3 Propiedades de las determinantes de patogenicidad de *S. aureus*.

Determinante de patogenicidad	Propiedades
Componentes de la pared celular	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Peptidoglicano Activación del complemento ▪ Ácidos teicoicos Antifagocítica ▪ Proteína A Antifagocítica ▪ Cápsula mucoide Adherencia
Enzimas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Coagulasa Formación de absceso ▪ Estafiloquinasas Destrucción del coágulo ▪ Hialuronidasa Invasión hística ▪ Lipasas Colonización
Toxinas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hemolisinas Rotura de la membrana celular ▪ Leucocidina Alteración de la permeabilidad celular de fagocitos ▪ Toxina exfoliatina Epidermolisis ▪ Toxina del shock tóxico Shock ▪ Enterotoxinas Intoxicación alimentaria

Fuente: (Seija, 2008).



1.5.4 Enfermedades estafilocócicas.

Surgen cuando no se logra un equilibrio en la relación bacteria-huésped o cuando se rompe un equilibrio que existía. En el primer caso, el huésped se infecta a partir de otra persona (infección exógena) y en el segundo es un portador (infección endógena) (Chans, 2002). El resultado son dos tipos diferentes de enfermedad que son:

- Infecciones estafilocócicas:** es causada por la proliferación y eventual diseminación bacteriana, una vez desencadenada la infección, entran en juego los múltiples mecanismos de agresión, los que causan destrucción tisular. Afectan a niños, mujeres, ancianos e inmunocomprometidos; es capaz de causar enfermedades de amplio espectro: infecciones menores (piel y mucosas) e infecciones invasoras de mal pronóstico (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2013).
- Intoxicaciones y toxiinfecciones:** son causadas por estafilococos productores de exotoxinas, generalmente son de poca gravitación y varían según los factores predisponentes del huésped (Cervantes-García et al., 2014) y (OEIT, 2015).

Cuadro 1.2 Resumen de las enfermedades causadas por *S. aureus*.

Infecciones	Toxiinfecciones e Intoxicaciones
<p>1. Infecciones superficiales.</p> <p>Cutáneas: forúnculo, impétigo, panadizo</p> <p>Mucosas: conjuntivitis, otitis, sinusitis.</p> <p>Subcutáneas: hidrosadenitis.</p> <p>2. Infecciones profundas.</p> <p>Tenosinovitis, fascitis, flemones.</p> <p>3. Focos metastásicos</p> <p>Infecciones: SNC. (meningitis), musculoesqueléticas (osteomielitis), tracto respiratorio, tracto urinario, gastrointestinales, cardíacas (endocarditis); artritis séptica, neumonía, abscesos parenquimatosos (renales).</p>	<p>1. Shock tóxico</p> <p>Es causado por una potente exotoxina llamada TSST-1 o enterotoxina F. Causa una enfermedad multisistémica aguda caracterizada por fiebre elevada, hipotensión arterial, diarrea acuosa y erupción roja generalizada.</p> <p>2. Síndrome de piel escaldada (Enfermedad de Ritter)</p> <p>Es causado por las toxinas exfoliatinas (ETA y ETB), que unen los desmosomas de las capas granulosas de la epidermis.</p> <p>3. Intoxicación alimentaria estafilocócica</p> <p>Es la más frecuente intoxicación alimentaria.</p>



4. Diseminación por vía sanguínea.

Bacteriemia con/sin shock y falla multiorgánica.

Fuente: (Chans, 2002) y (Seija, 2008).

1.5.5 Tratamiento.

Normalmente se utiliza antibióticos, pero se debe realizar previamente las pruebas de sensibilidad del agente al fármaco a elegir. Los antibióticos que se prescriben en general incluyen: *meticilina*, *penicilina*, *oxacilina* y *amoxicilina* que en algunos casos ya no combaten al agente (denominándose “*Estafilococo aureus* resistente a la meticilina” o “SARM”) y deben combatirse con otros medicamentos (OEIT, 2015).

1.5.6 Resistencia a antibióticos.

Existen múltiples opciones en el tratamiento para *S. aureus*; sin embargo, con el problema creciente de la resistencia a los antibióticos, fundamentalmente a la meticilina (tratamiento eficaz) y otros como aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas han considerado como punto de partida, conocer los principales cambios en los mecanismos de invasión y resistencia del agente que desarrolla debido a sus cambios genéticos a fin de seleccionar el antibiótico ideal (Cortés, Cuervo, Rodríguez, Silva, & Tibavizco, 2007). Otra consideración que ha llevado a la resistencia del agente es el uso inapropiado, dosificación mal controlada junto con la falta de adherencia al tratamiento que han originado mecanismos de resistencia a grupos de β -lactámicos, glicopéptidos, macrólidos, aminoglucósidos, quinolonas y tetraciclinas; estos aspectos dependientes del agente y del paciente han llevado a tal situación (Seija, 2008).



CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 DESCRIPCIÓN GENERAL

La Universidad de Cuenca (UC) a través del proyecto VLIR de Plantas Medicinales realiza investigaciones con especies de cianobacterias y microalgas a fin de evaluar el posible potencial farmacológico de estos microorganismos.

En el presente trabajo se evaluó el potencial antibacteriano de 6 extractos lipofílicos, obtenidos con diclorometano (DCM) a partir de cuatro especies de cianobacterias y una microalga dulceacuícola recolectadas en cuerpos pequeños de agua del sector “El Cajas”, cultivadas en el Laboratorio de Investigación de Microalgas de la UC. El último extracto provino de una microalga marina donada por el Laboratorio de Ecología Acuática, Evolución y Conservación de la Universidad de Lovaina (KU Leuven-campus Kortrijk); dichas especies no tienen identificación taxonómica, por lo que se procedió a asignar códigos según el investigador que realizó la recolección.

Las cianobacterias investigadas fueron *Flores #1*, *Koenraad #10*, *Tamariz #5* y *Tamariz #6*, cultivadas en el medio Blue Green-11 (BG-11); la microalga de agua dulce fue *Tamariz #11*, cultivada en el medio de Wright (WC) y la microalga marina fue *Tamariz #12*, cultivada en el medio modificado de Guillar y Rhyter (F/2).

El muestreo fue de tipo *no probabilístico*, de origen *casual o accidental*; se tomaron 150 mL de agua y se procedió al aislamiento de especies viables (cultivo *in vitro*). Las especies aisladas fueron dispuestas para cultivo en mayor escala a fin de obtener una biomasa en cantidad suficiente para la experimentación (2 gramos de biomasa liofilizada).

La presente investigación fue un screening, por tanto, no tuvo análisis estadístico; la variable independiente fue el *tipo de solvente (lipofílico: diclorometano)* y la variable dependiente fue el *potencial antibacteriano* presente o ausente en cada extracto lipofílico, el cual fue evaluado frente a una concentración de 5×10^3 UFC/mL de *S. aureus* (ATCC 25923).



2.2 ETAPA I o FASE DE CULTIVO

2.2.1 Descripción.

En esta etapa, cada especie de cianobacteria o microalga fue cultivada en su respectivo medio líquido hasta la cosecha de su biomasa respectiva (2 gramos de biomasa liofilizada).

2.2.2 Fundamento de los procesos.

2.2.2.1 *Cultivo de microalgas o cianobacterias:* se realiza a nivel de laboratorios y masivo en fotobioreactores, tiene como fin la obtención de las especies a nivel de laboratorio, la amplificación, la purificación de la población, su caracterización para averiguar las condiciones de cultivo óptimas (temperatura, pH, nutrientes, intensidad luminosa, etc.) y obtener grandes cantidades de biomasa a nivel de cultivo masivo en fotobioreactores (Figueroa-Ortiz, López-Elías, Nieves-Soto, & Voltolina, 2004). Generalmente, el medio líquido común que se utiliza es el F/2 aunque la siembra del inóculo microalgal también se puede dar en medios sólidos (Dpto. de Pesca FAO, 2017) y (Contreras et al., 2017).

Los principales componentes que deben tener los medios para el cultivo de cianobacterias y microalgas son: *agua, hidrógeno, carbono, oxígeno, nitrógeno, fósforo*, macronutrientes (*cloruro de sodio y magnesio, sales de calcio y potasio, sulfatos, etc.*), micronutrientes (*manganese, cobre, cobalto, zinc, molibdeno, vanadio y otros*) y vitaminas (*tiamina, biotina y cianocobalamina*) para especies auxotróficas (Hernández-Pérez & Labbé, 2014) y (Fernández S., 2014).

Se debe controlar algunos parámetros externos que permitan mantener y reproducir el microorganismo en condiciones óptimas. Entre los principales podemos citar:

- a) **Iluminación:** la intensidad luminosa artificial puede variar con el volumen, la concentración celular del cultivo y con la especie. Generalmente el crecimiento es proporcional a la intensidad de la luz recibida, siempre que ésta se sitúe en la fracción del espectro de luz solar fotosintéticamente activa (350 y 700 nm). Las lámparas que se utilizan con mayor frecuencia son del tipo “cool-white” de 40 W y las condiciones favorables a la temperatura de 20 °C son de 1,000 lux. (TECNOPLADES, 2013), (Contreras et al., 2017) y (Dpto. de Pesca FAO, 2017).



b) Temperatura: para el mantenimiento de las cepas es recomendable mantener temperaturas de 18-22 °C y para la reproducción se mantienen a la temperatura más conveniente de la especie. La producción algal aumenta proporcionalmente con la temperatura, generalmente las temperaturas oscilan entre 5-42 °C y las óptimas están entre 28-35 °C (TECNOPLADES, 2013) y (Dpto. de Pesca FAO, 2017).

c) Aireación y Agitación: la agitación facilita la exposición a la luz (excepto en especies flageladas), impide la sedimentación y adherencia a las paredes del reactor; la aireación asegura la distribución de los gases en los cultivos, especialmente en los masivos. La agitación debe ser lenta ya que algunas especies pueden ser sensibles al estrés hidrodinámico por agitación fuerte (Contreras et al., 2017).

e) Oxígeno: el nivel de oxígeno disuelto debe ser controlado, ya que altas concentraciones pueden inhibir la fijación de carbono por parte del enzima RuBisCo y que, junto con la radiación, la temperatura alta y déficit de CO₂ pueden causar la muerte del microorganismo. (Contreras et al., 2017).

f) pH y CO₂: el pH del cultivo está influenciado por varios factores como la productividad algal, la respiración, la composición iónica del medio de cultivo, la actividad microbiana autotrófica-heterotrófica y la eficiencia del sistema de adición de CO₂. Cada especie necesita un rango determinado de pH para un crecimiento óptimo, se encuentra entre 7 y 9 (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

El pH determina la solubilidad del CO₂ y minerales, la distribución relativa de las formas inorgánicas de carbono, influyendo directa o indirectamente en el metabolismo de las microalgas; un aumento de pH puede ocasionar una deficiencia en algunos elementos traza o precipitación de los mismos (TECNOPLADES, 2013).

e) Salinidad: tiene gran influencia en el crecimiento y sobre la productividad de lípidos u otras sustancias microalgales. La membrana plasmática de células de microalgas es permeable al agua, pero no a solutos; en un sistema de estrés salino, las células deben equilibrar su presión osmótica con el exterior aumentando la síntesis de solutos o la incorporación de éstos. El intervalo de salinidad óptimo dependerá de la



especie, teniendo un máximo de 0.05 % en especies no marinas (TECNOPLADES, 2013), (Contreras et al., 2017) y (Dpto. de Pesca FAO, 2017).

2.2.2.2 Medios específicos de cianobacterias y microalgas: en esta investigación se utilizó:

1. Medio BG-11 (Blue Green-11): es el medio específico para las cianobacterias, utiliza concentraciones de nitrato muy altas y concentraciones de fósforo relativamente altas, potenciando el crecimiento de las cianobacterias fijadoras. De igual manera, si se elimina el Na₂CO₃ del medio, se reduce la posibilidad de que cianobacterias no fijadoras de nitrógeno crezcan en el medio de cultivo. El medio se tampona con HEPES a una concentración 2,5 mM y se ajusta el pH a 7,8 (Fundación BBVA, 2009) y (Fundación Parque Científico Tecnológico UPGC, 2017).

2. Medio WC o de Wright: se utiliza para cultivar especies tolerantes de pH neutro y ligeramente alcalino (7-8), al cual se le puede ajustar con HCl o NaOH 1N. Tiene sales, bases nitrogenadas, silicatos, sulfatos y una baja concentración de fosfato, contiene además trazas de varios metales y vitaminas en mezcla o solo una de ellas (Chepurnova, 2000) y (Lucero & Siavichay, 2016).

3. Medio F/2 (Guillard y Ryther): es un medio enriquecido, ideal para el cultivo de microalgas unicelulares (fitoplancton), consta de una base nitrogenada (nitratos), sales (fosfatos), elementos, traza de metales y vitaminas disueltas en agua de mar filtrada. Además, puede ser muy específico en especies marinas, si se modifican su composición o si se añade NaCl a altas concentraciones (Velenzuela E., 2013) y (Dpto. de Pesca FAO, 2017).

2.2.2.3 Cosecha de biomasa: es el paso más importante para recuperar la biomasa después del cultivo y a la vez complejo ya que se debe seleccionar el método de cosecha en base al uso posterior de la misma. Los métodos de recuperación de la biomasa son centrifugación, sedimentación, filtración, flotación y floculación (TECNOPLADES, 2013).

La *centrifugación* es una técnica de separación (decantación selectiva de componentes insolubles) que se utiliza para aislar o concentrar partículas suspendidas en una mezcla sólida-líquida aprovechando la diferente velocidad de desplazamiento según su forma,



tamaño o peso al ser sometidas a una fuerza centrífuga (gravedad artificial); la centrifugación de baja velocidad (máximo de 5000 r.p.m.) es útil en separación de cianobacterias y microalgas (Facultad de Química UNAM, 2014) y (Angurell, et al., 2017).

2.2.3 Procedimiento.

2.2.3.1 Cultivo de especies: se procedió a preparar los respectivos medios de cultivo (BG-11, WC y F/2) según la formulación descrita (ver Anexos 1.3-1.5). Inóculos de 100 mL, conteniendo las distintas especies aisladas fueron traspasados a botellas transparentes de 1 L de capacidad conteniendo 900 mL de medio previamente esterilizado a 1 atm. y 121 °C por 15 minutos (TUTTNAUER, 2540EK, U.S.A.). Las especies *Flores #1*, *Koenraad #10*, *Tamariz #5* y *Tamariz #6* fueron cultivadas en medio BG-11, específico para cianobacterias. La especie *Tamariz #11* fue cultivada en medio WC conteniendo cantidades modificadas de vitaminas según procedimientos desarrollados en el laboratorio de Microalgas del Proyecto VLIR de Plantas Medicinales. Finalmente, la especie *Tamariz #12* fue transferida a medio F/2 modificado con respecto a su contenido de vitaminas (ver Anexos 1.3-1.5). Las botellas para cultivo fueron tapadas y selladas previo establecimiento de una línea de aireación. Los frascos fueron dispuestos en los estantes a temperaturas establecidas entre 28-34 °C, una intensidad lumínica de 2300-2500 Lux (Cole-Parmer, S0059339, Taiwán) y una agitación de 750-850 r.p.m. hasta su posterior cambio de medio según Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Especificaciones de medios de cultivo-especies y tiempo de cambio/cosecha.

Identificación	Tipo	Medio	Cambio/Cosecha
<i>Flores 1</i>	Cianobacteria	BG-11	10-12 Días
<i>Koenraad #10</i>	Cianobacteria	BG-11	10-12 Días
<i>Tamariz #5</i>	Cianobacteria	BG-11	10-12 Días
<i>Tamariz #6</i>	Cianobacteria	BG-11	10-12 Días
<i>Tamariz #11</i>	Microalga dulceacuícola	WC + Vitamina	10-12 Días
<i>Tamariz #12</i>	Microalga marina	F/2 + Vitamina	15-20 Días

Fuente: El Autor

Por: Jacinto Solano



2.2.3.2 *Cosecha de biomasa:* se colocó aproximadamente 90 mL en cada tubo de la centrifuga de medio viejo con las cianobacterias/microalgas, centrifugando por 5 minutos a 3000 r.p.m. con parada lenta (SIGMA, S2-6, Alemania) y luego descartando el agua. El almacenamiento de la biomasa acuosa fue en tubos Falcon de 50 mL después de realizarse 2 lavados con agua destilada y se conservó en refrigeración a 4 °C (MCM, C-QN43L2B, México).

2.3 ETAPA II o FASE DE EXTRACCIÓN

2.3.1 Descripción.

En esta etapa se realizó el secado de biomasa (liofilización), la extracción lipofílica de la biomasa (maceración en frío con diclorometano, la aplicación de ultrasonido directo-baño maría con ultrasonidos y filtración) y la concentración de extracto (evaporación rápida con rotavapor-nitrógeno y concentración al vacío).

2.3.2 Fundamento de los procesos.

2.3.2.1 *Secado de biomasa:* es un proceso que permite eliminar la mayor parte de la humedad de la biomasa. El más común para células cianobacterianas y microalgales es la liofilización, que se basa en sublimar el hielo de un producto congelado; se realiza a vacío y a baja temperatura haciendo que el agua del producto pase directamente de estado sólido a vapor, para lo cual se debe trabajar por debajo del punto triple del agua (0.01 °C y 4.5 mmHg). Mantiene la estructura y el aspecto original de células, vacunas, alimentos y otros productos de origen natural o sintético sin alterar su composición cuali o cuantitativa e impide la alteración de productos termolábiles (Facultad de Ciencias UG, 2015).

2.3.2.2 *Extracción de biomasa:* permite obtener a partir de cianobacterias y microalgas un producto denominado extracto, que es una mezcla compleja de multitud de compuestos químicos, los cuales tienen aplicaciones a nivel de salud, alimentario o industrial (Pardo Z., 2002). Los procesos vinculados en la extracción lipofílica de biomasa cianobacteriana y microalgal incluyeron maceración en frío, ultrasonificación directa-baño maría y filtración.



La *maceración* genera dos productos que pueden ser empleados dependiendo de las necesidades de uso, el sólido ausente de esencias o el propio extracto. La maceración en frío consiste en sumergir la biomasa a macerar en un recipiente con la cantidad suficiente de solvente hasta cubrirlo totalmente. Esto se lleva a cabo por un lapso largo a temperatura menores a 20 °C. Tiene la ventaja de extraer la mayoría de las sustancias (dependiendo del solvente) hasta llegar a un equilibrio de concentración a ambos lados de la membrana celular, sin alterar su composición por efectos de temperatura (López A, 2008).

El *ultrasonido* es un sonido de frecuencias entre 20 kHz y más de 100 MHz, son una alternativa a otras técnicas para activar reacciones químicas, mejorando la velocidad y los rendimientos; desarrollados fundamentalmente para reacciones en fase heterogénea entre reactivos inmiscibles o poco solubles con frecuencias entre 20 y 40 kHz. La fuente más común es el *baño de ultrasonidos* con frecuencias entre 30-50 kHz y se utiliza principalmente como medio eficaz para romper estructuras celulares y extraer su material intracelular, para dispersar sólidos o para emulsionar líquidos (GIDOLQUIM UB, 2014).

Las sondas ultrasónicas introducen la energía acústica directamente en el interior de la mezcla de reacción dando como resultado el mayor contacto debido entre las moléculas, los ciclos de compresión juntan las moléculas del medio mientras que los ciclos de expansión las separan, produciendo la cavitación y los gases y vapores que se generan dentro de la burbuja incrementan la temperatura y presión, favoreciendo la velocidad en las reacciones químicas y la desintegración de material intracelular en las células (GIDOLQUIM UB, 2014).

La *filtración* es la separación de partículas sólidas o semisólidas de un líquido por la aplicación de una fuerza impulsora en un período de tiempo determinado. La filtración por gravedad tiene la única fuerza impulsora (gravedad) para que el líquido atraviese el filtro (Angurell, y otros, 2017).

2.3.2.3 *Concentración de extracto:* permite evaporar el solvente de extracción (DCM) y concentra los principios activos del extracto algal hasta prácticamente la sequedad (CONDORCHEM.wwa, 2011). Los procesos vinculados en la concentración de extracto cianobacteriano y microalgal incluyeron evaporación al vacío (rotavapor) y con N₂ y concentración al vacío.



La *evaporación o vaporización* se aplica generalmente a solventes de origen orgánico-volátil. El solvente pasa lenta y gradualmente a un estado gaseoso, una vez que haya adquirido la energía necesaria por un leve incremento de la temperatura sin llegar a la ebullición. Dicho proceso se puede llevar por aumento de la temperatura y por disminución de la presión o vacío. Para acelerar dicho proceso, se induce una leve corriente de aire o de nitrógeno a fin de evitar la condensación de los vapores en equilibrio. La evaporación se utiliza cuando se desea concentrar u obtener un sólido a partir de una disolución o suspensión de cualquier naturaleza, o bien para el secado de un sólido (Angurell, y otros, 2017).

La *concentración al vacío* se utiliza para muestras acuosas y muestras con alto contenido de disolvente volátil con volúmenes de menos de 1 mL. Ampliamente utilizado en la purificación de ADN/ARN, oligosíntesis, aislamiento/síntesis de sustancias naturales, análisis de alimentos y medioambientales, en toxicología y medicina forense. Se basa en concentrar un residuo hasta prácticamente su punto de saturación, incluso en algunos casos llega hasta un residuo seco del 5% del peso total inicial (CONDORCHEM.wwa, 2011) y (Christ, 2017).

2.3.3 Procedimientos.

2.3.3.1 *Secado de biomasa:* se procedió a pesar los tubos vacíos de liofilización, se añadió aproximadamente 20 mL de biomasa acuosa en cada tubo; se pesó a dichos tubos y se congeló en biofreezer (DAIREL, ULTF80, Dinamarca) a -80 °C por un período superior a 2 horas. Los tubos se traspasaron al liofilizador, previamente estabilizado a -52 °C y 0.090 mBar por 25 horas (± 1 h). Fueron pesados con la biomasa liofilizada y calculados su rendimiento; finalmente se la trasfirió a tubos de vidrio y se conservó a -20 °C hasta su extracción.

2.3.3.2 *Extracción de biomasa:* se procedió a pesar 2 g de biomasa de cada especie, macerando en frío con 60 mL de diclorometano (DCM) por 24 horas, luego se aplicó ultrasonido directo a través de cono (Cole-Parmer, GEX500, U.S.A.) a 10 °C y 20% Amp. por 5 min durante 3 ciclos. Posteriormente se aplicó ultrasonido con baño maría a 27-33 °C por 5 horas y 3 ciclos (Cole-Parmer, 08893-21, México); finalmente fue filtrado y conservado en balón a 3,5 °C (MCM, C-QN43L2B, México).



2.3.3.3 *Concentración de extracto:* el solvente de extracción fue eliminado a presión reducida utilizando un rotavapor Laborota 4000 (HEIDOLPH, Alemania) a 30 °C y 50 r.p.m. Se transfirió el extracto a un tubo de vidrio de 20 mL y se eliminó el remanente de DCM bajo una atmósfera de N₂ hasta aprox. 1 mL. Se pesó cada vial vacío y se trasfirió de VI a XV gotas (según especie) de extracto concentrado al mismo; se concentró al vacío (LABCONCO, 7900002, U.S.A) a 30 °C y 500 mBar por 2,5-3 horas hasta peso constante después de su secado y finalmente su conservación (POLSKA, ZNL200, U.S.A.) a -20 °C hasta su análisis.

2.4 ETAPA III o FASE DE EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIBACTERIANO

2.4.1 Descripción.

Se basó en la evaluación del efecto antibacteriano a través del método de microdilución en placa empleando la técnica de microELISA con fluorescencia mediante uso de resazurina para la lectura final y para la determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC50).

2.4.2 Fundamento de los procesos.

2.4.2.1 *Preparación del cryostock:* el cryostock llamado también suspensión stock de inóculo, es la concentración requerida de un agente biológico para ensayos de actividades antimicrobianas, preparada y conservada a -80 °C. En la presente investigación el cryostock de *S. aureus* (ATCC 25923) fue 5x10⁵ UFC/mL.

El *medio sólido* (TSA) o *líquido* (TSB) favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos y estrictos como: *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus pyogenes* y *Staphylococcus pneumoniae*. La tripteína y la peptona de soya aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas; la peptona de soya aporta también carbohidratos que estimulan el crecimiento de muchos microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Adicionado con 5-10 % sangre, se logra un medio enriquecido y adecuado para observar reacciones de hemólisis en microorganismos aerobios y anaerobios nutricionalmente exigentes. El caldo posee



adicionalmente fosfato di potásico que otorga capacidad buffer, y la glucosa como fuente de energía (Britania, 2010).

2.4.2.2 Controles antimicrobianos (Ampicilina): la ampicilina es un antibiótico que se utiliza en investigaciones microbiológicas por formar parte del grupo de las penicilinas (antibiótico esencial) y el tratamiento de la mayoría de las infecciones provocadas por las bacterias grampositivas y gramnegativas (American Society of Health-System Pharmacists, 2015). Es bactericida; inhibe la síntesis y reparación de la pared celular bacteriana, se usa a las proteínas específicas llamadas PBPs (Penicillin-Binding Proteins) localizadas en la pared celular. Al impedir que la pared celular se construya o repare correctamente, se produce la lisis de la bacteria y su muerte (Instituto Químico Biológico, 2010).

2.4.2.3 Preparación del inóculo y placa test: el inóculo bacteriano es la cantidad o número de bacterias infectantes que son introducidos accidental o voluntariamente en los tejidos vivos o en medios de cultivos especiales para determinar ciertas características de la patología o de la bacteria (Limón T., 2014). Para esta investigación se utilizó 5×10^3 UFC/mL de *S. aureus*.

El *potencial antimicrobiano* es la capacidad de una sustancia química natural (droga), proveniente de extractos de plantas u otras especies vegetales y animales que inhibe el crecimiento o elimina a microorganismos patógenos (Facultad de Agroindustrias UNN, 2007).

La *concentración inhibitoria 50* (IC50) es la concentración de un compuesto, necesaria para reducir el crecimiento de la población de organismos *in vitro*, incluyendo células eucarióticas en un 50%. A menudo se usa para denotar actividad antibacteriana *in vitro*, pero también se utiliza como estándar para la citotoxicidad de células eucarióticas en cultivo (Finch, 2007)

La *microdilución en placa* es un método derivado de la macrodilución, involucra pequeños volúmenes de caldo. Se basa en determinar el crecimiento de un microorganismo en presencia de concentraciones crecientes de un antimicrobiano diluido en el medio de cultivo



(caldo o agar); se trabaja a concentraciones bajas y en policubetas de plástico de fondo cónico/redondo (García R., 2000).

La cuantificación del efecto de extractos de cianobacterias y microalga sobre un inóculo bacteriana por microELISA se basa en la lectura de la turbiedad causada en cada pocillo, la cual es observable a simple vista y cuantificable mediante el equipo según las absorbancias obtenidas. Los métodos de lectura más comunes son: colorimetría, fluorescencia y luminiscencia. La *fluorescencia* es ligeramente más sensible y tiene un amplio rango de medida. Se basa en un producto de reacción (resofurina) emite fluorescencia cuando es excitado a una determinada longitud de onda, siendo las unidades relativas de fluorescencia (fotones de luz emitidos) proporcionales a la cantidad de producto analizado (CULTEK, 2006) y (Uribe G., 2010).

2.4.3 Procedimientos:

2.4.3.1 Preparación del cryostock: se procedió a preparar los respectivos medios de cultivo (agar de soya tripticasa y caldo de soya tripticasa) según la formulación descrita por el proveedor, previamente esterilizado a 1 atm. y 121 °C por 15 minutos (Tuttnauer, 2540EK, U.S.A.), dispensado en cajas de Petri el TSA y el caldo TSB con adición de tween al 0.001% dentro de cabina de bioseguridad tipo II (LABCONCO, 3440801, U.S.A). Un inóculo de 100 µL, conteniendo la cepa de *S. aureus* (ATCC 25923) fue sembrado por estría en una caja de Petri e incubado (MEMMERT, INB 500, Alemania) a 37 °C por 24 horas; se colectó las colonias en 15 mL de agua estéril hasta una turbiedad equivalente al patrón de McFarland, realizando una serie de diluciones, siembras y controles para la preparación de 16 mL de cryostock de *S. aureus* (5×10^5 UFC/mL) según procedimientos desarrollados en el laboratorio de Microbiología del Proyecto VLIR de Plantas Medicinales (ver Tabla 2.2 y Anexo 3.6). Finalmente, dicho cryostock fue conservado en biofreezer (DAIREL, ULTF80, Dinamarca) a -80 °C.

Tabla 2.2 Especificaciones para la preparación del cryostock de *S. aureus*.

Dilución	Volumen sembrado (µL)
10^4	10
10^5	50



10^6	100
10^7	100

Fuente: (Proyecto VLIR, 2017)

El control y corrección del cryostock fueron realizados mediante la siembra en agar TSA por duplicado con su respectivo recuento de colonias y volúmenes calculados para la elaboración posterior del inóculo bacteriano (5×10^3 UFC/mL) a ensayar.

2.4.3.2 Preparación de controles del antimicrobiano (Ampicilina): se procedió a determinar el punto de corte de la ampicilina inyectable de la CLSI (<8 µg/mL) y su respectivo control de calidad en cepas de *S. aureus* (0.5-2 µg/mL de ampicilina); las concentraciones a ensayar requeridas fueron de 0.5-64 µg/mL, las cuales fueron preparadas mediante una serie de diluciones del antibiótico en agua estéril (ver Anexo 3.7) y finalmente se conservó en refrigeración.

2.4.3.3 Preparación del inóculo y placa test: se procedió a la preparación de 12 mL de inóculo bacteriano de 5×10^3 UFC/mL de *S. aureus* a partir del cryostock en el caldo TSB con tween 80 al 0.001%, previamente preparado; el peso del extracto en el vial fue disuelto con el inóculo bacteriano según la relación 512 µg extracto/1 mL de la mezcla, siendo homogeneizado en vórtex (GEMMY, VM300, Taiwán) por 3 minutos y luego transferido por cuadriplicado a una placa fondo plano las cantidades requeridas para obtener las concentraciones finales; dichos detalles se presentan a continuación en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 Especificaciones de filas y columnas para la elaboración de la placa test

Concentración	512 µg/mL	128 µg/mL	32 µg/mL	*8 µg/mL	*2 µg/mL
Fila	A-D	A-D	A-D	A-D	A-D
Columna	2	3	4	5	6
Volumen Bacteria-TSB-Tween 80	200 µL	50 µL	12.5 µL	50 µL	12.5 µL
Volumen TSB-Tween 80	0 µL	150 µL	187.5 µL	150 µL	187.5 µL

Nota: *La dilución de 32 µg/mL sirvió para obtener las diluciones de 8 y 2 µg/mL.



Los controles fueron realizados por cuadriplicado en la columna I con 200 µL de inóculo (bacteria-caldo-tween) para los controles positivos y 200 µL de caldo-tween para los negativos. La columna XII sirvió para el control antimicrobiano y control de proceso, siendo colocados 10 µL del antibiótico en cada pocillo de forma descendente 64-0.5 µg/mL de ampicilina en la columna 12. La incubación de la placa fue por 18-24 h en incubadora (MEMMERT, INB 500, Alemania), se añadió 20 µL de colorante fluorescente (resazurina) a cada pocillo y se incubó nuevamente por 40 minutos a 37 °C. Finalmente, la concentración inhibitoria 50 fue determinada mediante las absorbancias de cada pocillo de la placa de fondo redondo, la cual fue leída a 550-590 nm por microELISA (BioTek, H1M, U.S.A.).



CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESULTADOS DEL RENDIMIENTO DE BIOMASA LIOFILIZADA

El porcentaje de rendimiento de biomasa liofilizada en promedio (Tabla 3.1) que se obtuvo de un volumen aproximado de 20 mL de biomasa acuosa, fueron los siguientes:

Tabla 3.1 Resultados de rendimiento porcentual de biomasa liofilizada.

Identificación	Biomasa acuosa (g)	Biomasa liofilizada (g)	Rendimiento porcentual (%)
<i>Flores #1</i>	22.95	0.65	2.83
<i>Koenraad #10</i>	20.27	2.32	11.45
<i>Tamariz #5</i>	22.33	0.97	4.34
<i>Tamariz #6</i>	16.84	2.01	11.94
<i>Tamariz #11</i>	16.18	2.08	12.86
<i>Tamariz #12</i>	13.74	2.02	14.70

3.2 RESULTADOS DE LA RELACIÓN ENTRE EXTRACTO Y BIOMASA

La relación entre extracto lipofílico (obtención de 1 g. con diclorometano) y biomasa liofilizada de cada especie (DER nativo) en promedio (Tabla 3.2), fueron los siguientes:

Tabla 3.2 Resultados de DERnative de extracto cianobacteriano y microalgal

Identificación	Biomasa liofilizada (g)	Extracto (mg)	DERnative (g Biomasa liofilizada: g Extracto)
<i>Flores #1</i>	2.04	24.10	84.7:1
<i>Koenraad #10</i>	2.01	30.10	66.8:1



<i>Tamariz #5</i>	1.55	18.80	82.5:1
<i>Tamariz #6</i>	2.02	49.30	41.0:1
<i>Tamariz #11</i>	2.01	60.20	33.4:1
<i>Tamariz #12</i>	1.76	73.60	24.0:1

3.3 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIBACTERIANO

El resultado de la acción biológica según la IC50 por los extractos lipofílicos de cianobacterias y microalgas (concentración de 512, 128, 32, 8 y 2 µg/mL) frente a un inóculo bacteriano de 5×10^3 UFC/mL de *S. aureus* (ATCC 25923), realizado por cuadriplicado a partir del método de microdilución, modificada en caldo y tween 80 y leído en el equipo de microELISA con colorante fluorescente (resazurina) a 550-590 nm, fue el siguiente:

Tabla 3.3 Resultados de la IC50 y potencial antibacteriano de los extractos lipofílicos microalgales.

Identificación	IC50	Potencial antibacteriano
<i>Flores #1</i>	> 64 µg/mL	Inactivo
<i>Koenraad #10</i>	> 64 µg/mL	Inactivo
<i>Tamariz #5</i>	> 64 µg/mL	Inactivo
<i>Tamariz #6</i>	> 64 µg/mL	Inactivo
<i>Tamariz #11</i>	7.13 µg/mL	Ligeramente activo (bacteriostático)
<i>Tamariz #12</i>	> 64 µg/mL	Inactivo

3.4 DISCUSIÓN

Las microalgas son microorganismos eucariotas de tamaño entre 2-200 µm mientras que las cianobacterias son procariotas de tamaño entre 5-20 µm (ver Sección 1.2-1.3). Según los rendimientos obtenidos a partir de la biomasa liofilizada (40-85 g. de biomasa necesarios



para la obtención de 1 g. de extracto) se puede observar la necesidad de generar grandes volúmenes de la misma para desarrollar una extracción rentable a partir de estos microorganismos. Esta limitación práctica al momento de pensar en la utilización de microalgas o cianobacterias en escala industrial ha llevado a la búsqueda constante de nuevas metodicas de cultivo eficientes. Biorreactores en disposición horizontal o vertical, materiales diversos para los biorreactores, modificación de metodicas y parámetros fisico-químicos de cultivo, entre otros son elementos que se han investigado a nivel mundial (Jacob-Lopes, Queiroz Z., & Ramírez M., 2013).

La microdilución en caldo se considera una técnica de referencia mundial para la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana y también para su mecanismo de acción (bactericida o bacteriostático); sin embargo, la gran cantidad de variables dependientes del microorganismo, del medio de cultivo, del inóculo y del antimicrobiano o extracto influyen notablemente en el resultado obtenido (García R., 2000). En extractos de origen natural, se elige como diluyente de los mismos al dimetil sulfóxido (DMSO) para métodos de microdilución en placa, ya que posee una polaridad y compatibilidad amplias con los solventes apolares y polares de extracción (Mendiola L, 2008). En esta investigación, se trabajó inicialmente con concentraciones de extracto entre 0.5-64 µg/mL, en base al punto de corte del antibiótico “ampicilina” y los rangos de control de calidad de la cepa de *S. aureus* (ATCC 25923) según CLSI (2016). Este procedimiento mostró absorbancias desproporcionales o distorsionadas entre concentraciones de extracto, incluso valores fuera de rango al medir a 405 nm. y hasta 4 repeticiones por placa. Esta distorsión puede ser explicada por problemas de solubilidad y de pigmentación de los extractos utilizados o del mismo operador, ya que el método de microdilución utiliza una serie de diluciones previas con volúmenes pequeños para la preparación de la placa test final originando errores de exactitud al no poseer (en caso de estudiantes) la destreza requerida.

Como opción para eliminar la posible interferencia producida por la pigmentación de los extractos, se utilizó resazurina, un colorante que en reacciones positivas produce fluorescencia (resofurina) y su reacción puede ser leída en longitudes de onda entre 550-590 nm. siendo útil para detectar la actividad reductiva en células, para medir la proliferación y actividad metabólica mitocondrial (Biotium, 2017). Dicho colorante disminuyó la



interferencia de la pigmentación de estos extractos y permitió la evaluación de las especies que no mostraron problemas de solubilidad (*Tamariz #5* y *Tamariz #12*).

Para evaluar el potencial de las especies que mostraron dificultades al momento de disolver sus extractos, se desarrollaron dos experimentos adicionales:

1) Se adicionó DCM de manera directa sobre los extractos problema y se completó volumen con DMSO, de tal manera que la concentración final del extracto sea de 160 mg/mL en un solvente que contenía ya sea 7,5 o 10% de DCM en DMSO. A partir de esta solución se procedió de la forma estandarizada para la preparación de las diluciones respectivas; la concentración de DCM máxima en placa fue de 6.4 µg/mL. Si bien se observó un ligero aumento en la disolución del extracto, al ser cuantificada su actividad, hubo una ligera disminución de la concentración del inóculo bacteriano en el blanco, lo que indicó que el DCM estaba inhibiendo a la bacteria, dando resultados no reales. El diclorometano es un potente desinfectante a dosis altas debido a su halógeno Cloro; inhibe las enzimas esenciales de una célula mediante la oxidación de los grupos S-H causando cambios en la permeabilidad de la membrana celular y muerte; su dosis atóxica máx. es 5% (Araujo E. & Alba T., 2008).

2) Se prepararon disoluciones de extractos en una solución de caldo tripticasa soya conteniendo un porcentaje de tensioactivo Tween 80 (0.001%) a fin de facilitar la formación de una emulsión homogénea. El tween 80 reduce la tensión superficial y aumenta la solubilidad de los extractos que normalmente son incapaces de disolverse en caldos (Suval, 2017). Se tuvo un ligero aumento en la disolución del extracto lipofílico, formando una emulsión homogénea del tipo O/A de partículas suspendidas de extracto, no cuantificable visualmente. Las emulsiones oleosas-acuosas (O/A) son más solubilizadores y tienen mayor homogeneidad de sus componentes que del tipo A/O (Lui, 2009).

A fin de evaluar de forma más certera el posible efecto antibacteriano de los extractos analizados se consideró la posibilidad de incrementar las concentraciones inicialmente empleadas en esta investigación, llegándose a utilizar un rango de concentración entre 2 a 512 µg/mL. Esta opción fue tomada al considerar lo reportado en el año 2000, dentro de los Procedimientos de la Cuarta Conferencia del Pacifico-Asia en Biotecnología Algal en Hong Kong en los cuales se afirma que los extractos con metanol, etanol, diclorometano y hexano



de algunas especies de cianobacterias y microalgas tienen actividad frente a diversos microorganismos patógenos, uno de ellos *S. aureus* con concentraciones desde 0.3-1000 µg/mL de extracto (Chen & Jiang, 2001) y el CLSI (2016) que permite trabajar hasta concentraciones de 512 µg/mL en métodos de microdilución en caldo. Dentro de otras publicaciones científicas están las especies de cianobacterias como *Oscillatoria sp.*, *Romeria sp.*, *Synechocystis sp.* y *Synechococcus sp.* (C. Sassi, Gorlach-Lira, O. Barboza, & Sassi, 2017); las microalgas de agua dulce como *Chlorella sp.*, *Stichococcus sp.* y *Anabaena sp.* (Suasnavas Lagos, 2017) y microalgas marinas como *Acanthophora sp.*, *Bryothamnion sp.*, *Gracilaria sp.*, *Gelidium sp.*, *Caulerpa sp.*, *Caulerpa sp.*, y spp., *Halimeda sp.*, *Ulva sp.*, *Codium sp.*, y *Sargassum sp.* (Di Bernardo, y otros, 2009) con actividad antibacteriana frente a *S. aureus*. Los resultados obtenidos en este segundo ensayo permitieron constatar la falta de actividad frente a *S. aureus* (ATCC 25923) de los extractos de cianobacterias codificados como *Flores #1*, *Koenraad #10*, *Tamariz #5*, y *Tamariz #6*. Igual resultado se produjo para la microalga marina codificada como *Tamariz #12*. Finalmente, el hallazgo más relevante se produjo para la microalga dulceacuícola *Tamariz #11* que dio una IC50 de 7.13, manifestando un efecto bacteriostático debido a su ligera actividad antibacteriana contra el agente. El control del proceso (ampicilina) actuó inhibiendo en los rangos establecidos por la CLSI.

Otras interferencias pueden estar en el tipo de placas que tenemos (transparentes), no ideales para leer fluorescencia y el equipo de microELISA que puede cometer algún error al momento de leer cada pocillo. Finalmente, una última consideración a señalar es que las especies de cianobacterias y microalgas en investigación al no ser identificadas taxonómicamente y provenir de diferentes fuentes, incluso de otro país; no se conoce los parámetros exactos de sus cultivos ni sus potenciales biológicos; dichas situaciones pueden limitar la producción de ciertas sustancias con actividades antibacterianas y erróneamente manifestar su inactividad antibacteriana.



CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

Las microalgas dulceacuícolas y marinas tuvieron un DER nativo bajo en comparación con las cianobacterias; esto demostró que, para obtener un gramo de extracto lipofílico de una cianobacteria, se requiere mayor cantidad de biomasa liofilizada que de las microalgas.

En cuanto a la determinación de la IC₅₀ por los extractos lipofílicos de cianobacterias y microalgas; las cuatro cianobacterias (*Flores #1, Koenraad #10, Tamariz #5 y Tamariz #6*) y la microalga marina (*Tamariz #12*) tuvieron mayor a 64 µg/mL de extracto lipofílico contra una concentración de 5×10^3 UFC/mL de *S. aureus* (ATCC 25923) indicando la inexistencia de inhibición mientras que la microalga dulceacuícola (*Tamariz #11*) tuvo una IC₅₀ de 7.13 y un IC₉₀ mayor a 64 µg/mL, demostrando inhibición parcial.

El método de microdilución modificada en caldo con tween 80 aplicado para evaluar el potencial antibacteriano de los extractos lipofílicos en esta investigación, tuvo mejores ventajas y resultados que la microdilución estándar. Sus valores de la IC₅₀ obtenidos por lectura con fluorescencia demostraron que las cuatro cianobacterias y la microalga marina no tienen un potencial antibacteriano activo contra *S. aureus* mientras que la microalga dulceacuícola tiene un ligero potencial activo, manifestando un efecto bacteriostático para la concentración ensayada del agente.

Finalmente, la lectura por microELISA a 550-590 nm. con la adición de colorante fluorescente (resazurina) pudo leer correctamente la placa test, incluidas las absorbancias fuera de rango a 405 nm y obtener resultados válidos para esta investigación.



4.2 RECOMENDACIONES

Debido a una serie de inconvenientes durante la evaluación del potencial antibacteriano de extractos de cianobacterias y microalgas frente a *S. aureus*, se recomienda:

- Probar solubilidades de los extractos de cianobacterias y microalgas en diferentes solventes y por diferentes métodos antes de realizar cualquier ensayo para tener una garantía total de la solubilidad de los extractos y una veracidad de los resultados.
- Determinar la IC50 por el extracto de la microalga dulceacuícola *Tamariz #11* por otros métodos junto con *Tamariz #5* y *Tamariz #12* para determinar sus MICs exactos y además probar los mismos con otros microorganismos patógenos.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aden, A., Laurens, L., & Pienkos, P. T. (Abril de 2012). Biocombustibles de Microalgas. *Investigación y Ciencia*(427), 1-3. Recuperado el Julio de 2017, de <http://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/universo-digital-548/biocombustibles-de-microalgas-8578>
- AlgaEnergy. (2017). ¿Qué son las Microalgas? Madrid, España: ALGAENERGY. Recuperado el Julio de 2017, de <http://www.algaenergy.es/conocenos/que-son-las-microalgas/>
- American Society of Health-System Pharmacists. (Diciembre de 2015). Inyección de Ampicilina. *MedlinePlus: Información de salud para usted*. Estados Unidos: BIBLIOTECA NACIONAL DE MEDICINA DE LOS EE. UU. Recuperado el Octubre de 2017, de <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a601133-es.html>
- Angurell, I., Casamitjana, N., Caubet, A., Mérez-García, M., Muñoz-Torrero, D., Pujol, M. D., . . . Seco, M. (2017). Centrifugación, Evaporación y Secado, Extracción, Filtración. En *Operaciones Básicas en el Laboratorio de Química* (págs. 1-3). Barcelona, España: UNIVERSIDAD DE BARCELONA. Recuperado el Septiembre de 2017, de <http://www.ub.edu/obq/obq%20castellano/index1.html#>
- Araujo E., F. L., & Alba T., N. E. (Diciembre de 2008). Evaluación de los Desinfectantes Utilizados en el Proceso de Limpieza y Desinfección del Área de Fitoterapéuticos en Laboratorios PRONABELL Ltda. *Trabajo de Grado*, 26-27. Bogotá, Colombia: PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA. Recuperado el Octubre de 2017, de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis232.pdf>
- Barrios L., M. (2012). Características Epidemiológicas, Clínicas y Microbiológicas de las Infecciones por *Staphylococcus aureus* adquirido en la Comunidad de Pediatría. *Tesis*, 9-10. Madrid, España: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Recuperado el Agosto de 2017
- Beltrán, A., Cubides, S., Ibáñez, N., & Nieto, M. (2017). Microalgas. *I(I), Primera*, 2-18. Recuperado el Julio de 2017
- Biotium. (2017). Resazurina. *Glowing products for science*. Estados Unidos. Recuperado el Agosto de 2017, de <https://biotium.com/product/resazurin-sodium-salt/>



Britania. (2010). Tripteína soya agar y Tripteína soya caldo. *Medio de Cultivo*. Buenos Aires, Argentina: LABORATORIOS BRITANIA S.A. Recuperado el Octubre de 2017, de <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/tripteinasonagar.htm> and <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/tripteinasonocaldo.htm>

Bush, L., Pérez, M., & Schmidt, C. (2017). Infecciones por Estafilococos. *Cocos grampositivos*. Kenilworth, NJ, USA: MERCK SHARP & DOHME. Recuperado el Julio de 2017, de <http://www.msdmanuals.com/es-ec/professional/enfermedades-infecciosas/cocos-grampositivos/infecciones-por-estafilococos>

C. Sassi, C., Gorlach-Lira, K., O. Barboza, G., & Sassi, R. (Septiembre de 2017). Microcystins production and antibacterial activity of cyanobacterial strains of *Synechocystis*, *Synechococcus* and *Romeria* from water and coral reef organisms (Brazil). *Revista Internacional de Biología Tropical*, 65(3), 893-895. Recuperado el Octubre de 2017, de <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/29437/29978>

Campoverde A., M. V., & Pomaquia L., G. V. (2014). Determinación de la Actividad Antibacteriana de *Euglena viridis* y *Oscillatoria* sp. sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Tesis*, 14-15. Cuenca, Ecuador: UNIVERSIDAD DE CUENCA. Recuperado el Julio de 2017, de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/5040/1/Tesis.pdf>

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada BJ. (2011). Compuestos con Actividad Antibacterial Producidos por las Microalgas *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum*. *Repositorio Institucional del CICESE(1007)*, 3-5. Baja California, México: CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE MÉXICO. Recuperado el Agosto de 2017, de <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1142/1/175011.pdf>

Cepeda P., M. A. (2017). Determinación de la Actividad Hemoaglutinante y Bactericida en Extractos Obtenidos de Algas y Líquenes Adquiridas en la Zona de la Laguna de Ozogoche en el Período Junio-Octubre del 2016. *Trabajo de Titulación*, 12. Riobamba, Ecuador: UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO. Recuperado el Julio de 2017, de <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/3734/1/UNACH-EC-FCS-LAB-CLIN-20117-0006.pdf>



- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. (Febrero de 2014). Características Generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, I(61), 30-37. Recuperado el Septiembre de 2017, de <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
- Chans, G. R. (2002). Estafilococos. En Dpto. de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, & Instituto de Higiene (Edits.), *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (págs. 1-11). Montevideo, Uruguay: INSTITUTO DE HIGIENE DE LA UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY. Recuperado el Septiembre de 2017, de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2017.pdf>
- Chen, F., & Jiang, Y. (Edits.). (2001). *Algae and Their Biotechnological Potential* (Vol. I). (El autor, Trad.) Hong Kong: THE UNIVERSITY OF HONG KONG. doi:10.1007/978-94-015-9835-4
- Chepurnova, O. (2000). WC Medium. *Culture Medium for Freshwater Diatoms*, 1-2. Gand, Bélgica: BCCM/DCG. Recuperado el Septiembre de 2017
- Christ, M. (2017). Evaporación al Vacío. *Resumen de aplicaciones*. Harz, Alemania: CRIST. Recuperado el Agosto de 2017, de <https://www.martinchrist.de/es/aplicaciones/evaporacion-al-vacio.html>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (January de 2016). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (Vigésima sexta ed.). USA. Recuperado el Octubre de 2017
- Colorado G., M., Moreno T., D., & Pérez P., J. (Junio de 2013). Desarrollo, Producción y Beneficio Ambiental de la Producción de Microalgas. La Experiencia en La Guajira, Colombia. *Revistas científicas PUJ: Ambiente y Desarrollo*, XVII(32), 115-117. doi:0121-7607
- CONDORCHEM.wwa. (Abril de 2011). Concentración al vacío. *Procesos de Separación y Concentración de Sustancias en Mezclas de Líquido y Sólido*, 3-4. Barcelona, España: CONDORCHEM IBÉRICA. Recuperado el Septiembre de 2017, de http://blog.condorchem.com/img/2011/04/concentracion-al-vacio-extractos-naturales-pdf_ok.pdf



Contreras, J., Rojas, F., & Saldías, J. (2017). Microalgas: Aspectos Biológicos, Aplicaciones y Técnicas para su Cultivo y Crecimiento. *Cultivo de Microalgas Dulceacuícolas: Técnicas, Usos y su Proyección*, 3-28. Chile: INSTITUTO DE BIOLOGÍA DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO. Recuperado el Julio de 2017

Cortés, J., Cuervo, S., Rodríguez, J., Silva, E., & Tibavizco, D. (Junio de 2007). Enfoque terapéutico de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. *Revista Biomédica*, 27(2), 295-298. doi:0120-4157

CULTEK. (Febrero de 2006). Soluciones ELISA. En *Protocolos y Técnicas* (págs. 1-5). España: CULTEK.COM. Recuperado el Octubre de 2017, de <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf>

Di Bernardo, M., García, M., Gualtieri, M., Jiménez, J., Medina, G., Ríos, N., & Yáñez, C. (2009). Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas. *Revista Peruana de Biología*, XVI(1), 1. Recuperado el Octubre de 2017, de <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/182>

Dpto. Biología General UNPSJB. (Marzo de 2016). Cianobacterias. *Botánica General, I*, 1-2. Patagonia, Argentina: UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO. Recuperado el Agosto de 2017, de <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/botanicageneral/wp-content/uploads/2016/03/Cianobacterias.pdf>

Dpto. de Pesca FAO. (2017). Cultivo de Microalgas. En *La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura...* (págs. 1-10). Estados Unidos: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado el Julio de 2017, de <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S02.htm>

Dreckmann, K., Sentíes, A., & Núñez, M. (2013). *Manual de Prácticas de Laboratorio Biología de Algas* (Vol. I). México, México: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA. Recuperado el Agosto de 2017, de <http://www.itz.uam.mx/ceu/publicaciones/MBA/files/biologiadealgas.pdf>

Duiops.net. (2009). Cianoficeas. *Los Seres Vivos*. DUIOPS. Recuperado el Julio de 2017, de <http://www.duiops.net/seresvivos/cianoficeas.html>



Facultad de Agroindustrias UNN. (2007). ANTIMICROBIANOS. *Hipertextos del Área de la Biología*. Chaco, Argentina: UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE. Recuperado el Octubre de 2017, de <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/antiboticos/antimicrobianos2.htm>

Facultad de Ciencias UG. (2015). Secado por Liofilización. *Prácticas Docentes en la Facultad de Ciencias*, 1-2. Granada, España: UNIVERSIDAD DE GRANADA. Recuperado el Septiembre de 2017, de <http://fciencias.ugr.es/practicasdocentes/wp-content/uploads/guiones/SecadoPorLiofilizacion.pdf>

Facultad de Química UNAM. (2014). *Procesos de Separación* (Primera ed., Vol. I). México, México: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. Recuperado el Agosto de 2017, de <http://depa.fquim.unam.mx/procesos/PDF/ProcesosI.pdf>

Fernández S., J. M. (2014). Cultivo de Microalgas. En *Ingeniería de Procesos Aplicada a la Biotecnología de Microalgas* (págs. 1-2). Sevilla: UNIVERSIDAD DE ALMERÍA. Recuperado el Septiembre de 2017, de <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-2-cultivo-de-microalgas.html>

Figueroa-Ortiz, L., López-Elías, J., Nieves-Soto, M., & Voltolina, D. (2004). Producción y Composición De Microalgas En Laboratorios Comerciales del Noroeste De México. *Revista de Nutrición Acuícola "Avances en Nutrición Acuícola VII"*, 636-640. Recuperado el Septiembre de 2017

Finch, L. J. (2007). Concentración inhibitoria 50. *Glosario 2007*, 53-54. (L. Gómez Álvarez, Trad.) Estados Unidos: BIBLIOTECA AGRÍCOLA NACIONAL DE EE.UU. Recuperado el Octubre de 2017

Flores, J., & Ríos, M. (2016). Actividad Antibacteriana de Chamaesyce thymifolia frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*; Por el Método de Macrodilución y Difusión en Agar. *Tesis*, 34-35. Iquitos, Perú: UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA. Recuperado el Septiembre de 2017, de http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3854/Marcos_Tesis_Titulo_2016.pdf?sequence=1



Fundación BBVA. (2009). La Biota de los Ríos: Los Microorganismos Autotróficos. En S. Sabater, & A. Elosegi (Edits.), *Conceptos y Técnicas de Ecología Fluvial* (Primera ed., págs. 230-232). Madrid, España: RUBES EDITORIAL. doi:978-84-96515-87-1

Fundación Parque Científico Tecnológico UPGC. (2017). BG11 Medium. *Banco Español de Algas: Medios de Agua Dulce*. Gran Canaria, España: UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA. Recuperado el Septiembre de 2017, de <http://marinebiotechnology.org/es/component/virtuemart/medios-de-cultivo/medios-de-agua-dulce/bg11-detail?Itemid=0>

Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (Febrero de 2013). *Staphylococcus aureus. Documentos de ELIKA(7)*. (ELIKA.EUS, Ed.) España. Recuperado el Septiembre de 2017, de http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento95/7.Staphylococcus.pdf

García R., J. A. (2000). Métodos Básicos para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos. En J. García R., & J. Picazo (Ed.), *Procedimientos en Microbiología Clínica* (pág. 18). Madrid, España: SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. Recuperado el Octubre de 2017, de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>

GIDOLQUIM UB. (2014). Activación de Reacciones Químicas mediante Ultrasonidos. En *TÉCNICAS Y OPERACIONES AVANZADAS EN EL LABORATORIO DE QUÍMICO (TOALQ)* (págs. 1-3). Barcelona, España: UNIVERSIDAD DE BARCELONA. Recuperado el Septiembre de 2017, de <http://www.ub.edu/talq/es/node/251>

Goris, K., Muylaert, K., & Voorspoels, S. (Junio de 2014). Detection of Flavonoids in Microalgae from Different Evolutionary Lineages. *Journal de Phycology*, 50(3), 483-492. Belgica: WILEY ONLINE LIBRARY. doi:10.1111

Gómez L., L. M. (Septiembre de 2007). Microalgas: Aspectos Ecológicos y Biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*, XIX(2), 9-11. Recuperado el Agosto de 2017, de https://www.researchgate.net/publication/268424391_MICROALGAS_ASPECTOS_ECOLOGICOS_Y_BIOTECNOLOGICOS



Gómez S., S., & Ortega A., D. (2014). Microalgas-Uso y Aplicaciones de la Biomasa Microalgal en el Medio Ambiente. *Jornada Técnica de Ingeniería Ambiental*, 11-13. Manizales, Colombia: UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES. Recuperado el Julio de 2017

González C., A. (Octubre de 2015). ¿Qué son las Microalgas? Interés y Uso. *Negocio Agroalimentario y Cooperativo(11)*, 1-3. Almería, España: FUNDACIÓN CAJAMAR. Recuperado el Julio de 2017, de <http://www.fundacioncajamar.es/pdf/bd/comun/transferencia/microalgas-1444391623.pdf>

Grupo Investigación UCM. (2012). CYANOPHYTA. *Biodiversidad y Taxonomía de Plantas Criptogamas*. Madrid, España: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Recuperado el Agosto de 2017, de http://escalera.bio.ucm.es/usuarios/cryptogamas/plantas_cryptogamas/materiales/algas/cyanophyta.html

Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. (Agosto de 2014). Microalgas, Cultivo y Beneficios. (P. Muñoz, Ed.) *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 159-169. doi:10.4067/S0718-19572014000200001

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (Septiembre de 2012). *Staphylococcus aureus. Fichas de Agentes Biológicos*. España: DATABio. Recuperado el Septiembre de 2017, de <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biológicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus%20aureus.pdf>

Instituto Químico Biológico. (Diciembre de 2010). Ampicilina. *Vademecum(52)*. Buenos Aires, Argentina: ANMAT . Recuperado el Octubre de 2017, de <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a052.htm>

Jacob-Lopes, E., Queiroz Z., L., & Ramírez M., L. (Jul-Dic de 2013). FOTOBIORREACTOR: Herramienta para Cultivo de Cianobacterias. *Ciencia y Tecnología*, VI(2), 9-19. Recuperado el Octubre de 2017, de http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_V6N2%20fotobiorreactor.pdf



Limón T., M. D. (Mayo de 2014). Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes. *Guía técnica*, 11-12. Madrid, España: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Recuperado el Octubre de 2017, de http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Normativa/GuiasTecnicas/Ficheros/agen_bio.pdf

López A, E. (Enero de 2008). Métodos de Extracción. En E. L. Aguilar, *Tesis* (págs. 1-4). Puebla, México: UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS. Recuperado el Agosto de 2017, de http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lpro/lopez_a_e/capitulo1.pdf

Lucero, D., & Siavichay, L. (2016). Análisis de la Influencia de Diferentes Foto-periodos y Concentración de Nutrientes sobre la Síntesis de Polifenoles y Carotenoides en Especies Cultivadas de Chlorella y Nannochloropsis. *Trabajo de Titulación*, 22-27. Cuenca, Ecuador: UNIVERSIDAD DE CUENCA. Recuperado el Julio de 2017, de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26011/1/Tesis.pdf>

Lui, D. (Marzo de 2009). Emulsiones. *Revista del Ministerio de Salud de Perú*, 7-10. Recuperado el Octubre de 2017

Mendiola L, J. (Abril de 2008). Extracción de Compuestos Bioactivos de Microalgas mediante Fluídos Supercríticos. 133. Madrid, España: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID. Recuperado el Octubre de 2017

Organización de Especialistas en Información de Teratología. (Agosto de 2015). Estafilococo aureus. *Medicamentos y Mas Durante el Embarazo y la Lactancia*, 1-3. USA: MOTHERTOBABY.ORG. Recuperado el Septiembre de 2017, de <https://mothertobaby.org/es/fact-sheets/estafilococo-aureus/pdf/>

Pardo Z., J. (Mayo de 2002). Patentabilidad de los extractos vegetales. *Los Lunes del Centro de Patentes*, 2-3. Barcelona, España: Universidad de Barcelona. Recuperado el Septiembre de 2017, de http://www.ub.edu/centredepatents/pdf/doc_dilluns_CP/pardo_patentesextractosplantas.pdf

Pavas, N., Pérez, N., & Rodríguez, E. (Septiembre de 2010). Resistencia de *Staphylococcus aureus* a los Antibióticos en un Hospital de la Orinoquia colombiana. *Revista Infectio*, 14(3), 168-169. Recuperado el Julio de 2017



- Posada P., M. I. (2014). Cianobacterias. *Recursos Biológicos "Ecología"*. Antioquía, Colombia: UNIVERSIDAD EIA. Recuperado el Agosto de 2017, de Recursos Biologicos de Colombia: <http://recursosbiologicos.eia.edu.co/ecologia/estudiantes/cianobacterias.htm>
- Sánchez, I. M. (2017). Cianobacterias. Características Generales. En I. M. Sánchez, & Dpto. de Microbiología de UGR (Ed.), *DIVERSIDAD MICROBIANA Y TAXONOMÍA* (pág. 1). Granada, España: UNIVERSIDAD DE GRANADA. Recuperado el Agosto de 2017, de Universidad de Granada: http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=206&Itemid=257
- Seija, V. (2008). Etiopatogenia microbiológica: Género *Staphylococcus*. En *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (págs. 257-264). Montevideo, Uruguay: INSTITUTO DE HIGIENE DE LA UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY. Recuperado el Septiembre de 2017, de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>
- Suasnávaz Lagos, J. (Septiembre de 2017). Evaluación de la Actividad Antibacteriana de Extractos de 4 Géneros de Microalgas originarias de la Estación antártica ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado usando cepas ATCC. *Proyecto de investigación*. Quito, Ecuador: UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR. Recuperado el Octubre de 2017
- Suval. (2017). Polisorbato 80. *Jabonería de Suval*. Madrid, España: ZIDDEA. Recuperado el Septiembre de 2017, de <http://jaboneriadesuval.com/polisorbato-80.html>
- TECNOPLADES. (2013). Condiciones de Cultivo. En *PROTOCOLO DE MICROALGAS* (págs. 8-10). Colima, México: CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN PESQUERA MANZANILLO DE COLIMA. Recuperado el Septiembre de 2017, de http://siproduce.sifupro.org.mx/seguimiento/archivero/6/2013/trimestrales/anexo_1843-5-2013-11-10.pdf
- Uribe G., J. (2010). Fundamentos y Tipos de ELISA. En J. Uribe González, *Virología veterinaria* (págs. 1-3). Bucaramanga, Colombia: UNIVERSIDAD DE SANTANDER. Recuperado el Octubre de 2017



Velázquez-Meza, M. E. (2012). Surgimiento y Diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. *Salud Pública de México*. Cuernavaca, México: INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO. Recuperado el Julio de 2017, de <http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/6648/8249>

Velenzuela E., E. (2013). Preparación de Soluciones de Nutrientes. En E. Velenzuela E., & Facultad de Ciencias Marinas (Ed.), *Manual de Prácticas de Laboratorio de Cultivos de Apoyo* (Primera ed., Vol. I, págs. 13-15). Baja California, México: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA. Recuperado el Septiembre de 2017, de http://fcm.ens.uabc.mx/licenciatura/Manuales_Laboratorio/BA/Etapa%20Disciplinaria/Manual%20de%20Laboratorio%20Cultivos%20de%20Apoyo%202013.pdf



ANEXOS

ANEXO 1. FOTOS Y TABLAS DE LA ETAPA I EN EL LABORATORIO DE MICROALGAS

Anexo 1.1 Fotos de las 6 especies de cianobacterias y microalgas investigadas, observadas a 40X.

<i>Flores #1</i>	<i>Koenraad #10</i>	<i>Tamariz #5</i>
<i>Tamariz #6</i>	<i>Tamariz #11</i>	<i>Tamariz #12</i>

Fuente: El autor.

Anexo 1.2 Foto de los cultivos de las cianobacterias y microalgas en el laboratorio.



Fuente: El autor.



Anexo 1.3 Tabla de la composición y preparación del medio BG-11.

#	Composición	Stock	Preparación
1	NaNO ₃ q.p.	75 g/L	0.75 g.
2	K ₂ HPO ₄	40 g/L	500 µL
3	MgSO ₄ •7H ₂ O	75 g/L	500 µL
4	CaCl ₂ •2H ₂ O	36 g/L	500 µL
5	Ácido Cítrico monohidratado	6 g/L	500 µL
6	Citrato amónico-férrico	0.6 g/L	500 µL
7	Na ₂ EDTA•2H ₂ O	0.1 g/L	500 µL
8	NaHCO ₃	2 g/L	500 µL
9	Solución traza de metales	Ver anexo 1.6	500 µL
10	Agua destilada q.p.	-	c.s.p. 500 mL

Fuente: El Autor

Anexo 1.4 Tabla de la composición y preparación del medio WC.

#	Composición	Stock	Preparación
1	NaNO ₃	85 g/L	750 µL
2	K ₂ HPO ₄	8.71 g/L	750 µL
3	MgSO ₄ •7H ₂ O	36.97 g/L	500 µL
4	CaCl ₂ •2H ₂ O	36.76 g/L	500 µL
5	Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	28.42 g/L	500 µL
6	NaHCO ₃	12.6 g/L	500 µL
7	Solución traza de metales	Ver anexo 1.7	500 µL
8	Vitamina	Ver anexo 1.9	500 µL
	Agua destilada q.p.	-	c.s.p. 500 mL

Fuente: El Autor

Anexo 1.5 Tabla de la composición y preparación del medio F/2.

#	Composición	Stock	Preparación
1	NaNO ₃ 15%	75 g/L	750 µL.



2	NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	5 g/L	750 µL
3	Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	30 g/L	500 µL
4	NaCl q.p	5 M	500 µL
5	Solución traza de metales	Ver anexo 1.8	500 µL
6	Vitamina	Ver anexo 1.9	500 µL
7	Agua destilada		c.s.p. 500 mL

Fuente: El Autor

Anexo 1.6 Tabla de la solución stock de traza de metales para el medio BG-11.

#	Composición	Cantidad (g)
1	H ₃ BO ₃ q.p.	2.86
2	MnCl ₂ •4H ₂ O	1.81
3	ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.22
4	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.39
5	CuSO ₄ •5H ₂ O	0.08
6	Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	0.05
7	Agua destilada q.p.	c.s.p. 950 mL

Fuente: El autor.

Anexo 1.7 Tabla de la solución stock de traza de metales para el medio WC.

#	Composición	Cantidad (g)
1	H ₃ BO ₃ q.p.	1.0
2	MnCl ₂ •4H ₂ O	0.18
3	ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.022
4	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.0063
5	CuSO ₄ •5H ₂ O	0.0098
6	CoCl ₂ •6H ₂ O	0.01
7	Na ₂ EDTA•2H ₂ O	4.36 g
8	FeCl ₂ •6H ₂ O	3.15 g
9	Agua destilada q.p.	c.s.p. 950 mL

Fuente: El autor.



Anexo 1.8 Tabla de la solución stock de traza de metales para el medio F/2.

#	Composición	Cantidad (g)
1	MnCl ₂ •4H ₂ O	0.18
2	ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.022
3	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.0063
4	CuSO ₄ •5H ₂ O	0.0098
5	CoCl ₂ •6H ₂ O	0.01
6	Na ₂ EDTA•2H ₂ O	4.36 g
7	FeCl ₂ •6H ₂ O	3.15 g
8	Agua destilada q.p.	c.s.p. 950 mL

Fuente: El autor.

Anexo 1.9 Tabla de la solución stock de vitaminas para los medios WC y F/2.

#	Composición	Cantidad
1	Biotina q.p.	1 mL
2	Cianocobalamina q.p	1 mL
3	Tiamina q.p.	0.1 g
4	Agua destilada q.p.	c.s.p. 950 mL

Fuente: El Autor



ANEXO 2. FOTOS Y TABLAS DE LA ETAPA II EN EL LABORATORIO DE FITOQUÍMICA

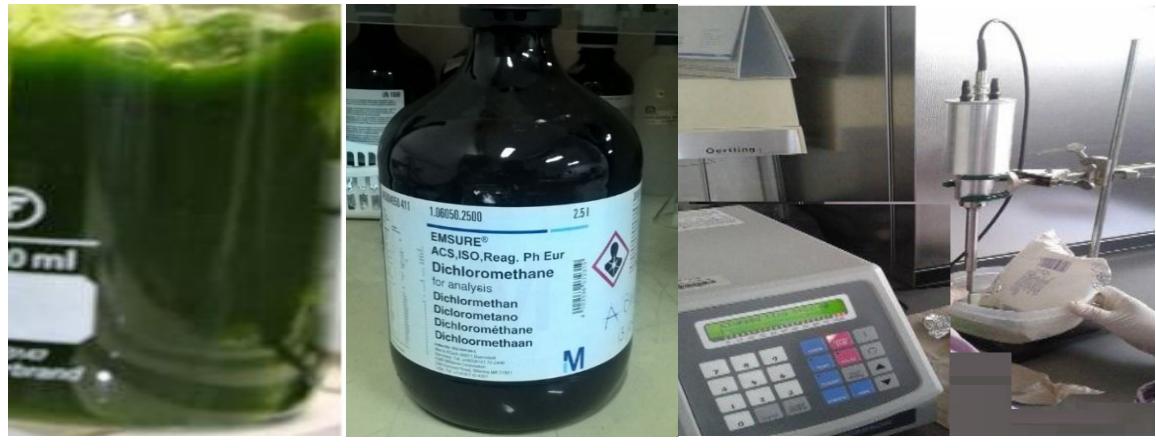
Anexo 2.1 Fotos de la congelación, liofilización y biomasa microalgal liofilizada.



Fuente: El Autor

Anexo 2.2 Fotos de la sección de extracción lipofílica de la biomasa cianobacteriana y microalgal con DCM.

Maceración en frío, DCM y ultrasonicación directa



Fuente: El Autor



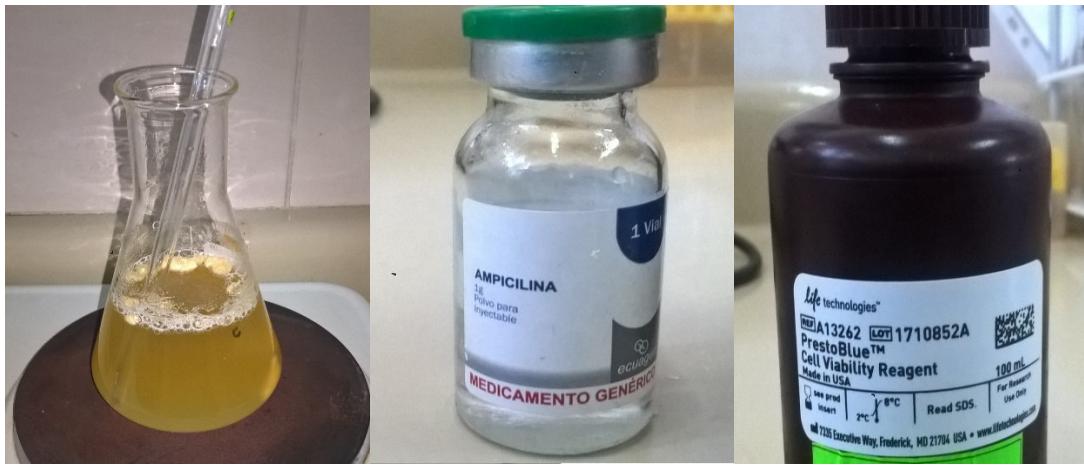
Anexo 2.3 Fotos de la sección de concentración de extracto cianobacteriano y microalgal.

Evaporación simple al vacío	Evaporación con N ₂	Concentración al vacío

Fuente: El Autor

ANEXO 3. FOTOS Y TABLAS DE LA ETAPA III EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Anexo 3.1 Fotos de los reactivos utilizados (TSA, ampicilina y resazurina).



Fuente: El Autor

Anexo 3.2 Fotos del cryostock de *S. aureus* y extractos microalgales investigados.

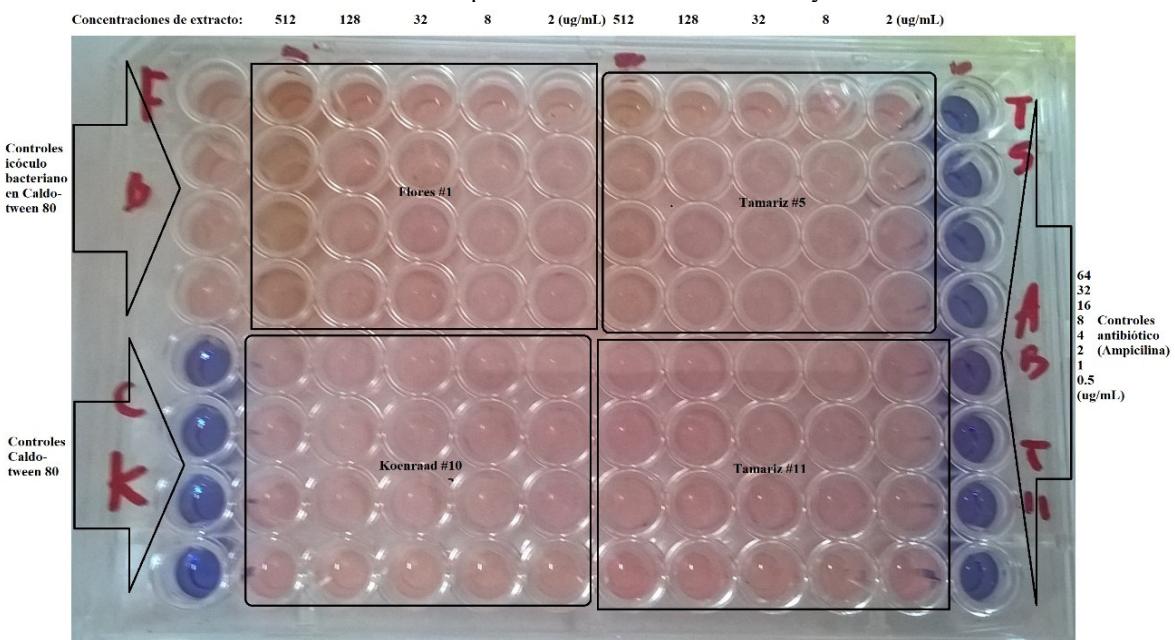


Fuente: El Autor

Por: Jacinto Solano

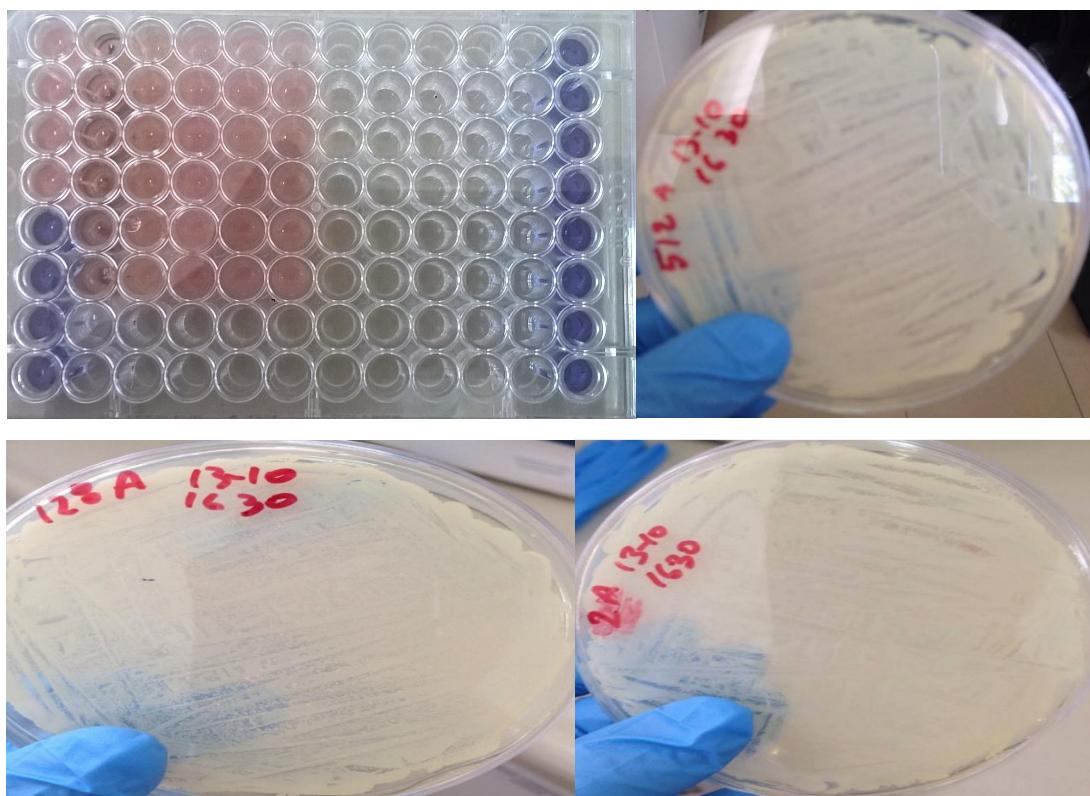


Anexo 3.3 Foto de la placa test mostrando resultados y controles.



Fuente: El Autor

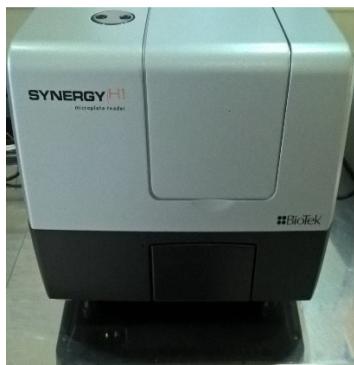
Anexo 3.4 Foto de placa test lig. positiva y efecto antibacteriano del extracto microalgal vs *S. aureus*.



Fuente: El Autor



Anexo 3.5 Foto del equipo de microELISA.



Fuente: El Autor

Anexo 3.6 Tabla de las diluciones para la preparación del cryostock de *S. aureus*.

Dil. 10 ¹	Dil. 10 ²	Dil. 10 ³	Dil. 10 ⁴	Dil. 10 ⁵	Dil. 10 ⁶	Dil. 10 ⁷	Dil. 10 ⁸
100 µL Suspensión inicial + 900 µL Agua estéril	100 µL Dil 10 ¹ + 900 µL Agua est.	100 µL Dil 10 ² + 900 µL Agua est.	100 µL Dil 10 ³ + 900 µL Agua est.	100 µL Dil 10 ⁴ + 900 µL Agua est.	100 µL Dil 10 ⁵ + 900 µL Agua est.	100 µL Dil 10 ⁶ + 900 µL Agua est.	100 µL Dil 10 ⁷ + 900 µL Agua est.

Fuente: El Autor

Anexo 3.7 Tabla de la preparación de controles de antimicrobianos de ampicilina.

Datos	Concentración
Solución madre de Ampicilina:	250 mg/mL
Solución stock de Ampicilina	20 mg/mL
Dilución # 1	64 µg/mL
Dilución # 2	32 µg/mL
Dilución # 3	16 µg/mL
Dilución # 4 (punto de corte)	8 µg/mL
Dilución # 5	4 µg/mL
Dilución # 6	2 µg/mL
Dilución # 7	1 µg/mL
Dilución # 8	0,5 µg/mL

Fuente: El Autor



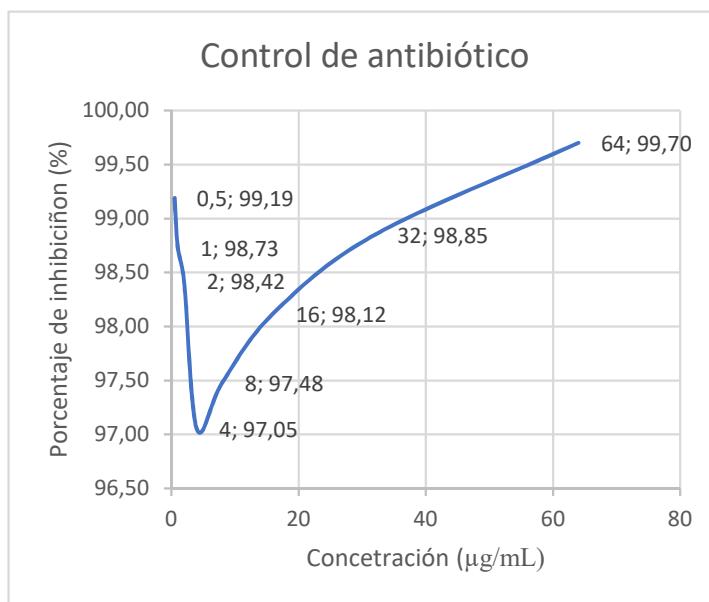
Anexo 3.8 Tabla de porcentajes de inhibición promedio de los extractos microalgales.

Código	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	512	128	32	8	2
<i>Flores #1</i>	% Inhibición	-33.57	-32.20	12.94	37.01	23.65
<i>Koenraad #10</i>	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	512	128	32	8	2
	% Inhibición	-12.14	27.21	16.01	38.78	37.37
<i>Tamariz #5</i>	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	512	128	32	8	2
	% Inhibición	-36.56	20.16	38.46	36.07	53.53
<i>Tamariz #6</i>	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	512	128	32	8	2
	% Inhibición	-40.82	-16.37	19.94	8.59	12.01
<i>Tamariz #11</i>	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	512	128	32	8	2
	% Inhibición	44.85	44.90	59.16	44.72	29.39
<i>Tamariz #12</i>	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	512	128	32	8	2
	% Inhibición	-7.046	11.75	54.42	22.69	-32.86

Fuente: El Autor

Anexo 3.9 Tabla y gráfica de los porcentajes de inhibición del control antimicrobiano (Ampicilina).

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje inhibición (%)
4	99.70
32	98.85
16	98.12
8	97.48
4	97.05
2	98.42
1	98.73
0.5	99.19



Fuente: El Autor

FIN/THE END